

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045947**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.01.22

(51) Int. Cl. **C07K 16/36** (2006.01)

(21) Номер заявки
201890340

(22) Дата подачи заявки
2016.07.21

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО-ИНГИБИТОР ФАКТОРА XIIA**

(31) **62/194,957; 62/273,657; 62/316,310**

(32) **2015.07.21; 2015.12.31; 2016.03.31**

(33) **US**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/US2016/043265**

(87) **WO 2017/015431 2017.01.26**

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

(72) Изобретатель:
**Мэйсон Шона, Кеннистон Джон А.,
Никсон Эндрю, Секстон Дэниел Дж.,
Комо Стивен Р., Эйделман Берг (US)**

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

(56) **ESNOUF M. PETER ET AL.:** "A monoclonal antibody raised against human beta-factor XIIa which also recognizes alpha-factor XIIa but not factor XII or complexes of factor XIIa with C1 esterase inhibitor", **THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS**, SCHATTAUER GMBH, DE, vol. 83, no. 6, 1 June 2000 (2000-06-01), pages 874-881, XP009154609, ISSN: 0340-6245, page 877, column 2

WO-A1-9008835

WO-A1-2013014092

LARSSON MAGNUS ET AL.: "A Factor XIIa Inhibitory Antibody Provides Thromboprotection in Extracorporeal Circulation Without Increasing Bleeding Risk", **SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE**, vol. 6, no. 222, February 2014 (2014-02), XP002762081, abstract

WO-A1-2016109774

(57) Данное изобретение относится к антителам к фактору XIIa и к способам их применения для лечения заболеваний, ассоциированных с фактором XII, включая заболевания, ассоциированные с активацией контактной системы, сигнальным путем плазматического прекалликреина (например, наследственным ангиоотеком) и глазными заболеваниями.

B1

045947

**045947
B1**

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по дате подачи предварительной заявки США № 62/194957, поданной 21 июля 2015 г., предварительной заявки США № 62/273657, поданной 31 декабря 2015 г., и предварительной заявке США № 62/316310, поданной 31 марта 2016 г. Полное содержание каждой из этих указанных заявок включено в данный документ путем ссылки.

Уровень техники

Фактор XII (FXII) является одним из компонентов плазматической системы контактной активации, ответственной как за инициацию внутренней коагуляции, так и за превращение прекалликреина в плазматический калликреин (pKal). Активный pKal расщепляет высокомолекулярный кининоген (HMWK), высвобождая брадикинин, который является мощным активатором отека и боли. Активация внутреннего пути свертывания крови приводит к образованию фибрина и образованию кровяных сгустков (тромба).

Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на идентификации ряда антител, которые специфично связывают фактор XIIa (FXIIa), но не фактор XII (FXII). Эти антитела обладают высокой аффинностью связывания с FXIIa (например, $K_i^{app} < 50$ нМ), успешно снижают активацию плазматического калликреина и увеличивают активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), но не оказывает никакого влияния на протромбиновое время (ПТВ).

Соответственно, в одном аспекте настоящего изобретения раскрыто моноклональное антитело, которое связывается с фактором XIIa (FXIIa) и не связывается с фактором XII (FXII). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой полноразмерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент, такой как Fab. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело взаимодействует с одним или несколькими аминокислотными остатками в цепи С FXIIa. В некоторых примерах аминокислотные остатки выбирают из L390, Y391, W392, G393, H394, S395, F396, C397, H412, C413, L414, Q415, D416, R432, N433, V456, Y458, H507, F509, E510, G511, A512, E513, Y515, D557, A558, C559, Q560, G561, D562, S563, I584, S585, W586, G587, S588, G589, C590, G591, D592 и G597 в SEQ ID NO: 128. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело связывается с фрагментом FXIIa, содержащим остатки 390-397, 412-416, 432-433, 456-458, 507-515, 557-563 или 584-592 из SEQ ID NO: 128.

В некоторых примерах анти-FXIIa антитела, описанные в данном документе, включают: (а) тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (CDR1), определяющую комплементарность область 2 тяжелой цепи (CDR2) и определяющую комплементарность область 3 тяжелой цепи (CDR3), и, необязательно, (б) легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1 легкой цепи, CDR2 легкой цепи и CDR3 легкой цепи.

В некоторых вариантах осуществления вариабельный участок тяжелой цепи содержит CDR3 тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111), QRYRGPKYYYMDA (SEQ ID NO: 112) или QRYRGPYYYYIDA (SEQ ID NO: 113). Такая вариабельная область тяжелой цепи может дополнительно содержать CDR1 тяжелой цепи, которая содержит последовательность по формуле $X_1YX_3MX_5$ (SEQ ID NO: 117), в которой: X_1 представляет собой R, Q, W, H, F, P, M или N; X_3 представляет собой I, V, T, H, S или N и X_5 представляет собой H, C, V, A, R, Q, Y, L, N или S. В некоторых примерах X_1 из CDR1 представляет собой W или Q; X_3 из CDR1 представляет собой S или V и/или X_5 представляет собой H. В некоторых примерах тяжелая цепь CDR1 может содержать аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 41-73 и 121.

В качестве альтернативы или дополнения вариабельная область тяжелой цепи анти-FXIIa антител, описанных в данном документе, может дополнительно содержать CDR2 тяжелой цепи, которая содержит последовательность по формуле $X_1IX_3PSGX_7X_8TX_{10}YX_{12}DSVKG$ (SEQ ID NO: 118), в которой: X_1 представляет собой S, R, V, Y или G; X_3 представляет собой Y, W, V или S; X_7 представляет собой G или S; X_8 представляет собой V, K, M, N, L, F, A, I, S, H или R; X_{10} представляет собой K, R, T, Q, S, N, H или L; и X_{12} представляет собой A или T. В некоторых примерах X_1 из CDR2 представляет собой V или S, X_3 из CDR2 представляет собой Y или W, X_7 из CDR2 представляет собой G, X_8 из CDR2 представляет собой K или H, X_{10} из CDR2 представляет собой R, и/или X_{12} из CDR2 представляет собой A. В некоторых примерах CDR2 тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 74-110, 122-124 и 127.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, содержит комбинацию CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи, представленных в табл. 1.

В некоторых примерах тяжелая цепь анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, содержит вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-39 и SEQ ID NO: 125.

Любая из тяжелых цепей анти-FXIIa антител, описанных в данном документе, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления константная

область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну мутацию (например, аминокислотную замену), которая увеличивает время полужизни антител по сравнению с аналогом дикого типа. Такая мутированная константная область тяжелой цепи может содержать по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем положению 145, 147 или 149 в SEQ ID NO: 119, которая представляет собой аминокислотную последовательность типичной природной константной области тяжелой цепи антитела человека. По меньшей мере одна мутация может представлять собой аминокислотную замену M145Y, S147T и/или T149E. В некоторых примерах мутированная константная область тяжелой цепи содержит аминокислотные замены в положениях 145, 147 и 149 в SEQ ID NO: 119 (например, M145Y, S147T и T149E). Такая мутированная константная область тяжелой цепи может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

Вариабельная область легкой цепи анти-FXIIa антител, описанных в данном документе, может содержать CDR3 легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность MQALQTPWT (SEQ ID NO: 116). В некоторых примерах вариабельная область легкой цепи может дополнительно содержать CDR1 легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность RSSQSLLSHNGYNYLD (SEQ ID NO: 114). В качестве альтернативы или дополнения вариабельная область легкой цепи может дополнительно содержать CDR2 легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность LGSNRAS (SEQ ID NO: 115). В некоторых примерах легкая цепь анти-FXIIa антител, описанных в данном документе, может содержать вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 126.

Любое из анти-FXIIa антител, описанных в данном документе, может представлять собой полноразмерное антитело или его антигенсвязывающие фрагменты. В некоторых примерах антитела могут представлять собой антитела человека или гуманизированные антитела.

Также в объем настоящего изобретения входят выделенная нуклеиновая кислота или набор нуклеиновых кислот, которые в совокупности кодируют любое из анти-FXIIa антител (например, кодируют по меньшей мере вариабельные области тяжелой и легкой цепей антитела), описанных в данном документе, вектор или набор векторов (например, векторов экспрессии), которые включают нуклеиновую кислоту или набор нуклеиновых кислот, и клетка-хозяин или набор клеток-хозяев, которые содержат вектор или набор векторов. Типичные клетки-хозяева включают, но не ограничиваются ими, бактериальные клетки, дрожжевые клетки, клетки насекомых, клетки растений и клетки млекопитающих, такие как клетки CHO.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу получения любого из анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе. Способ включает в себя культивирование клетки-хозяина или набора клеток-хозяев, которые содержат вектор или набор векторов, которые в совокупности кодируют антитело, и сбор культивированных клеток или культуральной среды для выделения антитела. Такой способ может дополнительно включать в себя выделение антитела из культивируемых клеток или культуральной среды.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, ассоциированного с фактором XII, например, заболевания, ассоциированного с активацией контактной системы, заболевания, ассоциированного с rK₁-сигнальным путем, такого как наследственный ангиоотек или НАО, или глазных заболеваний (например, макулярного отека, диабетической ретинопатии, гипертонической ретинопатии, возрастной макулярной дегенерации или окклюзии вены сетчатки) у субъекта. Такие способы могут включать в себя введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества композиции, содержащей антитело, которое связывается с FXIIa и не может связываться с FXII (например, любого из анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе), одной или нескольких нуклеиновых кислот, которые в совокупности кодируют антитело, или векторов экспрессии, содержащих такую нуклеиновую кислоту (такие нуклеиновые кислоты). В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело специфично связывает каталитический домен FXIIa. В других вариантах осуществления изобретения антитело ингибирует активацию FXI до FXIa. В других вариантах осуществления антитела ниже примерно 110 пМ (например, ниже примерно 50 или 10 пМ).

Субъектом, подлежащим лечению с помощью способа, описанного в данном документе, может быть человек, имеющий, предположительно имеющий или имеющий риск rK₁-ассоциированного заболевания (например, НАО). В некоторых примерах субъект имеет, предположительно имеет или имеет риск НАО I, II или III типа.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения субъектом, подлежащим лечению способами, описанными в настоящем документе, может быть человек, имеющий, предположительно имеющий или имеющий риск заболевания, ассоциированного с фактором XII, такого как раскрытые в данном описании (например, заболевания, ассоциированного с активацией контактной системы). Например, субъект может иметь, предположительно иметь или иметь риск заболевания, ассоциированного с активацией контактной системы, такого как тромбоз, включая тромбоз, ассоциированный с мерцательной аритмией, тромбозом глубоких вен (ТГВ), эмболией легочной артерии, инсультом, или образованием артериального или венозного тромбов. В другом примере, субъект может иметь, предположительно иметь или иметь риск заболевания, ассоциированного с rK₁-сигнальным путем, например, НАО, такой

как НАО I, II или III типа. В еще одном примере, субъект может иметь, предположительно иметь или иметь риск глазного заболевания, которое может представлять собой макулярный отек, диабетическую ретинопатию, гипертоническую ретинопатию, возрастную макулярную дегенерацию или окклюзию вены сетчатки.

Также в объем настоящего изобретения входят фармацевтические композиции, содержащие любое из анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель. Такая фармацевтическая композиция может быть предназначена для применения при лечении заболевания, связанного с рКa1-сигнальным путем (например, например, НАО, такого как НАО I, II или III типа), или для применения в производстве лекарственных средств для применения в лечении такого заболевания.

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления изобретения изложены в приведенном ниже описании. Другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из нижеследующих чертежей и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

Нижеследующие чертежи являются частью настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации некоторых аспектов настоящего изобретения, которые могут быть лучше поняты со ссылкой на чертежи в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

Фиг. 1 представляет собой схематическую иллюстрацию, показывающую каскад коагуляции, в котором участвует фактор XII.

Фиг. 2 представляет собой схематическую иллюстрацию, показывающую стратегию отбора антител.

Фиг. 3 представляет собой схематическую иллюстрацию, показывающую биологические методы анализа, используемые для характеристики активности ингибиторов FXIIa, включая анализ активности *in vitro*, анализ активности в плазме и анализ предпочтительного связывания.

Фиг. 4 представляет собой диаграмму, показывающую ингибирующую активность родительского антитела 559C-M71-F06 (IgG1-антитело человека) в отношении FXIIa человека (левая панель) и мыши (правая панель).

Фиг. 5 представляет собой диаграмму, показывающую межвидовую перекрестную реактивность M71-F06, определенную с помощью АЧТВ.

На фиг. 6 показана концентрация иллюстративных анти-FXIIa антител M191-M192 и E09-H11 в плазме крыс в различные моменты времени после инъекции анти-FXIIa антител.

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий увеличение АЧТВ и ПТВ (в секундах) в присутствии анти-FXIIa антитела 559C-X211-A01 (A01). А: Кинетика АЧТВ после 10 мг/кг A01. В: Кинетика АЧТВ в присутствии 10 мг/кг A01 относительно базовой линии. С: Кинетика ПТВ (сек) в присутствии 10 мг/кг A01.

Фиг. 8 представляет собой диаграмму, показывающую АЧТВ-активность антител DX-4012 в указанных временных точках перед введением указанного лечения (Перед введением, серые столбики), за 5 мин до начала исследования (Перед исследованием, черные столбики) и за 5 мин до окончания исследования (После исследования, белые столбики). Значения показывают среднее АЧТВ +/- стандартная ошибка в секундах. А: АЧТВ. В: Кратное увеличение АЧТВ по сравнению с исходным значением (среднее значение измерений до и после исследования на одном животном в контрольный день (дни) исследования).

Фиг. 9 представляет собой диаграмму, показывающую ПТВ-активность антител DX-4012 в указанных временных точках перед введением указанного лечения (Перед введением, серые столбики), за 5 мин до начала исследования (Перед исследованием, черные столбики) и за 5 мин до окончания исследования (После исследования, белые столбики). Значения показывают среднее ПТВ +/- стандартная ошибка в секундах. А: ПТВ. В: Кратное увеличение ПТВ по сравнению с исходным значением (среднее значение измерений до и после исследования на одном животном в контрольный день (дни) исследования).

На фиг. 10 представлена схема внешней петли постоянного артериовенозного (АВ) шунта в ходе исследований тромбоза у приматов, кроме человека. Внешняя петля выведена над верхней частью гамма-камеры для реального измерения времени осаждения тромбоцитов.

Фиг. 11 представляет собой график, показывающий время осаждения тромбоцитов на покрытый коллагеном трансплантат. А: Головка тромба. В: Хвост тромба.

Фиг. 12 представляет собой график, показывающий время осаждения тромбоцитов на покрытый коллагеном трансплантат.

Фиг. 13 представляет собой график, показывающий время осаждения тромбоцитов (всего тромба) на покрытый коллагеном трансплантат.

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий скорость роста тромба на покрытом коллагеном трансплантате, измеряемую как осаждение тромбоцитов с 5-минутным интервалом.

Фиг. 15 представляет собой график, показывающий время осаждения тромбоцитов на покрытый

тканевым фактором трансплантат. А: Головка тромба. В: Хвост тромба.

Фиг. 16 представляет собой график, показывающий время осаждения тромбоцитов на покрытый тканевым фактором трансплантат.

Фиг. 17 представляет собой график, показывающий время осаждения тромбоцитов на покрытый тканевым фактором трансплантат.

Фиг. 18 представляет собой график, показывающий скорость роста тромба на покрытом тканевым фактором трансплантате, измеряемую как осаждение тромбоцитов с 5-минутным интервалом.

Фиг. 19 представляет собой диаграмму, показывающую финальное содержание фибрина и осаждение тромбоцитов в целом тромбе (головке и хвосте) на покрытых коллагеном трансплантатах (серые столбики) и покрытых тканевым фактором трансплантатах (белые столбики). А: Осаждение тромбоцитов. В: Содержание фибрина.

Фиг. 20 представляет собой график, показывающий образование комплекса Fab-фрагмента из DX-4012 и FXIIa с помощью SEC-анализа. А: FXIIa и Fab. В: FXIIa, Fab и Fab-FXIIa-комплекс при 50 мкМ FXIIa и 30 мкМ Fab. С: FXIIa, Fab и Fab-FXIIa-комплекс при 50 мкМ FXIIa и 40 мкМ Fab. D: FXIIa, Fab и Fab-FXIIa-комплекс при 50 мкМ FXIIa и 50 мкМ Fab. E: FXIIa, Fab и Fab-FXIIa-комплекс при 50 мкМ FXIIa и 60 мкМ Fab.

Фиг. 21 представляет собой диаграмму, показывающую ингибирующую активность анти-FXIIa антитела M192-H11 в отношении FXIIa человека.

Фиг. 22 представляет собой диаграмму, показывающую измерения гемостаза, связанного с DX-4012. А: Время кровотечения. В: Объем кровотечения.

Подробное описание изобретения

Компоненты контактной системы инициируют внутренний путь коагуляции и способствуют воспалению путем высвобождения провоспалительного пептида брадикинина. Фактор XII (FXII), также известный как фактор Хагемана, представляет собой сериновую протеазу, которая участвует в активации внутреннего пути коагуляции, а также калликреин-кининовой системы. FXII активируется отрицательно заряженными поверхностями (например, полианионными поверхностями, стеклом, полифосфатом, эллаговой кислотой) с образованием активной формы, FXIIa. Активированный FXIIa обладает способностью расщеплять прекалликреин, генерируя активный рKал. Впоследствии, активированный рKал способен расщеплять FXII до FXIIa, что приводит к положительной обратной связи, где FXIIa генерирует еще больше рKал, который дополнительно активирует дополнительный FXII до FXIIa. Активированный рKал также способен расщеплять высокомолекулярный кининоген (HMWK), высвобождая брадикинин. Каскад свертывания крови, в которой участвует FXII, проиллюстрирован на фиг. 1.

При заболеваниях, ассоциированных с активацией контактной системы, таких как НАО, повышенные уровни брадикинина могут вызывать расширение кровеносных сосудов и воспаление, что приводит к возникновению ангиоотечков. В связи с этим является желательным создание новых терапевтических средств для лечения ряда заболеваний, которые потенциально опосредованы активацией контактной системы.

В настоящем документе описаны антитела, которые связывают и ингибируют FXIIa, а также их применение в ингибировании FXIIa и лечении заболеваний, ассоциированных с активацией контактной системы. В приведенных ниже примерах показано, что получен ряд иллюстративных анти-FXIIa антител, и показано, что они специфично связываются с FXIIa и ингибируют его активность. Такие антитела, примеры которых приведено в данном описании, как ожидается, обеспечивают лучшие терапевтические эффекты при лечении заболеваний, ассоциированных с активацией контактной системы, в частности, снижая продукцию брадикинина, вазодилатацию и патологическое тромбообразование, связанное с симптомами заболевания.

Антитела, связывающиеся с FXIIa

Настоящее изобретение относится к антителам, которые связывают FXIIa, например, каталитический домен FXIIa. Такие антитела могут не связываться с FXII.

Антитело (взаимозаменяемо используется в форме множественного числа) представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную специфично связываться с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид, и т.д., через по меньшей мере один сайт распознавания антигена, расположенный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном описании термин "антитело" включает в себя не только интактные (т.е. полноразмерные) поликлональные или моноклональные антитела, но также и их антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные фрагменты (scFv), их мутанты, слитые белки, содержащие участок антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, диантитела, наноантитела, линейные антитела, одноцепочечные антитела, полиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела) и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит сайт распознавания антигена требуемой специфичности, включая варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотной последовательности антител и ковалентно модифицированные антитела. Антитело включает антитело любого класса, такого как IgD, IgE, IgG, IgA, IgM или (или их подкласса), и антитело не должно принадлежать к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности кон-

стантного домена тяжелых цепей антитела, иммуноглобулины могут быть отнесены к различным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно подразделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

В некоторых вариантах осуществления анти-FXIIa антитела, описанные в настоящем документе, могут связывать и ингибировать активность FXIIa по меньшей мере на 50% (например, на 60, 70, 80, 90, 95% или в большей степени). Кажущаяся константа ингибирования (K_i^{app} или $K_{i,app}$), которая обеспечивает измерение активности ингибитора, связана с концентрацией ингибитора, требующейся для снижения активности фермента, и не зависит от концентрации фермента. Ингибирующая активность анти-FXIIa антитела, описанного в настоящем документе, может быть определена с помощью рутинных способов, известных в данной области техники.

Величина K_i^{app} для антитела может быть определена путем измерения ингибирующего эффекта различных концентраций антитела на выраженность реакции (например, активность фермента); а подгонка изменения в константе скорости псевдопервого порядка (v) как функции концентрации ингибитора к модифицированному уравнению Моррисона (уравнение 1) дает оценку величины кажущейся K_i . Для конкурентного ингибитора K_i^{app} может быть получена из точки пересечения с осью y , получаемой из линейного регрессионного анализа графика зависимости K_i^{app} от концентрации субстрата.

$$v = A \cdot \frac{([E] - [I] - K_i^{app}) + \sqrt{([E] - [I] - K_i^{app})^2 + 4[E] \cdot K_i^{app}}}{2} \quad (\text{Уравнение 1})$$

Где A равно v_0/E , начальной скорости (v_0) ферментативной реакции в отсутствие ингибитора (I), деленной на общую концентрацию фермента (E).

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело, описанное в данном документе, может иметь величину K_i^{app} , составляющую 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50, 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 нМ или ниже для антигена-мишени или антигенного эпитопа. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело может иметь более низкую K_i^{app} для первой мишени (например, FXIIa) относительно второй мишени (например, FXII). Различия в K_i^{app} (например, в отношении специфичности или других параметров) могут быть по меньшей мере 1, 5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 или 10^5 -кратными. В некоторых примерах осуществления анти-FXIIa антитело лучше ингибирует первый антиген (например, первый белок в первой конформации или его имитатор) относительно второго антигена (например, того же первого белка во второй конформации или его имитатора; или второго белка). В некоторых вариантах осуществления изобретения любое из анти-FXIIa антител может быть дополнительно подвергнуто созреванию аффинности для снижения K_i^{app} антитела к антигену-мишени или его антигенному эпитопу.

Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть мышинными, крысиными, человеческими или любого другого происхождения (включая химерные или гуманизированные антитела). Такие антитела будут неприродными, то есть они не продуцируются у животного без вмешательства человека (например, иммунизации такого животного желаемым антигеном или его фрагментом).

Любое из антител, описанных в данном документе, может являться моноклональными или поликлональным. "Моноклональное антитело" относится к гомогенной популяции антител, а "поликлональное антитело" относится к гетерогенной популяции антител. Эти два термина не ограничивают источник антитела или способ, с помощью которого их получают.

В одном примере антитело, используемое в способах, описанных в настоящем документе, представляет собой гуманизированное антитело. Гуманизированные антитела относятся к формам антител животного (например, мышинных), которые представляют собой определенные химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина животного. По большей части, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиента заменены остатками CDR животного (донорного антитела), такого как мышь, крыса или кролик, обладающей желаемой специфичностью, аффинностью и силой связывания. В некоторых случаях, остатки в каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками из иммуноглобулина животного. Более того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которые не присутствуют ни в антителе-реципиенте, ни в импортируемых CDR-или каркасных последовательностях, но которые включены для дополнительного улучшения и оптимизации функций антитела. В общем, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере один, а обычно, два переменных домена, в которых все или по существу все из CDR-областей соответствуют таковым иммуноглобулина животного, а все или по существу все FR-области представляют собой консенсусные последовательности иммуноглобулина человека. Оптимально, гуманизированное антитело также будет содержать по меньшей мере участок константной области или константного домена иммуноглобулина (Fc), обычно, иммуноглобулина

человека. Антитела могут содержать Fc-области, модифицированные, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител имеют одну или несколько CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), которые изменены относительно исходного антитела, которые также называются одной или несколькими CDR, "полученными из" одной или нескольких CDR исходного антитела. Процесс получения гуманизированных антител также может включать созревание аффинности.

В другом примере, антитело, описанное в настоящем документе, представляет собой химерное антитело, которое может включать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи антитела человека. Химерные антитела относятся к антителам, имеющим переменную область или часть переменной области из первого биологического вида и константную область из второго вида. Как правило, в этих химерных антителах переменная область обеих легкой и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных из одного вида млекопитающих (например, млекопитающего (кроме человека), такого как мышь, кролик и крыса), тогда как константные участки гомологичны последовательностям в антителах, полученных от другого млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть осуществлены модификации аминокислот в переменной области и/или константной области.

В некоторых вариантах осуществления анти-FXIIa антитела, описанные в настоящем документе, специфично связываются с соответствующим антигеном-мишенью или его эпитопом. Антитело, которое "специфично связывается" с антигеном или эпитопом, является термином, хорошо известным в данной области техники. Считается, что молекула проявляет "специфичное связывание", если она реагирует более часто, с большей скоростью, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретным антигеном-мишенью по сравнению с альтернативными мишенями. Антитело "специфично связывается" с антигеном-мишенью или эпитопом, если оно связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей длительностью, чем оно связывается с другими веществами. Например, антитело, которое специфично (или предпочтительно) связывается с антигеном (FXIIa) или антигенным эпитопом на нем, представляет собой антитело, которое связывает этот антиген-мишень с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем оно связывается с другими антигенами или другими эпитопами на том же антигене. В случае этого определения также следует понимать, что, например, антитело, которое специфично связывается с первым антигеном-мишенью, может или не может специфично или предпочтительно связываться со вторым антигеном-мишенью. Таким образом, "специфичное связывание" или "предпочтительное связывание" не обязательно требует (хотя может включать) исключительное связывание. В некоторых примерах, антитело, которое "специфично связывается" с антигеном-мишенью или его эпитопом, не может связываться с другими антигенами или другими эпитопами на том же антигене. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, описанные в настоящем документе, специфично связываются с FXIIa. В некоторых вариантах осуществления антитела, описанные в настоящем документе, специфично связываются с FXIIa и не связываются с FXII.

Используемый в настоящем описании термин "фактор XIIa" или "FXIIa" относится к активной форме фактора XII, а термин "фактор XII" или "FXII" относится к проферменту или зимогену фактора XII (неактивной форме). FXII представляет собой одноцепочечный гликопротеин с молекулярной массой около 80 кДа. После активации FXII превращается в активную форму, FXIIa, которая содержит две цепи, тяжелую цепь (353 остатков тяжелой цепи FXIIa человека) и легкую цепь (243 остатков легкой цепи FXIIa человека), удерживаемые дисульфидной связью. FXII человека кодируется геном F12. Аминокислотная последовательность FXII человека хорошо известна в данной области техники, например, под номером доступа NP_000496.2 в базе данных GenBank.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело, описанное в настоящем документе, имеет подходящую аффинность связывания антигена-мишени (например, FXIIa) или его антигенных эпитопов. Используемый в данном описании термин "аффинность связывания" относится к кажущейся константе ассоциации или K_A . K_A является обратной величиной константы диссоциации (K_D). Анти-FXIIa антитело, описанное в настоящем документе, может иметь аффинность связывания (K_D) по меньшей мере 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} М или ниже для антигена-мишени или антигенного эпитопа. Повышенная аффинность связывания соответствует меньшей K_D . Более высокая аффинность связывания антителом первого антигена относительно второго антигена может быть обозначена более высокой K_A (или меньшей численной величиной K_D) для связывания первого антигена, чем K_A (или численная величина K_D) для связывания второго антигена. В таких случаях, антитело имеет специфичность к первому антигену (например, первому белку в первой конформации или его имитатору) относительно второго антигена (например, того же первого белка во второй конформации или его имитатора; или второго белка). В некоторых вариантах осуществления анти-FXIIa антитела, описанные в настоящем документе, имеют более высокую аффинность связывания (более высокую K_A или меньшую K_D) с FXIIa по сравнению с аффинностью связывания с зимогеном FXII или другим белком в rKcal-сигнальной системе. Различия в аффинности связывания (например, в отношении специфичности или других параметров) могут быть по меньшей мере 1, 5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 или 10^5 -кратными. В некоторых вариантах осуществления изобретения для любого из анти-FXIIa антител может

быть дополнительно проведено созревание аффинности для повышения аффинности связывания антитела к антигену-мишени или его антигенному эпитопу.

Аффинность связывания (или специфичность связывания) можно определить с помощью различных способов, включая равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с использованием флуоресцентного анализа). Типичными условиями для оценки аффинности связывания являются буфер HBS-P (10 мМ HEPES pH 7,4, 150 мМ NaCl, 0,005% (об/об) Surfactant P20). Эти методы могут быть использованы для измерения концентрации связанного связывающего белка в зависимости от концентрации белка-мишени. Концентрация связанного связывающего белка ([Связанный]) в общем связана с концентрацией свободного белка-мишени ([Свободный]) следующим уравнением:

$$[\text{Связанный}] = \frac{[\text{Свободный}]}{K_d + [\text{Свободный}]}$$

Однако не всегда необходимо производить точное определение K_A , так как иногда бывает достаточно получить количественное измерение аффинности, например, определяемое с использованием способа, такого как ELISA или FACS-анализ, которое пропорционально K_A , и, таким образом, может быть использовано для сравнения, например, для определения, является ли более высокая аффинность, например, в 2 раза выше, достаточно получить качественное измерение аффинности или для вывод об аффинности, например, по активности в функциональном анализе, например, в *in vitro* или *in vivo* анализе.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело включает тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 тяжелой цепи, CDR2 тяжелой цепи и CDR3 тяжелой цепи. В некоторых случаях CDR3 область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 111, 112 или 113 (табл. 1). Вариабельная область тяжелой цепи любого из анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать CDR1, содержащую последовательность по формуле $X_1YX_3MX_5$ (SEQ ID NO: 117), описанную в настоящем документе, и/или CDR2, содержащую последовательность по формуле $X_1IX_3PSGX_7X_8TX_{10}YX_{12}DSVKG$ (SEQ ID NO: 118), которая также описана в настоящем документе. В некоторых примерах анти-FXIIa антитело содержит CDR1 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 41-73 и 121 (табл. 1), и/или CDR2 тяжелой цепи, выбранную из SEQ ID NO: 74-110 и 122-124. В некоторых конкретных примерах вариабельная область тяжелой цепи анти-FXIIa антитела, описанного в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-39.

В табл. 1 приведены аминокислотные последовательности CDR тяжелой цепи для иллюстративных анти-FXIIa антител. Антитела, имеющие такие же области CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи, как в иллюстративных анти-FXIIa антителах, также входят в объем настоящего изобретения.

Таблица 1. Последовательности CDR тяжелой цепи анти-FXIIa антител

Иллюстративное антитело	CDR1	CDR2	CDR3
M0191-E09	WYSMH (SEQ ID NO: 41)	VIYPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 74)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-H11	QYVMH (SEQ ID NO: 42)	SIWPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO: 75)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0184-F12	WYVMH (SEQ ID NO: 43)	GIWPSGGRTKYADSVKG (SEQ ID NO: 76)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0292-D07	NYVMH (SEQ ID NO: 44)	SIWPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 77)	QRYRGPKYYYMDA (SEQ ID NO: 112)
M0182-D04	MYTMN (SEQ ID NO: 45)	RIYPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 78)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-F07	QYVMS (SEQ ID NO: 46)	RIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 79)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0183-C03	WYNMH (SEQ ID NO: 47)	YIYPSGGKTKYTDSVKG (SEQ ID NO: 80)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0183-H08	RYIMH (SEQ ID NO: 48)	SIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 81)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0183-D08	RYIMG (SEQ ID NO: 49)	SIYPSGGVTRYADSVKG (SEQ ID NO: 82)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-G03	QYVMV (SEQ ID NO: 50)	RIWPSGGKTTYADSVKG (SEQ ID NO: 83)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-C06	RYVMV (SEQ ID NO: 51)	RIYPSGGMTQYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-F01	WYNMA (SEQ ID NO: 52)	RIYPSGGMTQYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-A03	QYIMH (SEQ ID NO: 53)	SIYPSGGNTRYADSVKG (SEQ ID NO: 85)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-A01	HYVMH (SEQ ID NO: 54)	SIYPSGGLTKYADSVKG (SEQ ID NO: 86)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-H10	WYTMH (SEQ ID NO: 55)	SIYPSGGFTRYADSVKG (SEQ ID NO: 87)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0177-C12	FYHMH (SEQ ID NO: 56)	RIYPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 88)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0184-B04	FYSMH (SEQ ID NO: 57)	RIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 89)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0308-H03	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	SIWPSGGKTTYADSVKG (SEQ ID NO: 90)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-D02	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	SIWPSGGFTKYADSVKG (SEQ ID NO: 91)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-G07	FYNMH (SEQ ID NO: 59)	SIYPSGGVTRYADSVKG (SEQ ID NO: 92)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-F06	WYVMH (SEQ ID NO: 43)	SIYPSGGKTSYADSVKG (SEQ ID NO: 93)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-A04	PYIMH (SEQ ID NO: 60)	VIYPSGSKTNYADSVKG (SEQ ID NO: 94)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-F02	RYTMR (SEQ ID NO: 61)	SIWPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 95)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-B09	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	SIYPSGGLTRYADSVKG (SEQ ID NO: 96)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-G06	WYIMG (SEQ ID NO: 62)	YIYPSGGNTRYADSVKG (SEQ ID NO: 97)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0182-H01	RYVMH (SEQ ID NO: 63)	SIWPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 98)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0178-A08	FYIMG (SEQ ID NO: 64)	RIYPSGGATQYADSVKG (SEQ ID NO: 99)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0184-D01	FYVMG (SEQ ID NO: 65)	RIYPSGGLTQYADSVKG (SEQ ID NO: 100)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0177-A06	FYSMH (SEQ ID NO: 66)	RIYPSGGITSYADSVKG (SEQ ID NO: 101)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-E04	MYIMH (SEQ ID NO: 67)	SIYPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 102)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-H09	MYVMH (SEQ ID NO: 68)	SIYPSGGLTKYADSVKG (SEQ ID NO: 103)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-H04	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	RIYPSGGLTNYADSVKG (SEQ ID NO: 104)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-A03	WYVMQ (SEQ ID NO: 69)	SIYPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 102)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-G08	WYIMG (SEQ ID NO: 62)	RIYPSGGSTHYADSVKG (SEQ ID NO: 105)	QRYRGPRIYYIDA (SEQ ID NO: 113)
M0192-G05	QYTMV (SEQ ID NO: 70)	RIYPSGGVTQYADSVKG (SEQ ID NO: 106)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0183-B12	WYVMY (SEQ ID NO: 71)	RIYPSGGITHYADSVKG (SEQ ID NO: 107)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0308-F04	FYVML (SEQ ID NO: 72)	SIWPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 108)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0182-B04	WYVMQ (SEQ ID NO: 69)	YIYPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO: 109)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-F04	RYSMN (SEQ ID NO: 73)	GIYPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 110)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
X211-A01 (DX-4012)	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	SIWPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO: 75)	QRYRGPKYYYMDV (SEQ ID NO: 111)

Вариабельные области тяжелой цепи иллюстративных анти-FXIIa антител, перечисленных в таблице 1, приведены ниже (области CDR выделены полужирным шрифтом). В других вариантах осуществления HC CDR1 анти-FXIIa антитела может являться QYSMH (SEQ ID NO: 121), которая может присутствовать в комбинации с HC CDR2 из SEQ ID NO: 74 и/или с HC CDR3 из SEQ ID NO: 111. В других вариантах осуществления HC CDR2 анти-FXIIa антитела могут являться SIYPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 122), VIWPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 123) или VIYPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO: 124), которые могут присутствовать в комбинации с HC CDR1 из SEQ ID NO: 41 и/или HC CDR3 из SEQ

ID NO: 111. В еще одном варианте осуществления изобретения HC CDR2 анти-FXIIa антитела может являться SIWPSGGHTRYADSVHG (SEQ ID NO: 127), которая может присутствовать в комбинации с HC CDR1 из SEQ ID NO: 58 и/или HC CDR3 из SEQ ID NO: 111.

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0191-E09 (SEQ ID NO: 1):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYSMHWVRQAPGKGLEWVSVIYPSGGKTR
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-H11 (SEQ ID NO: 2):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGHTR
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0184-F12 (SEQ ID NO: 3):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMHWVRQAPGKGLEWVSGIWPSSGGRTK
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0292-D07 (SEQ ID NO: 4):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGKTK
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDAWGQGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0182-D04 (SEQ ID NO: 5):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYTMHWVRQAPGKGLEWVSRIPSSGGKTL
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M192-F07 (SEQ ID NO: 6):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMSWVRQAPGKGLEWVSRIPSSGGVTK
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0183-C03 (SEQ ID NO: 7):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYNMHWVRQAPGKGLEWVSYISPSSGGKTK
YTDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0183-H08 (SEQ ID NO: 8):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYIMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGVTK
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0183-D08 (SEQ ID NO: 9):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYIMGWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGVTR
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-G03 (SEQ ID NO: 10):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYNMVWVRQAPGKGLEWVSRIPSSGGKTT
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-C06 (SEQ ID NO: 11):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMWVRQAPGKGLEWVSRIPSSGMTQ
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTITVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-F01 (SEQ ID NO: 12):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYNMAWVRQAPGKGLEWVSR**IYPSGGMTQ**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0191-A03 (SEQ ID NO: 13):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYIMHWVRQAPGKGLEWVSS**IYPSGGNTK**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-A01 (SEQ ID NO: 14):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMHWVRQAPGKGLEWVSS**IYPSGGGTK**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0191-H10 (SEQ ID NO: 15):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYTMHWVRQAPGKGLEWVSS**IYPSGGFTR**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0177-C12 (SEQ ID NO: 16):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYHMHWVRQAPGKGLEWVSR**IYPSGGMTR**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0184-B04 (SEQ ID NO: 17):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYSMHWVRQAPGKGLEWVSR**IYPSGGVTK**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0308-H03 (SEQ ID NO: 18):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSS**IYPSGGKTT**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-D02 (SEQ ID NO: 19):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSS**IYPSGGFTK**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-G07 (SEQ ID NO: 20):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYNMHWVRQAPGKGLEWVSS**IYPSGGVTR**
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCTRQRYRGP**KYYYYMDVWGKGT**TVT**VSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-F06 (SEQ ID NO: 21):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSWYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGKTS
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-A04 (SEQ ID NO: 22):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSPIYIMHWVRQAPGKGLEWVSVIYPSGSKTN
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-F02 (SEQ ID NO: 23):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSRYTMRWVRQAPGKGLEWVSSIWPSSGMTR
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGQGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-B09 (SEQ ID NO: 24):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGLTR
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGQGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-G06 (SEQ ID NO: 25):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSWYIMGWVRQAPGKGLEWVSIYPSGGNTR
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0182-H01 (SEQ ID NO: 26):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSRYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSSGMTK
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0178-A08 (SEQ ID NO: 27):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSFYIMGWVRQAPGKGLEWVSRIPSSGATQ
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0184-D01 (SEQ ID NO: 28):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSFYVMGWVRQAPGKGLEWVSRIPSSGLTQ
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0177-A06 (SEQ ID NO: 29):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFSFYSMHWVRQAPGKGLEWVSRIPSSGITTS
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0191-
E04 (SEQ ID NO: 30):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**MYIMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGMTK**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0191-
H09 (SEQ ID NO: 31):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**MYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGLTK**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-
H04 (SEQ ID NO: 32):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**QYVMHWVRQAPGKLEWVSRIPSGGLTN**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-
A03 (SEQ ID NO: 33):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**SWYVMQWVRQAPGKLEWVSSIYPSGGMTK**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-
G08 (SEQ ID NO: 34):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**WYIMGWVRQAPGKLEWVSRIPSGGSTH**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPRIYYYIDAWGQTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0192-
G05 (SEQ ID NO: 35):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**QYTMVWVRQAPGKLEWVSRIPSGGVTQ**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0183-
B12 (SEQ ID NO: 36):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**SWYVMYWVRQAPGKLEWVSRIPSGGITH**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0308-
F04 (SEQ ID NO: 37):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**FYVMLWVRQAPGKLEWVSSIWPSGGVTK**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0182-
B04 (SEQ ID NO: 38):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**SWYVMQWVRQAPGKLEWVSYIPSGGHTK**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи M0310-
F04 (SEQ ID NO: 39):

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**RYSMNWVRQAPGKLEWVSGIYPSGGKTK**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Последовательность вариабельной области тяжелой цепи X211-
A01 (SEQ ID NO:125)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS**QYVMHWVRQAPGKLEWVSSIWPSGGHTR**
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTRQRYRGPKEYYYMDVWGKTTVTVSS

Настоящее изобретение также относится к вариантам зародышевой линии для любого из приведенных в качестве примера анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе. Вариант зародышевой линии содержит одну или несколько мутаций в каркасных областях относительно его родительского антитела в соответствующей последовательности зародышевой линии. Чтобы создать вариант зародышевой линии, последовательность вариабельной области тяжелой или легкой цепи родительского антитела или ее часть (например, последовательность каркасной области) может быть использована в качестве запроса в базе данных последовательностей антител зародышевой линии (например, www.bioinfo.org.uk/abs/, www.vbase2.org или www.imgt.org), чтобы определить соответствующую последовательность зародышевой линии, используемую родительским антителом и вариации аминокислотных остатков в одной или нескольких каркасных областях между последовательностью зародышевой линии и родительским антителом. Одна или несколько аминокислотных замен могут быть введены в родительское антитело на основании последовательности зародышевой линии для получения варианта зародышевой линии. Например, клон X211-A01 (DX-4012) представляет собой вариант зародышевой линии клона

M192-H11. Как описано в настоящем документе, анти-FXIIa антитело может иметь любую форму, включая, но не ограничиваясь ими, интактные (то есть, полноразмерные) антитела, антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv) и одноцепочечные антитела.

В некоторых вариантах осуществления изобретения тяжелая цепь любого из анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать константную область тяжелой цепи (CH) или ее участок (например, CH1, CH2, CH3 или их комбинацию). Константная область тяжелой цепи может иметь любое подходящее происхождение, например, принадлежать человеку, мыши, крысе или кролику. В одном конкретном примере, константная область тяжелой цепи происходит из IgG человека (гамма-тяжелой цепи). Один из примеров константной области тяжелой цепи антитела человека представлен ниже (SEQ ID NO: 119):

```

ASTKGPSVFP  LAPSSKSTSG  GTAALGCLVK  DYFPEPVTVS  WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS  GLYSLSSVVT  VPSSSLGTQT  YICNVNHKPS  NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP  PCPAPELLGG  PSVFLFPPKP  KDTLMISRTPE  EVTCVVVDVSV
HEDPEVKFNW  YVDGVEVHNA  KTKPREEQYN  STYRVVSVLT  VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA  LPAPIEKTIS  KAKGQPREPQ  VYTLPPSREE  MTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDI  AVEWESNGQP  ENNYKTTTPV  LDSDGSFFLY  SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV  MHEALHNHYT  QKSLSLSPG

```

Выделенные полужирным шрифтом/подчеркнутые остатки представляют собой остатки, в которые могут быть введены мутации для улучшения связывания с FcRn и увеличения времени полужизни в сыворотке.

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело содержит константную область тяжелой цепи из SEQ ID NO: 119. В качестве альтернативы, константная область тяжелой цепи антител, описанных в настоящем документе, может содержать один домен (например, CH1, CH2 или CH3) или комбинацию любых отдельных доменов из константной области (например, SEQ ID NO: 119).

При необходимости, анти-FXIIa антитело, описанное в настоящем документе, может содержать модифицированную константную область. Например, оно может содержать модифицированную константную область, которая является иммунологически инертной, например, не вызывает опосредованный комплементом лизис или не стимулирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). ADCC-активность может быть оценена с помощью способов, описанных в патенте США № 5500362. В других вариантах осуществления изобретения константная область модифицирована, как описано в Eur. J. Immunol. (1999) 29: 2613-2624; PCT-заявке № PCT/GB99/01441; и/или патентной заявке Великобритании № 9809951.8.

В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи, используемая в анти-FXIIa антителах, описанных в настоящем документе, может содержать мутации (например, замены аминокислотных остатков) для усиления требуемой характеристики антитела, например, повышения активности связывания с неонатальным рецептором Fc (FcRn) и, таким образом, увеличения времени полужизни антитела в сыворотке. Известно, что связывание с FcRn имеет решающее значение для поддержания гомеостаза антител и регулирования времени полужизни антител в сыворотке. Одна или несколько (например, 1, 2, 3, 4, 5 или большее число) мутаций (например, замен аминокислотных остатков) могут быть введены в константную область в подходящих местах (например, в CH2-области) для усиления связывания с FcRn и увеличения времени полужизни антитела. Такие мутации могут находиться в положении(ях), соответствующих позициям 145, 147 и/или 149 в последовательности SEQ ID NO: 119 (соответствуют позициям 252, 254 и 256 по системе нумерации, опубликованной в Rabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.). См. также Dall'Acqua et al., J.B.C., 2006, 281:23514-23524; Robbie et al., Antimicrob. Agents Chemother, 2013, 57(12): 6147; и Dall'Acqua et al., J. Immunol. 2002 169:5171-5180. Если используется константная область кроме SEQ ID NO: 119, то позиции, в которые могут быть введены мутации, могут быть определены путем выравнивания аминокислотной последовательности этой константной области с SEQ ID NO: 119, чтобы идентифицировать позиции, соответствующие представляющим интерес позициям (например, позициям 145, 147, или 149 в SEQ ID NO: 119). В качестве альтернативы такие позиции могут быть определены с помощью хорошо признанной системы нумерации, такой как система нумерации Кабата, указанная выше.

В некоторых примерах, замещающая мутация введена по аминокислотному остатку (например, остатку метионина) в позиции 252 (позиции 145 в SEQ ID NO: 119) константной области тяжелой цепи, например, замена M→Y. В некоторых примерах замещающая мутация введена в позиции 254 (позиции 147 в SEQ ID NO: 119) константной области тяжелой цепи, например, замена S→T. В некоторых примерах замещающая мутация введена в позиции 256 (позиции 149 SEQ ID NO: 119) константной области тяжелой цепи, например, T→E. В некоторых примерах треонин в позиции 256 мутирован до остатка глутаминовой кислоты. При желании, в константную область тяжелой цепи могут быть введены множественные мутации (например, аминокислотные замены), например, любое сочетание указанных выше за-

мен. В конкретном примере, модифицированная константная область тяжелой цепи, используемая в каком-либо из анти-FXIIa антител, может содержать аминокислотные замены в позициях 252, 254 и 256 (например, M252Y, S254T и T256E, также известные как YTE-вариант). См., например, Dall'Acqua et al., J.B.C., 2006, 281:23514-23524; Robbie et al., Antimicrob. Agents Chemother, 2013, 57 (12):6147; и Dall'Acqua et al., J. Immunol. 2002 169:5171-5180. Аминокислотная последовательность, приведенная ниже (SEQ ID NO: 120), представляет собой иллюстративную модифицированную константную область тяжелой цепи, способную лучше связываться с FcRn, за счет чего увеличивается время полужизни в сыворотке:

Иллюстративная последовательность YTE-варианта константной области тяжелой цепи (SEQ ID NO: 120):

```

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVKDRVEF
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLYITREP EVTCVVVDVSV
HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDDSGSFFLY SKLTVDKSRW
OOGNVFSCSV MHEALHNHYT OKSLSLSPG

```

Аминокислотные остатки, которые мутированы в последовательности SEQ ID NO: 120 относительно SEQ ID NO: 119, показаны полужирным шрифтом.

Любое из анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать легкую цепь, которая включает переменную область легкой цепи и, необязательно, константную область легкой цепи, которая может являться любой CL, известной в данной области. В некоторых примерах CL представляет собой легкую цепь каппа. В других примерах, CL представляет собой легкую цепь лямбда. Константные области тяжелой и легкой цепи антител хорошо известны в данной области, например, те, которые приведены в базе данных IMGT (www.imgt.org) или www.vbase2.org/vbstat.php, которые включены в данное описание путем ссылки.

Анти-FXIIa антитело, описанное в настоящем документе, может содержать переменную область легкой цепи, которая содержит CDR3 легкой цепи, приведенную как SEQ ID NO: 116 (см. табл. 2). В некоторых вариантах, переменная область легкой цепи анти-FXIIa антитела может дополнительно содержать CDR1-область легкой цепи, приведенную как SEQ ID NO: 114 (см. табл. 2) и/или CDR2 легкой цепи, приведенную как SEQ ID NO: 115 (см. табл. 2). Например, переменная область легкой цепи анти-FXIIa антитела может содержать CDR1 легкой цепи из SEQ ID NO: 114, CDR2 легкой цепи из SEQ ID NO: 115 и CDR3 легкой цепи из SEQ ID NO: 116. Например, переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В альтернативном варианте, переменная область легкой цепи представляет собой зародышевой вариант SEQ ID NO: 40, который может содержать одну или несколько мутаций в одной или нескольких каркасных областях в соответствующей последовательности зародышевой линии. Соответствующая последовательность зародышевой линии может быть определена способами, известными в данной области, и теми, которые описаны в настоящем документе.

Иллюстративная переменная область легкой цепи для анти-FXIIa антител представлена ниже (области CDR выделены полужирным шрифтом).

Иллюстративная переменная область легкой цепи для анти-FXIIa антител (SEQ ID NO: 40):

```
DIQMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSR
```

```
ASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEIK
```

Иллюстративная переменная область легкой цепи для анти-FXIIa антител (SEQ ID NO: 126)

```
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHLSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSR
```

```
ASGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEIK
```

Таблица 2. Последовательности CDR легких цепей анти-FXIIa антител

	CDR1	CDR2	CD3
Иллюстративное антитело	RSSQSLHLSNGYNYLD (SEQ ID NO: 114)	LGSNRAS (SEQ ID NO: 115)	MQALQTPWT (SEQ ID NO: 116)

В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело, описанное в настоящем документе, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 1-39; и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В других вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело, описанное в настоящем документе (например, X211-A01; оно же DX-4012), содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125 и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 126.

Также в объем настоящего изобретения входят функциональные варианты любого из иллюстративных анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе (например, 44 клон антител, описанные выше). В некоторых примерах осуществления анти-FXIIa антитело представляет собой функциональный вариант антитела, включающий переменную область тяжелой цепи, приведенную в любой из SEQ ID NO: 1-39, и переменную область легкой цепи, приведенную в SEQ ID NO: 40. Функциональный вари-

ант может содержать до 5 (например, 4, 3, 2 или 1) вариаций аминокислотных остатков в одной или нескольких CDR-областях антитела и связывает такой же эпитоп FXIIa с по существу аналогичной аффинностью (например, имея величину K_D такого же порядка). В одном примере, вариации аминокислотных остатков являются консервативными заменами аминокислотных остатков. В контексте настоящего изобретения "консервативная аминокислотная замена" относится к аминокислотной замене, которая не изменяет относительный заряд или размерные характеристики белка, в котором производится замена аминокислоты. Варианты могут быть получены в соответствии со способами изменения полипептидной последовательности, известными обычному специалисту в данной области техники, такими, которые можно найти в ссылках, которые объединяют такие способы, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., eds., Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989, или *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York. Консервативные аминокислотные замены включают замены, сделанные среди аминокислот в пределах следующих групп: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N и (g) E, D.

В некоторых вариантах осуществления анти-FXIIa антитело содержит CDR тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 80% (например, на 85, 90, 95 или 98%) идентичны любой одной последовательности CDR тяжелой цепи, приведенных в SEQ ID NO: 41-113, SEQ ID NO: 121-124 и SEQ ID NO: 127, и/или последовательности CDR легкой цепи, которые по меньшей мере на 80% (например, на 85, 90, 95 или 98%) идентичны по меньшей мере одной из соответствующих CDR легкой цепи, приведенных в SEQ ID NO: 114-116. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-FXIIa антитело содержит варируемую область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80% (например, на 85, 90, 95 или 98%) идентична варируемой области тяжелой цепи любой из SEQ ID NO: 1-39, и/или варируемую область легкой цепи, которая по меньшей мере на 80% (например, на 85, 90, 95 или 98%) идентична варируемой области легкой цепи, приведенной в SEQ ID NO: 40.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяется 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 (версия 2.0) из Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиск BLAST по белку может быть выполнен с помощью программы XBLAST (оценка=50, длина слова=3) для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных белковым молекулам, представляющим интерес. Если между двумя последовательностями имеются разрывы, может быть использован Gapped BLAST, описанный в Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25 (17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST могут быть использованы параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Кроме того, анти-FXIIa антитело может включать один или несколько других остатков, которые идентифицированы на основе кристаллических структур, обсуждаемых в примере 5 в настоящем документе, как участвующие во взаимодействии с С-цепью FXIIa. Эти остатки могут быть расположены в VH- или VL-цепи. Примеры включают T28, S30, Q31, W52, P53, S54, G55, G56, H57, R59, N74, R100, Y101, R102, G103, P104, K105, Y106, Y107 и Y108 в варируемой области тяжелой цепи и H31, N33, Y35, Y54, L55, N58 и T99 в варируемой области легкой цепи.

Также настоящее изобретение относится к антителам, мишенью которых являются определенные остатки в FXIIa. Антитело может преимущественно связываться с FXIIa, но не связываться с FXII. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, которое специфично связывается с FXIIa, взаимодействует с одним или несколькими остатками (например, по меньшей мере с 3, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45) С-цепи в FXIIa, включая L390, Y391, W392, G393, H394, S395, F396, C397, H412, C413, L414, Q415, D416, R432, N433, V456, Y458, H507, F509, E510, G511, A512, E513, Y515, D557, A558, C559, Q560, G561, D562, S563, I584, S585, W586, G587, S588, G589, C590, G591, D592 и G597. Эти остатки идентифицированы как взаимодействующие с одним или несколькими остатками в варируемой области тяжелой цепи и варируемой области легкой цепи анти-FXIIa антитела согласно кристаллическим структурам, описанным в примере 5 ниже.

Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO: 128) иллюстративного FXIIa человека приведена ниже и указанные выше остатки выделены полужирным шрифтом:

1 mrallllgfl lvslestlsi ppweapkehk ykaeehtvvl tvtgepchfp
 fqyhrqlyhk
 61 cthkgrpgpq pwcattpnfd qdqrwgycle pkkvkdhcsk hspcqqggtc
 vnmmsgphcl
 121 cpqhltgnhc qkekcfepql lrffhkneiw yrteqaavar cqckgpdahc
 qrlasqacrt
 181 npclhggrcl eveghrlchc pvgytgafcd vdtkascydg rglstyrklar
 ttlsgapcqp
 241 waseatyrnv taegarnwgl gghafcrnpd ndirpwcflv nrdrlsweyc
 dlaqcqtptq
 301 aapptpvspr lhvplmpaqp appkqppttr tppqsgtpga lpakreqpps
 ltrngplscg
 361 qrlrkslssm trvvgglval rgahpyiaa1 ywqhsfcags liapcwwlta
ahclqdrpap
 421 edltvvlqge rrnhscepq tlavrsyrhl eafspvsyqh dlallrlqed
 adgscallsp
 481 yvqpvclpsg aarpsettlc qvagwghafe gaeeyasflq eaqvpflsle
 rcsapdvhgs
 541 silpgmlcag fleggtdacc qdsggplvce dqaerlrtl qgiiswgsqc
qdrnkpgvyt
 601 dvayylawir ehtvs

Другие иллюстративные последовательности FXIIa могут включать в себя последовательности FXI-Ia человека, мыши или крысы, последовательность, которая на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична одной из этих последовательностей или их фрагменту.

"Взаимодействие" означает, что расстояние между двумя остатками в комплексе, образованном двумя связывающими партнерами, меньше заданного значения, например, $<6 \text{ \AA}$, $<4 \text{ \AA}$ или $<2 \text{ \AA}$. Например, взаимодействующий остаток в одном связывающем партнере может иметь по меньшей мере 1 атом в пределах заданного порогового значения (например, $<6 \text{ \AA}$, $<4 \text{ \AA}$ или $<2 \text{ \AA}$) от по меньшей мере 1 атома из остатка другого связывающего партнера на структуру комплекса. Взаимодействие не требует фактического связывания. Взаимодействующие остатки предложены в качестве участвующих в распознавании антигенов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, описанное в настоящем документе, связывает активный FXIIa человека по эпитопу, содержащему один или несколько из перечисленных выше остатков. "Эпитоп" относится к участку на соединении-мишени, который связывается антителом, таким как Fab-фрагмент или полноразмерное антитело. Эпитоп может быть линейным, составляя, как правило, 6-15 aa в длину. В альтернативном варианте эпитоп может быть конформационным.

В некоторых примерах осуществления изобретения антитело, которое специфично связывается с FXIIa, описанным в настоящем документе, связывает эпитоп, который содержит следующие сегменты из SEQ ID NO: 128: остатки 390-397, остатки 412-416, остатки 432-433, остатки 456-458, остатки 507-515, остатки 557-563 и/или остатки 584-592.

Получение анти-FXIIa антител

Антитела, способные связывать FXIIa, описанный в настоящем документе, могут быть получены любым способом, известным в данной области техники. См., например, Harlow и Lane (1998) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело, специфичное к антигену-мишени (например, FXIIa или его каталитическому домену), может быть получено с помощью обычной гибридомной технологии. Полноразмерный антиген-мишень или его фрагмент, необязательно, в сочетании с белком-носителем, таким как KLH, может быть использован для иммунизации животного-хозяина для получения антител, связывающихся с этим антигеном. Способ и схем иммунизации животного-хозяина обычно соответствуют хорошо известным стандартным способам образования и получения антител, как дополнительно описано в данном документе. Общие методы получения мышинных, гуманизированных и человеческих антител известны в данной области и описаны в настоящем документе. Предполагается, что с любым млекопитающим, включая человека, или с их антитело-продуцирующими клетками могут быть проведены манипуляции, чтобы они служили в качестве основы для получения гибридных клеточных линий млекопитающих, включая человека. Как правило, животному-хозяину вводят некоторое количество иммуногена внутрибрюшинно, внутримышечно, перорально, подкожно, внутривошвенно и/или внутрикожно, включая методы, описанные в настоящем документе.

Гибридомы могут быть получены из лимфоцитов и иммортализованных клеток миеломы с использованием общей методики гибридизации соматических клеток согласно Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497 или модифицированной методики по Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982).

Доступные линии миелом, включая, но не ограничиваясь этим X63-Ag8.653 и линии из Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, могут быть использованы в гибридизации. В общем, эти методики включают слияние клеток миеломы и лимфоидных клеток с использованием вещества, способствующего слиянию, такого как полиэтиленгликоль, или с использованием электричества, как хорошо известно специалистам в данной области техники. После слияния клетки отделяют от среды для слияния и выращивают в селективной ростовой среде, такой как гипоксантин-аминоптерин-тимидиновая (НАТ) среда, для того чтобы удалить негибридизированные родительские клетки. Любую из сред, описанных в настоящем документе, можно использовать для культивирования гибридом, которые секретируют моноклональные антитела. В качестве еще одной альтернативы методики слияния клеток можно использовать EBV-иммортиализованные В-клетки для получения моноклональных анти-FXIIa антител, описанных в настоящей заявке. Гибридомы размножают и субклонируют по мере необходимости, и супернатанты анализируют на анти-иммуногенную активность с помощью обычных процедур иммуноанализа (например, радиоиммуноанализа, ферментного иммуноанализа или флуоресцентного иммуноанализа).

Гибридомы, которые могут быть использованы в качестве источника антител, охватывают все производные и потомство клеток родительского гибрида, которые продуцируют моноклональные антитела, способные препятствовать активности FXIIa. Гибридомы, которые продуцируют такие антитела, могут быть выращены *in vitro* или *in vivo* с использованием известных процедур. Моноклональные антитела могут быть выделены из культуральной среды или жидкостей тела с помощью обычных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как осаждение сульфатом аммония, гель-электрофорез, диализ, хроматография и ультрафильтрация, по желанию. Примесная (нежелательная) активность (если таковая присутствует) может быть удалена, например, пропусканием препарата через адсорбенты из иммуногена, прикрепленного к твердой фазе, и элюцией или высвобождением желаемых антител от иммуногена. Популяцию антител (например, моноклональных антител) можно получить в результате иммунизации животного-хозяина антигеном-мишенью или его фрагментом, содержащим аминокислотную последовательность-мишень, конъюгированную с белком, который является иммуногенным у видов, подлежащих иммунизации, например, гемоцианином, сывороточным альбумином, бычьим тироглобулином или соевым ингибитором трипсина, с использованием бифункционального или дериватирующего агента, например малеимидобензоилсульфосукцинимидного эфира (для конъюгации через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутарового альдегида, янтарного ангидрида, SOCl или $R1N=C=NR$, где R и R1 являются различными алкильными группами.

При желании нуклеотидная последовательность представляющего интерес антитела (моноклонального или поликлонального, например, продуцируемого гибридомой), может быть определена секвенированием, и полинуклеотидная последовательность затем может быть клонирована в вектор для экспрессии или размножения. Последовательность, кодирующая представляющее интерес антитело, может сохраняться в векторе в клетке-хозяине, и клетки-хозяева затем могут быть размножены и заморожены для дальнейшего использования. В качестве альтернативы, полинуклеотидная последовательность может быть использована для генетических манипуляций для "гуманизации" антитела или для увеличения аффинности (созревания аффинности), или для изменения других характеристик антитела. Например, константная область может быть изменена, чтобы быть более похожей на константную область антитела человека, для того чтобы избежать иммунного ответа, если антитело используется в клинических испытаниях и при лечении человека. Может быть желательна генетически модифицировать последовательности антитела, чтобы получить более высокую аффинность к антигену-мишени и большую эффективность в отношении ингибирования активности FXIIa. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что в полинуклеотиде, кодирующем антитело, могут быть осуществлены одно или несколько изменений, при этом по-прежнему сохраняя специфичность связывания антитела с антигеном-мишенью.

В других вариантах осуществления изобретения полностью человеческие антитела могут быть получены с использованием коммерчески доступных мышей, которые были сконструированы для экспрессии определенных иммуноглобулинов человека. Трансгенные животные, которые были созданы для получения более желательных антител (например, полностью человеческих антител) или более сильного иммунного ответа, также могут быть использованы для получения гуманизированных или человеческих антител. Примерами такой технологии являются Xenomouse™ от Amgen, Inc. (Fremont, Calif.), а также NuMAb-Mouse™ и TC Mouse™ от Medarex, Inc. (Princeton, NJ). В другом альтернативном варианте, антитела могут быть получены рекомбинантно с помощью технологии фагового или дрожжевого дисплея. См., например, патенты США. №№ 5565332, 5580717, 5733743 и 6265150; и статью Winter et al., (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455. В качестве альтернативы, технология фагового дисплея (McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-553) может быть использована для получения антител и фрагментов антител человека *in vitro* из репертуара генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов неиммунизированных доноров.

Антигенсвязывающие фрагменты интактного антитела (полноразмерного антитела) могут быть получены обычными способами. Например, F(ab)₂-фрагменты могут быть получены путем расщепления пепсином молекулы антитела, а Fab-фрагменты могут быть получены восстановлением дисульфидных

мостиков в F(ab)₂-фрагментах.

Генетически сконструированные антитела, такие как гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела и биспецифичные антитела, могут быть получены с помощью, например, обычной рекомбинантной технологии. В одном примере, ДНК, кодирующая моноклональные антитела, специфичные к антигену-мишени, может быть легко выделена и секвенирована с использованием обычных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфично связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). Клетки гибридом служат в качестве предпочтительного источника такой ДНК. После выделения ДНК может быть перенесена в один или несколько векторов экспрессии, которыми затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые не продуцируют иммуноглобулины, чтобы получить синтез моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. См., например, публикацию РСТ № WO 87/04462. ДНК затем может быть модифицирована, например, путем замены последовательностями, кодирующими тяжелую и легкую цепи константных доменов антитела человека, гомологичных мышинных последовательностей (Morrison et al., (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851) или путем ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Таким образом, с помощью генной инженерии могут быть получены антитела, такие как "химерные" или "гибридные" антитела, которые специфично связывают антиген-мишень.

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

Способы конструирования гуманизированных антител также хорошо известны в данной области техники. См., например, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989). В одном примере, вариабельные области VH и VL родительского антитела животного подвергают трехмерному анализу в молекулярном моделировании, следуя способам, известным в данной области техники. Затем идентифицируют каркасные аминокислотные остатки, предположительно имеющие важное значение для формирования правильных структур CDR, с использованием того же молекулярного моделирования. Параллельно идентифицируют VH- и VL-цепи антитела человека, имеющие аминокислотные последовательности, которые гомологичны таковым из родительского антитела животного, из любой базы данных генов антител с помощью родительских VH- и VL-последовательностей в качестве запроса при поиске. Затем выбирают гены акцепторных VH и VL человека.

Области CDR в пределах выбранных акцепторных генов человека могут быть заменены областями CDR из родительского антитела животного или его функциональных вариантов. При необходимости, остатки в каркасных областях родительской цепи, которые согласно прогнозу имеют важное значение для взаимодействия с CDR (см. описание выше), могут быть использованы для замены соответствующих остатков в акцепторных генах человека.

Одноцепочечное антитело может быть получено с помощью рекомбинантной технологии путем связывания нуклеотидной последовательности, кодирующей вариабельную область тяжелой цепи, и нуклеотидной последовательности, кодирующей вариабельную область легкой цепи. Предпочтительно, чтобы между двумя вариабельными областями был включен гибкий линкер. В альтернативном варианте, методики, описанные для получения одноцепочечных антител (патенты США №№ 4946778 и 4704692), могут быть адаптированы для получения фаговой или дрожжевой scFv-библиотеки, и с помощью рутинных процедур из библиотеки могут быть идентифицированы scFv-клоны, специфичные к FxIIa. Положительные клоны могут быть подвергнуты дальнейшему скринингу для выявления тех, которые ингибируют активность FxIIa.

Антитела, полученные способом, известным в данной области техники и описанные в настоящем документе, могут быть охарактеризованы с использованием способов, хорошо известных в данной области. Например, один способ представляет собой определение эпитопа, с которым связывается антиген, или "картирование эпитопов". Существует множество способов, известных в данной области, для картирования и характеристики местоположения эпитопов на белках, включая решение кристаллической структуры комплекса антигена с антителом, конкурентные анализы, анализы с экспрессией фрагмента гена и анализы на основе синтетических пептидов, как описано, например, в главе 11 книги Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. В дополнительном примере картирование эпитопа может быть использовано для определения последовательности, с которой связывается антитело. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, т.е. содержаться в одном отрезке аминокислот, или может представлять собой конформационный эпитоп, образованный трехмерным взаимодействием аминокислот, которые необязательно содержатся в одном отрезке (линейной последовательности первичной структуры). Пептиды различной длины (например, по меньшей мере 4-6 аминокислот в длину) могут быть выделены или синтезированы (например, рекомбинантно) и использованы для анализов связывания с антителом. В другом примере эпитоп, с которым связывается антитело, может быть определен в систематическом скрининге с использованием перекрывающихся пептидов, полученных из последовательности антигена-мишени, и определения связывания с ан-

тителом. В анализах с использованием экспрессии фрагментов генов, открытую рамку считывания, кодирующую антиген-мишень, фрагментируют случайным образом или с помощью определенных генетических конструкций, и определяют реакционную способность проэкспрессированных фрагментов антигена с антителом, подлежащим исследованию. Фрагменты генов могут, например, быть получены с помощью ПЦР, а затем транскрибированы и транслированы в белок *in vitro* в присутствии радиоактивно-меченых аминокислот. Связывание антитела с радиоактивно-мечеными фрагментами антигена затем определяют с помощью иммунопреципитации и гель-электрофореза. Некоторые эпитопы также могут быть идентифицированы с использованием больших библиотек случайных пептидных последовательностей, представляемых на поверхности фаговых частиц (фаговых библиотек). В качестве альтернативы, ограниченная библиотека перекрывающихся пептидных фрагментов может быть проверена на связывание с тестируемым антителом в простых анализах связывания. В качестве дополнительного примера могут быть выполнены мутагенез антигенсвязывающего домена, эксперименты по обмену доменов и аланин-сканирующий мутагенез для того, чтобы идентифицировать остатки требуемые, достаточные, и/или необходимые для связывания эпитопа. Например, эксперименты по обмену доменов могут быть выполнены с использованием мутанта антигена-мишени, в котором различные фрагменты полипептида FXIIa были заменены последовательностями из близкородственного, но антигенно отличающегося белка (например, другого представителя семейства нейротрофинов). Путем оценки связывания антитела с мутантным FXIIa может быть оценена важность конкретного фрагмента антигена для связывания антитела.

В альтернативном варианте могут быть проведены конкурентные анализы с использованием других антител, которые, как известно, связываются с тем же антигеном, для того чтобы определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в данной области.

В некоторых примерах анти-FXIIa антитело получают с помощью рекомбинантной технологии, как проиллюстрировано ниже.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепь анти-FXIIa антитела, описанного в настоящем документе, могут быть клонированы в один вектор экспрессии, причем каждая нуклеотидная последовательность функционально связана с подходящим промотором. В одном примере, каждая из нуклеотидных последовательностей, кодирующих вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, функционально связана с отдельным промотором. В качестве альтернативы, нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь и легкую цепь, могут быть функционально связаны с одним промотором, так что тяжелая и легкая цепи экспрессируются с одного промотора. При необходимости между последовательностями, кодирующими тяжелую цепь и легкую цепь, может быть вставлен внутренний сайт связывания рибосомы (IRES).

В некоторых примерах нуклеотидные последовательности, кодирующие две цепи антитела, клонируют в два вектора, которые могут быть введены в одни или разные клетки. Когда две цепи экспрессируются в разных клетках, каждая из них может быть выделена из экспрессирующих их клеток-хозяев, и выделенные тяжелая и легкая цепи могут быть смешаны и проинкубированы в подходящих условиях, способствующих образованию антител.

В общем, нуклеотидные последовательности, кодирующие одну или все цепи антитела, могут быть клонированы в подходящий вектор экспрессии, функционально связанными с соответствующим промотором, с использованием способов, известных в данной области техники. Например, нуклеотидная последовательность и вектор могут быть обработаны в подходящих условиях ферментом рестрикции, чтобы создать комплементарные концы на каждой молекуле, которые могут образовывать пару друг с другом и соединяться друг с другом с помощью лигазы. В качестве альтернативы, с концами гена могут быть лигированы синтетические нуклеотидные линкеры. Эти синтетические линкеры содержат нуклеотидные последовательности, которые соответствуют конкретному сайту рестрикции в векторе. Выбор векторов экспрессии/промотора будет зависеть от типа клеток-хозяев, используемых для продукции антител.

Для экспрессии антител, описанных в настоящем документе могут быть использованы различные промоторы, включая, но не ограничиваясь этим, промежуточный ранний промотор цитомегаловируса (CMV), вирусные LTR, такие как LTR вируса саркомы Рауса, HIV-LTR, HTLV-1 LTR, ранний промотор вируса 40 обезьян (SV40), LacUV5-промотор из *E.coli* и промотор тирозинкиназы (tk) вируса простого герпеса.

Также могут быть использованы регулируемые промоторы. Такие регулируемые промоторы включают промоторы, в которых используется *lac*-репрессор из *E.coli* в качестве модулятора транскрипции для регуляции транскрипции с несущих *lac*-оператор промоторов из клеток млекопитающих [Brown, M. et al., *Cell*, 49:603-612 (1987)], промоторы, в которых используется тетрациклиновый репрессор (tetR) [Gossen, M., and Bujard, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551 (1992); Yao, F. et al., *Human Gene Therapy*, 9:1939-1950 (1998); Shockelt, P., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6522-6526 (1995)]. Другие системы включают димер FK506, VP 16 или р65 с использованием астрадиола, RU486, дифенолмурислеона или рапамидина. Индуцируемые системы доступны от Invitrogen, Clontech и Ariad.

Можно использовать регулируемые промоторы, которые включают репрессор с опероном. В одном

варианте осуществление *lac*-репрессор из *E. coli* может функционировать как транскрипционный модулятор, чтобы регулировать транскрипцию с несущих *lac*-оператор промоторов из клеток млекопитающих [M. Brown et al., *Cell*, 49:603-612 (1987)]; Gossen и Bujard (в 1992 г.) [M. Gossen et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)] объединили тетрациклиновый репрессор (*tetR*) с активатором транскрипции (*VP-16*), чтобы создать слитый белок *tetR* и активатора транскрипции в клетках млекопитающих, τ Gal (*tetR-VP 16*), с несущим *tetO* минимальным промотором, полученным из основного немедленного раннего промотора цитомегаловируса человека (*HCMV*), чтобы создать систему оператора *tetR-tet* для контроля экспрессии генов в клетках млекопитающих. В одном варианте осуществления изобретения используется индуцируемый тетрациклином переключатель. Тетрациклиновый репрессор (*tetR*) в одиночку, а не слитые производные *tetR* и транскрипционного фактора клеток млекопитающих, может функционировать как мощный транс-модулятор для регуляции экспрессии генов в клетках млекопитающих, когда тетрациклиновый оператор правильно расположен ниже ТАТА-элемента в промоторе *CMVIE* (Yao et al., *Human Gene Therapy*). Одно конкретное преимущество этого индуцируемого тетрациклином переключателя является то, что он не требует использования слитого белка тетрациклинового репрессора и транс-активатора или репрессора млекопитающих, который в некоторых случаях может быть токсичным для клеток (Gossen et al., *Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992); Shockett et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6522-6526 (1995)), чтобы обеспечить эффект регуляции транскрипции.

Кроме того, вектор может содержать, например, некоторые или все из следующих элементов: селективный маркерный ген, такой как ген неомидина для селекции стабильных трансфектантов или временных трансфектантов в клетках млекопитающих;

последовательность энхансера/промотора из немедленного раннего гена цитомегаловируса человека для высокого уровня транскрипции; сигналы терминации транскрипции и процессинга РНК из SV40 для стабильности мРНК; точку начала репликации из SV40 и *ColE1* для правильной эписомальной репликации; внутренние сайты связывания рибосом (*IRES*), универсальные множественные сайты клонирования; и T7- и SP6-промоторы для транскрипции *in vitro* смысловой и антисмысловой РНК. Подходящие векторы и способы получения векторов, содержащих трансгены, хорошо известны и доступны в данной области.

Примеры сигналов полиаденилирования, пригодных для применения на практике способов, описанных в настоящем документе, включают, но не ограничиваются ими, сигнал полиаденилирования коллагена I человека, сигнал полиаденилирования коллагена II человека и сигнал полиаденилирования SV40.

Один или несколько векторов (например, векторов экспрессии), содержащих нуклеиновые кислоты, кодирующие любое из антител, могут быть введены в подходящие клетки-хозяева для получения антител. Клетки-хозяева могут культивироваться в подходящих условиях для экспрессии антитела или любой его полипептидной цепи. Такие антитела или их полипептидные цепи могут быть извлечены из культивируемых клеток (например, из клеток или культурального супернатанта) с помощью обычного способа, например, аффинной очистки. При необходимости, полипептидные цепи антитела можно инкубировать в подходящих условиях в течение подходящего периода времени, позволяющих продукцию антител.

В некоторых вариантах осуществления изобретения способы получения антитела, описанные в настоящем документе, включают рекомбинантный вектор экспрессии, который кодирует тяжелую цепь и легкую цепь анти-FXIIa антитела, также описанного в настоящем документе. Рекомбинантный вектор экспрессии может быть введен в подходящую клетку-хозяина (например, в клетку *dhfr-CHO*-) обычным способом, например, опосредованной фосфатом кальция трансфекции. Положительно трансформированные клетки-хозяева можно отобрать и культивировать в подходящих условиях, позволяющих экспрессию двух полипептидных цепей, образующих антитела, которые могут быть выделены из клеток или из культуральной среды. При необходимости, эти две цепи, выделенные из клеток-хозяев, можно инкубировать в подходящих условиях, позволяющих образование антител.

В одном примере предложены два рекомбинантных вектора экспрессии - один, кодирующий тяжелую цепь анти-FXIIa антитела, и другой, кодирующий легкую цепь анти-FXIIa антитела. Оба рекомбинантных вектора экспрессии могут быть введены в подходящую клетку-хозяина (например, в клетку *dhfr-CHO*) обычным способом, например, опосредованной фосфатом кальция трансфекции. В качестве альтернативы, каждый из векторов экспрессии может быть введен в подходящие клетки-хозяева. Положительно трансформированные клетки-хозяева можно отобрать и культивировать в подходящих условиях, позволяющих экспрессию двух полипептидных цепей. Когда два вектора экспрессии вводят в одни клетки-хозяева, продуцируемые в них антитела могут быть выделены из клеток-хозяев или из культуральной среды. Если необходимо, из клеток-хозяев или из культуральной среды могут быть выделены полипептидные цепи, а затем проинкубированы в подходящих условиях, способствующих образованию антител. Когда два вектора экспрессии вводят в различные клетки-хозяева, каждая из цепей может быть выделена из соответствующих клеток-хозяев или из соответствующей культуральной среды. Эти две полипептидные цепи затем можно проинкубировать в условиях, позволяющих образование антител.

Стандартные методы молекулярной биологии используются для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и

выделения антител из культуральной среды. Например, некоторые антитела могут быть выделены с помощью аффинной хроматографии на носителе с белком А или белком G.

Любая из нуклеиновых кислот, кодирующих тяжелую цепь, легкую цепь или обе цепи анти-FXIIa антитела, описанного в настоящем документе, векторы (например, векторы экспрессии), содержащие эти нуклеиновые кислоты, и клетки-хозяева, содержащие векторы, входят в объем настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции

Антитела, а также кодирующие их нуклеиновые кислоты или наборы нуклеиновых кислот, векторы, их содержащие, или клетки-хозяева, содержащие векторы, описанные в настоящем документе, могут быть смешаны с фармацевтически приемлемым носителем (вспомогательным веществом) с получением фармацевтической композиции для применения для лечения целевого заболевания. "Приемлемый" означает, что носитель должен быть совместим с действующим ингредиентом композиции (и, предпочтительно, способен стабилизировать действующий ингредиент) и не быть вредным для субъекта, подлежащего лечению. Фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества (носители), включая буферы, хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover.

Фармацевтические композиции для использования в способах по настоящему изобретению могут включать фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы в виде лиофилизированных составов или водных растворов. (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и могут включать буферы, такие как фосфатный, цитратный и из других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехин, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (короче примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстран; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; образующие соль противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы цинка с белком); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG).

В некоторых примерах осуществления изобретения фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, включает липосомы, содержащие антитела (или кодирующие их нуклеиновые кислоты), которые могут быть получены способами, известными в данной области техники, например, как описано в Epstein, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); и в патентах США №№ 4485045 и 4544545. Липосомы с повышенным временем нахождения в крови описаны в патенте США № 5013556. Особенно подходящие липосомы могут быть получены с помощью метода выпаривания в обратной фазе с использованием липидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-derivatизированный фосфатидилэтаноламин (PEG-PE). Липосомы экстрадируют через фильтры с определенным размером пор, получая липосомы требуемого диаметра.

Антитела или кодирующие их нуклеиновые кислоты могут быть также заключены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или путем межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и полиметилметакрилатные микрокапсулы, соответственно; в коллоидные системы доставки лекарственных средств (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методики известны в данной области, см., например, Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing (2000).

В других примерах, фармацевтическая композиция, описанная в настоящем документе, может быть изготовлена в формате с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, где матрицы представляют собой формованные изделия, например, пленки или микрокапсулы. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-7-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DE-ROT™ (микросферы для инъекций, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и лейпролидацетата), ацетат-изобутиратсахарозу и поли-D(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Фармацевтические композиции, которые будут использоваться для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается с помощью, например, фильтрации через стерильные фильтрующие

мембраны. Терапевтические композиции антител обычно помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например мешок для внутривенных растворов или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожных инъекций.

Фармацевтические композиции, описанные в настоящем документе, могут быть представлены в виде стандартных лекарственных форм, таких как таблетки, пилюли, капсулы, порошки, гранулы, растворы, суспензии или суппозитории для перорального, парентерального или ректального введения, либо введения путем ингаляции или инсуффляции.

Для получения твердых композиций, таких как таблетки, основной действующий ингредиент может быть смешан с фармацевтическим носителем, например, стандартными ингредиентами для таблетирования, такими как кукурузный крахмал, лактоза, сахароза, сорбит, тальк, стеариновая кислота, стеарат магния, дикальцийфосфат или различные камеди, и другими фармацевтическими разбавителями, например, водой, с образованием твердой предварительной композиции, содержащей гомогенную смесь соединения по настоящему изобретению или его нетоксичной фармацевтически приемлемой соли. Указание на то, что эти предварительные композиции являются гомогенными, означает, что действующий ингредиент равномерно распределен по всей композиции, так что композицию можно легко разделить на равноэффективные единицы лекарственных форм, таких как таблетки, пилюли и капсулы. Эту твердую предварительную композицию затем разделяют на единичные лекарственные формы описанного выше типа, содержащие от 0,1 до примерно 500 мг действующего ингредиента по настоящему изобретению. Таблетки или пилюли новой композиции могут быть покрыты оболочкой или скомпонованы иным образом, чтобы обеспечить лекарственную форму, дающую преимущество пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля могут содержать внутреннюю дозу и наружную дозу компонента, причем последняя является оболочкой для первого. Два компонента могут быть разделены энтеросолюбильным слоем, который препятствует разрушению в желудке и позволяет внутреннему компоненту проходить неповрежденным в двенадцатиперстную кишку или задерживает его высвобождение. Для таких энтеросолюбильных слоев или оболочек могут быть использованы различные материалы, включая ряд полимерных кислот и смеси полимерных кислот с такими материалами, как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Подходящие поверхностно-активные вещества включают, в частности, неионные агенты, такие как полиоксиэтиленсорбитаны (например, Tween™ 20, 40, 60, 80 или 85) и другие сорбитаны (например, Span™ 20, 40, 60, 80 или 85). Композиции с поверхностно-активным веществом будут обычно содержать от 0,05 до 5% поверхностно-активного вещества, и его содержание может находиться в диапазоне от 0,1 до 2,5%. Следует иметь в виду, что при необходимости могут быть добавлены другие ингредиенты, например, маннит или другие фармацевтически приемлемые носители.

Подходящие эмульсии могут быть получены с использованием коммерчески доступных жировых эмульсий, таких как Intralipid™, Liposyn™, Infonutrol™, Lipofundin™ и Lipiphysan™. Действующий ингредиент может быть либо растворен в предварительно смешанной эмульсионной композиции или, в альтернативном варианте, он может быть растворен в масле (например, соевом масле, сафлоровом масле, хлопковом масле, кунжутном масле, кукурузном масле или миндальном масле), а эмульсия образуется при смешивании с фосфолипидом (например, яичными фосфолипидами, соевыми фосфолипидами или соевым лецитином) и водой. Следует иметь в виду, что для регуляции тоничности эмульсии могут быть добавлены другие ингредиенты, например, глицерин или глюкоза. Подходящие эмульсии, как правило, содержат до 20% масла, например, от 5 до 20%. Жировая эмульсия может содержать капельки жира от 0,1 до 1,0 μm , в частности, от 0,1 до 0,5 μm , и имеет pH в диапазоне от 5,5 до 8,0.

Эмульсионные композиции могут представлять собой композиции, которые получают смешиванием антитела с Intralipid™ или его компонентами (соевым маслом, яичными фосфолипидами, глицерином и водой).

Фармацевтические композиции для ингаляции или инсуффляции включают растворы и суспензии в фармацевтически приемлемых водных или органических растворителях, или их смесях, либо порошки. Жидкие или твердые композиции могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, как изложено выше. В некоторых вариантах осуществления композиции вводятся пероральным или назальным респираторным способом для локального или системного эффекта.

Композиции в предпочтительно стерильных фармацевтически приемлемых растворителях могут распыляться с использованием газов. Распыляемые растворы можно вдыхать непосредственно из распыляющего устройства (небулайзера), или же небулайзер может быть соединен с лицевой маской, камерой или дыхательной машиной с положительным давлением. Раствор, суспензия или порошковая композиция могут вводиться, предпочтительно перорально или назально, из устройств, которые доставляют препарат соответствующим образом.

Способы лечения

Любое из антител, а также кодирующих их нуклеиновых кислот или наборов нуклеиновых кислот, содержащих их векторов или содержащих векторы клеток-хозяев, описанных в настоящем документе, являются полезными для лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с aberrантной акти-

вазией контактной системы, включая заболевания, связанные с активацией контактной системы, заболевания, связанный с aberrантной активацией контактной системы (например, НАО), или глазные заболевания.

Для практического применения способа, описанного в данном документе, эффективное количество фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, может быть введено нуждающемуся в лечении субъекту (например, человеку) подходящим путем, таким как внутривенное введение, например, в виде болуса или непрерывной инфузии, в течение определенного периода времени, внутримышечно, внутривнутрибрюшинно, интрацереброспинально, подкожно, внутрисуставно, интрасиновиально, интра-текально, перорально, ингаляционно или местно. Для введения подходят коммерчески доступные небулайзеры для жидких композиций, включая струйные и ультразвуковые небулайзеры. Жидкие препараты могут распыляться напрямую, а лиофилизированный порошок можно распылять после восстановления. В альтернативном варианте, антитело, описанное в настоящем документе, может подаваться в виде аэрозоля с использованием состава с фторуглеродами и дозирующего ингалятора, или антитело можно вдыхать в виде лиофилизированного и измельченного порошка.

Субъектом, подлежащим лечению способами, описанными в настоящем документе, может быть млекопитающее, более предпочтительно, человек. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс. Человек, который нуждается в лечении, может быть представлять собой пациента, который имеет целевое заболевание или расстройство, который входит в группу риска по ним, или предположительно имеет такое заболевание, как наследственный ангиоотек (НАО), тромбоз или глазные болезни. Субъект, имеющий целевое заболевание или расстройство, может быть идентифицирован с помощью обычного медицинского обследования, например, лабораторных анализов, исследований функций органов, КТ или УЗИ. Субъект, у которого подозревается наличие любого такого целевого заболевания или расстройства, может иметь один или несколько симптомов заболевания или расстройства. Субъект из группы риска по заболеванию/расстройству может являться субъектом, имеющим один или несколько факторов риска этого заболевания или расстройства.

Способы и композиции, описанные в настоящем документе, могут быть использованы для лечения любого заболевания или расстройства, ассоциированного с активацией контактной системы и/или рКa1-сигнальных путей. В некоторых вариантах осуществления изобретения целевым заболеванием является тромбоз, включая тромбоз, ассоциированный с мерцательной аритмией, тромбозом глубоких вен, эмболией легочной артерии, инсультом, или другим артериальным или венозным тромбозом. Тромбоз (например, венозный тромбоз или артериальный тромбоз) относится к образованию тромбов внутри кровеносного сосуда, что может препятствовать потоку крови в системе кровообращения. Субъекты с тромбозом или имеющие риск тромбоза, могут быть идентифицированы с помощью обычных медицинских процедур.

В других вариантах осуществления изобретения, заболеванием, которое можно лечить с помощью анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, может являться заболевание, ассоциированное с калликреиновой системой (например, рKа1-системой), включая, но не ограничиваясь этим, макулярный отек, диабетическую ретинопатию, гипертоническую ретинопатию, возрастную макулярную дегенерацию и окклюзию вены сетчатки. Примеры заболеваний или нарушений, ассоциированных с активацией контактной системы, включают, без ограничения, ревматоидный артрит, остеоартрит, псориаз, системную красную волчанку, системный волчаночный эритематозный нефрит, системный мастоцитоз, подагру, кишечные заболевания, мукозит полости рта, невропатическую боль, воспалительную боль, стеноз позвоночного канала, дегенеративные заболевания позвоночника, артериальный или венозный тромбоз, послеоперационный илеус, аневризму аорты, васкулит, отеки, приобретенный ангионевротический отек, идиопатический ангионевротический отек, анафилактический шок, идиопатический анафилактический шок, отек головного мозга, эмболию легочной артерии, инсульт, свертываемость на желудочковых вспомогательных устройствах или стентах, свертываемость крови, ассоциированную с использованием полостных катетеров или периферически вставленных центральных катетеров, свертываемость крови, ассоциированную с использованием устройства для экстракорпоральной мембранной оксигенации, свертываемость, ассоциированную с использованием трансплантата или фистулы для диализа, травму головы или отек тканей мозга вокруг опухоли, сепсис, острый инфаркт средней мозговой артерии (МСА), ишемические события (инсульт), рестеноз (например, после пластической операции на сосудах) или ожоги.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заболеванием, которое можно лечить с помощью анти-FXIIa антител, описанных в настоящем документе, является глазное заболевание, связанное с активацией контактной системы, включая, но не ограничиваясь ими, макулярный отек, диабетическую ретинопатию, гипертоническую ретинопатию, возрастную дегенерацию желтого пятна и окклюзию вены сетчатки.

В одном примере, заболеванием или состоянием, которое включает активацию контактной системы, является наследственный ангиоотек (НАО). Наследственный ангиоотек (НАО) также известен как "отек Квинке", дефицит ингибитора C1-эстеразы, дефицит ингибитора C1 и наследственный ангионевротиче-

ский отек (НАНО). НАО характеризуется повторяющимися приступами тяжелых отеков (ангиоотек), которые могут затрагивать, например, конечности, лицо, половые органы, желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути. Симптомы НАО включают, например, увеличение объема рук, ног, губ, глаз, языка и/или горла; закупорку дыхательных путей, которая может включать отек горла и внезапную хрипоту; повторяющиеся эпизоды спастических болей в животе без видимой причины; и/или отек кишечника, который может быть серьезным и может привести к спастическим болям в животе, рвоте, обезвоживанию, диарее, боли и/или шоку. У примерно одной трети индивидуумов с таким НАО развивается не вызывающая зуд сыпь, называемая мигрирующей эритемой (*erythema marginatum*) во время приступа.

Отек в дыхательных путях может быть опасен для жизни и может привести к смерти у некоторых пациентов. Показатели смертности оцениваются в 15-33%. НАО является причиной примерно 15000-30000 визитов в отделения неотложной помощи в год.

Травма или стресс, например, стоматологические процедуры, болезни (например, вирусные заболевания, такие как простуда и грипп), менструация и операции, могут спровоцировать отек Квинке. Для предупреждения острых приступов НАО пациенты могут попытаться избежать определенных стимулов, которые ранее вызвали приступы. Однако во многих случаях приступ возникает без известного триггера. Как правило, симптомы НАО впервые появляются в детстве и ухудшаются в период полового созревания. В среднем, у не получающих лечения людей приступы случаются каждые 1-2 недели, и большинство эпизодов продолжается примерно 3-4 дня (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema).

Частота и продолжительность приступов сильно различаются у людей с наследственным ангиоотекотом, даже среди людей в одной семье.

Существует три типа НАО, известные как I, II и III типы. Подсчитано, что НАО встречается с частотой 1:50 000 человек, на I тип приходится около 85% случаев, на II тип приходится около 15% случаев, и III тип встречается очень редко. III тип является наиболее поздно описанным видом, и первоначально считалось, что он возникает только у женщин, но были выявлены семьи с заболевшими мужчинами.

НАО наследуется по аутосомно-доминантному типу, например заболевший может унаследовать мутацию от одного пораженного родителя. Также в гене могут возникнуть новые мутации, и, таким образом, НАО может также возникнуть у людей без истории болезни в их семье. Подсчитано, что 20-25% случаев НАО являются результатом новой спонтанной мутации.

Мутации в гене *SERPINC1* вызывают наследственный ангиоотек I и II типа. Ген *SERPINC1* необходим для продукции C1-ингибиторного белка, который очень важен для контроля воспаления. C1-ингибитор блокирует активность некоторых белков, усиливающих воспаление. Мутации, которые вызывают I тип наследственного ангиоотека, приводят к снижению уровня ингибитора C1 в крови. В отличие от этого мутации, которые вызывают II тип, приводят к продукции ингибитора C1, который функционирует неправильно. Без надлежащего уровня функционального ингибитора C1 генерируется избыточное количество брадикинина. Брадикинин способствует воспалению, увеличивая утечку жидкости через стенки кровеносных сосудов в ткани тела. Избыточное накопление жидкости в тканях тела вызывает отеки, наблюдаемые у индивидуумов с наследственным ангиоотекотом I и II типа.

Мутации в гене *F12* ассоциированы с некоторыми случаями III типа наследственного ангиоотека, также известного как НАО с нормальным ингибитором C1. Ген *F12* необходим для коагуляции FXII. Кроме важной роли в процессе свертывания крови (коагуляции), фактор XII также является важным стимулятором воспаления и участвует в производстве брадикинина. Некоторые мутации в гене *F12* приводят к продукции фактора XII с повышенной активностью. В результате образуется большее количество брадикинина, и стенки кровеносных сосудов становятся более негерметичными, что приводит к отекам. Причина других случаев III типа наследственного ангиоотека остается неизвестной. Мутации в одном или нескольких пока еще неизвестных генах могут отвечать за патологию в этих случаях.

НАО может быть похож на другие формы ангионевротического отека, возникающего в результате аллергии или других патологических причин, но он существенно отличается по причине и по лечению. Когда наследственный ангиоотек диагностируется как аллергия, его чаще всего лечат антигистаминными средствами, стероидами и/или эпинефрином, которые, как правило, неэффективны при НАО, хотя эпинефрин может использоваться при угрожающей жизни реакции. Неправильная диагностика также приводит к ненужному исследовательскому хирургическому вмешательству у пациентов с вздутием живота, а у некоторых пациентов с НАО боль в животе неправильно диагностируется как психосоматическая.

Симптомы НАО можно оценить, например, с помощью опросников, например, опросников, которые заполняются пациентами, врачами или членами семьи. Такие опросники известны в данной области техники и включают, например, визуальную аналоговую шкалу. См., например, McMillan, C.V. et al. Patient. 2012; 5 (2):113-26.

Используемый в данном описании термин "эффективное количество" относится к количеству каждого действующего агента, необходимого для терапевтического эффекта у субъекта, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими другими действующими агентами. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапевтический эффект снижает активность FXIIa, снижает количество rKall или брадикинина или снижает вазодилатацию. Ингибиторные антитела, которые специфично связывают

FXIIa, но не связывают FXII, могут иметь меньшую эффективную дозу, чем ингибиторные антитела, которые также связывают FXII. Определение того, дает ли количество антитела терапевтический эффект, будет очевидно специалисту в данной области техники. Эффективные количества варьируются, что известно специалистам в данной области техники, в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных характеристик пациента, включая возраст, физическое состояние, размер, пол и вес, продолжительности лечения, характера сопутствующей терапии (если таковая присутствует), конкретного пути введения и аналогичных факторов, известных практикующему врачу. Эти факторы хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть определены с помощью рутинных экспериментов. В общем, предпочтительно использовать максимальную дозу отдельных компонентов или их комбинации, а именно, самую высокую дозу, безопасную с медицинской точки зрения.

Эмпирические параметры, такие как время полужизни, как правило, учитываются при определении дозы. Например, могут использоваться антитела, которые совместимы с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела, чтобы увеличить время полужизни антитела и предупредить атаку на антитело иммунной системы хозяина. Частота введения может быть определена и скорректирована в течение курса лечения и, как правило, но не обязательно, исходя из успеха лечения и/или подавления, и/или ослабления течения, и/или задержки развития целевого заболевания или расстройства. В альтернативном варианте могут подойти составы с непрерывным замедленным высвобождением антител. Различные составы и устройства для замедленного высвобождения хорошо известны в данной области техники.

В одном примере, дозы для антитела, описанного в настоящем документе, могут быть определены эмпирически у индивидуумов, которым один или несколько раз вводили антитела. Индивидуумам дают добавочные дозы антагониста. Для того, чтобы оценить эффективность антагониста, необходимо наблюдать за показателями заболевания или расстройства.

В общем, для введения любого из антител, описанных в настоящем документе, начальная доза может составлять около 2 мг/кг. Для целей настоящего изобретения типичная суточная доза может варьировать от примерно любого из 0,1 мкг/кг до 3 мкг/кг, 30 мкг/кг, 300 мкг/кг, 3 мг/кг, 30 мг/кг, 100 мг/кг или большего количества в зависимости от указанных выше факторов. При многократном введении в течение нескольких дней или большего времени, в зависимости от состояния лечение продолжают до желаемого подавления симптомов или пока не будут достигнуты терапевтические показатели, достаточные для облегчения целевого заболевания или расстройства, или его симптома. Иллюстративный режим дозирования включает введение начальной дозы около 2 мг/кг с последующим еженедельным введением поддерживающей дозы около 1 мг/кг антитела, или с последующим введением поддерживающей дозы около 1 мг/кг каждые две недели. Однако другие схемы лечения также могут подойти, в зависимости от характера фармакокинетического профиля, который желателен лечащему врачу. Так, например, предусмотрено введение 1-4 раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления изобретения может использоваться введение в диапазоне от примерно 3 мкг/мг до примерно 2 мг/кг (например, примерно 3 мкг/мг, примерно 10 мкг/мг, примерно 30 мкг/мг, примерно 100 мкг/мг, примерно 300 мкг/мг, примерно 1 мг/кг и примерно 2 мг/кг). В некоторых вариантах осуществления изобретения частота введения составляет один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 9 недель или каждые 10 недель; или один раз в месяц, раз в 2 месяца или каждые 3 месяца или с большим интервалом. Успех данного лечения легко контролировать обычными способами и анализами. Схема введения (включая используемое антитело) может изменяться с течением времени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения взрослому пациенту нормального веса могут вводиться дозы в диапазоне примерно от 0,3 до 5,00 мг/кг. В некоторых примерах доза анти-FXII антитела, описанного в настоящем документе (например, DX-4012), может составлять 10 мг/кг. Конкретная схема лечения, а именно доза, сроки и частота, будет зависеть от конкретного индивидуума и его истории болезни, а также от свойств конкретных агентов (таких, как период полураспада агента и другие параметры, хорошо известные в данной области техники).

Для целей настоящего изобретения соответствующая доза антитела, описанного в настоящем документе, будет зависеть от конкретного используемого антитела, антител и/или другого пептида (не антитела) (или их композиции), типа и тяжести заболевания/расстройства, от того, вводится ли антитело в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, истории болезни пациента и реакции на антагониста, а также решения лечащего врача. Как правило, врач будет вводить антитело до достижения дозы, позволяющей достичь желаемого результата. В некоторых вариантах осуществления изобретения желаемым результатом является снижение тромбообразования. Способы определения, привела ли доза к желаемому результату, будут очевидны специалисту в данной области техники. Введение одного или нескольких антител может быть непрерывным или с интервалами, в зависимости, например, от физического состояния пациента, от того, является ли введение терапевтическим или профилактическим, и от других факторов, известных квалифицированным специалистам. Введение антитела может быть по существу непрерывным в течение заранее выбранного периода времени, или может представлять

собой серию дискретных разнесенных во времени доз, например, до, в течение или после развития заболевания или расстройства, подлежащего лечению.

В контексте настоящего изобретения термин "лечение" относится к применению или введению композиции, включающей один или несколько действующих агентов, субъекту, который имеет целевое заболевание или расстройство, симптом заболевания/расстройства или предрасположенность к заболеванию/расстройству, с целью вылечить, исцелить, облегчить, уменьшить, изменить, оказать помощь, способствовать излечению, улучшить или повлиять на расстройство, симптом заболевания или предрасположенность к заболеванию или расстройству.

Облегчение течения целевого заболевания/расстройства включает в себя задержку развития или прогресса заболевания, или уменьшение тяжести течения заболевания. Облегчение течения заболевания не обязательно требует излечения. В контексте настоящего изобретения "задержка" развития целевого заболевания или расстройства означает задержать, помешать, замедлить, затормозить, стабилизировать и/или отложить прогресс заболевания. Эта задержка может быть различной во времени в зависимости от истории болезни и/или индивидуумов, подлежащих лечению. Способ, который "задерживает" или ослабляет развитие заболевания, или задерживает начало заболевания, представляет собой способ, который снижает вероятность развития одного или нескольких симптомов заболевания в определенный период времени, и/или уменьшает степень выраженности симптомов в определенный период времени, по сравнению с тем, когда способ не используется. Такие сравнения, как правило, основаны на клинических исследованиях с использованием ряда субъектов, достаточного для статистически достоверных результатов.

"Развитие" или "прогресс" заболевания означают начальные проявления и/или последующее развитие заболевания. Развитие заболевания может быть идентифицировано и оценено с помощью стандартных клинических методов, хорошо известных в данной области техники. Однако термин "развитие" относится также к прогрессу, который может быть невозможно обнаружить. В настоящем изобретении "развитие" или "прогресс" относятся к биологической стороне симптомов. "Развитие" включает в себя возникновение, рецидив и начало. В контексте настоящего изобретения термин "начало" или "возникновение" целевого заболевания или расстройства включает в себя исходное начало и/или рецидив.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, описанные в настоящем документе, вводят нуждающемуся в лечении субъекту в количестве, достаточном для ингибирования активности одного или обоих антигенов-мишеней по меньшей мере на 20% (например, на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или в большей степени) *in vivo*. В других вариантах осуществления изобретения антитела вводят в количестве, эффективном для снижения уровня активности антигенов-мишеней по меньшей мере на 20% (например, на 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или в большей степени).

Для введения фармацевтической композиции субъекту могут быть использованы стандартные способы, известные специалистам в области медицины, в зависимости от типа заболевания, подлежащего лечению или локализации заболевания. Данную композицию также можно вводить с помощью других стандартных способов, например, перорально, парентерально, путем ингаляции, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Термин "парентеральный", используемый в данном описании, включает подкожный, внутрикожный, внутривенный, внутримышечный, внутрисуставный, внутриартериальный, интрасиновиальный, интрастернальный, интратекальный, интралезиональный и внутричерепной методы инъекции или инфузии. Кроме того, композиция может быть введена субъекту посредством депо-инъекций, например, с помощью 1-, 3- или 6-месячных депо-инъекций, или с помощью биоразлагаемых материалов и способов. В некоторых примерах фармацевтическую композицию вводят интраокулярно или интравитреально.

Композиции для инъекций могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилацетамид, диметилформамид, этиллактат, этилкарбонат, изопропилмирикат, этанол и многоатомные спирты (глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т.п.). Для внутривенного введения растворимые в воде антитела могут быть введены капельным способом, при котором фармацевтический препарат, содержащий антитело и физиологически приемлемое вспомогательное вещество, вводят путем инфузии. Физиологически приемлемые вспомогательные вещества могут включать, например, 5%-ю декстрозу, 0,9%-й солевой раствор, раствор Рингера или другие подходящие вспомогательные вещества. Внутримышечные препараты, например, стерильный состав подходящей растворимой солевой формы антитела, могут быть растворены и введены в фармацевтическом вспомогательном веществе, таком как вода для инъекций, 0,9%-й физиологический раствор или 5%-й раствор глюкозы.

В одном варианте осуществления антитело вводят с помощью сайт-специфичных или направленных местных методов доставки. Примеры сайт-специфичных или направленных местных методов включают различные имплантируемые депо-источники антител или катетеры для местной доставки, такие как инфузионные катетеры, полостные катетеры или катетеры с иглой, синтетические трансплантаты, адвентициальные обертывания, шунты и стенты, или другие имплантируемые устройства, сайт-специфичные носители, прямые инъекции или прямое нанесение. См., например, публикацию РСТ № WO 00/53211 и патент США № 5981568.

Также может быть использована направленная доставка терапевтических композиций, содержащих

антисмысловый полинуклеотид, вектор экспрессии или субгеномные полинуклеотиды. Рецепторно опосредованные методы доставки ДНК описаны, например, в Findeis et al., Trends Biotechnol. (1993) 11:202; Chiou et al., Gene Therapeutics: Methods And Applications Of Direct Gene Transfer (J. A. Wolff, ed.) (1994); Wu et al., J. Biol. Chem. (1988) 263:621; Wu et al., J. Biol. Chem. (1994) 269:542; Zenke et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:3655; Wu et al., J. Biol. Chem. (1991) 266:338.

Терапевтические композиции, содержащие полинуклеотид (например, кодирующий антитела, описанные в данном документе), вводят в диапазоне от примерно 100 нг до примерно 200 мг ДНК для местного введения по протоколу генотерапии. В некоторых вариантах осуществления диапазоны концентраций от примерно 500 до примерно 50 мг, от примерно 1 мкг до примерно 2 мг, от примерно 5 до примерно 500 мкг и от примерно 20 мкг до примерно 100 мкг ДНК или большего количества, также могут быть использованы в протоколе генотерапии.

Терапевтические полинуклеотиды и полипептиды, описанные в настоящем документе, могут быть доставлены с использованием средств доставки генов. Доставка генов может быть вирусной или невирусной (см., в общем, Jolly, Cancer Gene Therapy (1994) 1:51; Kimura, Human Gene Therapy (1994) 5:845; Connelly, Human Gene Therapy (1995) 1:185; и Kaplitt, Nature Genetics (1994) 6:148). Экспрессия таких кодирующих последовательностей, может быть индуцирована с использованием эндогенных промоторов млекопитающих или гетерологичных промоторов, и/или энхансеров. Экспрессия кодирующей последовательности может быть конститутивной или регулируемой.

Вирусные векторы для доставки желаемого полинуклеотида и экспрессии в желаемой клетке хорошо известны в данной области техники. Примеры вирусных носителей включают, но не ограничиваются ими, рекомбинантные ретровирусы (см., например, публикации PCT №№ WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; патенты США №№ 5219740 и 4777127; патент Великобритании № 2200651; и европейский патент № 0345242), альфавирусные векторы (например, векторы на основе вируса Синдбис, вируса леса Семлики (ATCC VR-67; ATCC VR-1247), вируса реки Росс (ATCC VR-373; ATCC VR-1246) и вируса венесуэльского лошадиного энцефалита (ATCC VR-923; ATCC VR-1250; ATCC VR-1249; ATCC VR-532)) и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV) (см., например, публикации PCT №№ WO 94/12649, WO 93/03769, WO 93/19191, WO 94/28938, WO 95/11984 и WO 95/00655). Также может использоваться введение ДНК, связанной с убитым аденовирусом, как описано в Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147.

Также могут быть использованы невирусные средства доставки и способы, включая, но не ограничиваясь этим, конденсированную на поликатионном носителе ДНК, связанную или несвязанную с убитым аденовирусом (см., например, Curiel, Hum. Gene Ther. (1992) 3:147), связанную с лигандом ДНК (см., например, Wu, J. Biol. Chem. (1989) 264:16985), носители для доставки в эукариотические клетки (см., например, патент США № 5814482; публикации PCT №№ WO 95/07994, WO 96/17072, WO 95/30763 и WO 97/42338) и нейтрализацию заряда нуклеиновых кислот или слияние с клеточными мембранами. Также может быть использована ДНК без носителей ("голая"). Примеры способов введения "голой" ДНК описаны в публикации PCT № WO 90/11092 и в патенте США № 5580859. Липосомы, которые могут действовать в качестве носителей для доставки генов, описаны в патенте США № 5422120; в публикации PCT №№ WO 95/13796, WO 94/23697, WO 91/14445 и в европейском патенте № 0524968. Дополнительные подходы описаны в Philip, Mol. Cell. Biol. (1994) 14: 2411, и в Woffendin, Proc. Natl. Acad. Sci. (1994) 91: 1581.

Конкретная схема введения, то есть доза, сроки и кратность, используемые в способе, описанный в данном документе, будут зависеть от конкретного субъекта и истории болезни этого субъекта.

В некоторых вариантах осуществления субъекту, нуждающемуся в лечении, могут быть введены несколько антител или комбинация антитела и другого подходящего терапевтического агента. Антитела могут быть также использованы в сочетании с другими агентами, которые служат для усиления и/или дополнения эффективности агентов.

Эффективность лечения целевого заболевания/расстройства может быть оценена с помощью способов, хорошо известных в данной области техники.

Наборы для использования для лечения заболеваний, связанных с активацией контактной системы

Настоящее изобретение также относится к наборам для использования для лечения заболеваний/расстройств, ассоциированных с активацией контактной системы, таких как НАО. Такие наборы могут включать в себя один или несколько контейнеров, содержащих анти-FXIIa антитело, например любые из описанных в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления набор может включать инструкции для использования в соответствии с любым из способов, описанных в настоящей заявке. Включенные инструкции могут содержать описание введения анти-FXIIa антитела для лечения, задержки начала или облегчения течения целевого заболевания, описанного в настоящем документе. Набор может дополнительно включать описание отбора подходящего для лечения индивидуума, исходя из того, имеет ли этот индивидуум целевое заболевание. В других вариантах осуществления инструкция содержит описание введения антитела человеку, имеющему риск целевого заболевания.

Инструкции, относящиеся к применению анти-FXIIa антитела, обычно включают информацию относительно дозировки, схемы введения и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут представлять собой разовые дозы, большие упаковки (например, многодозовые упаковки) или кратные дозы. Инструкции, поставляемые в наборах по изобретению, как правило, представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше (например, бумажный лист, входящий в набор), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, инструкции, предоставленные на магнитном или оптическом диске).

Этикетка или вкладыш указывают, что композиция используется для лечения, задержки начала и/или облегчения течения заболевания или расстройства, ассоциированного с рK₁-сигнальным путем, такого как НАО. Могут быть приведены инструкции для осуществления любого из описанных в настоящем документе способов.

Наборы по настоящему изобретению находятся в соответствующей упаковке. Соответствующая упаковка включает в себя, но не ограничивается этим, флаконы, бутылки, банки, мягкую упаковку (например, запечатанные пакеты Майлара или пластиковые пакеты) и т.п. Также предусмотрены упаковки для использования в сочетании с конкретным устройством, например ингалятором, устройством для назального введения (например, распылителем) или инфузионным устройством, таким как мини-насос. Набор может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции).

Контейнер может также иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемой иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере один действующий агент в композиции представляет собой анти-FXIIa антитело, как те, которые описаны в настоящем документе.

Наборы могут, необязательно, содержать дополнительные компоненты, такие как буферы, и информацию для интерпретации результатов. Как правило, набор включает контейнер и этикетку или вкладыш на контейнере или ассоциированные с ним. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к изделиям, включающим содержимое наборов, описанных выше.

Общие методики

При применении на практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, обычные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе, такой как *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Без дальнейших уточнений, полагают, что специалист в данной области может на основании приведенного выше описания использовать данное изобретение в его полном объеме. Следующие конкретные варианты осуществления, поэтому, следует рассматривать только как иллюстративные, а не ограничивающие остальное раскрытие каким-либо образом. Все публикации, процитированные в настоящем документе, включены путем ссылки для целей или объекта изобретения, указанных в настоящем документе.

Примеры

Пример 1. Получение анти-антител FXIIa

Отбор методом фагового дисплея с использованием фагмидной библиотеки FAB310 от Duax выполняли с использованием биотинилированного бета-фрагмента FXIIa, иммобилизованного на шариках, покрытых стрептавидином. Были выделены молекулы Fab, которые связываются с иммобилизованным FXIIa. Отбор давал селективный Fab-ингибитор, который специфично связывался с каталитическим доменом FXIIa с K_i^{app}, составляющей 800 пМ. Выделенные Fab не имели перекрестной реактивности в отношении следующих протеаз, протестированных при концентрации 1 мкМ: урокиназного активатора плазминогена, активатора фактора роста гепатоцитов, активированного протеина C, катепсина G, белка C1s, эластазы, фактора VIIa, фактора Ха, фактора XIa, плазмина, альфа-тромбина, трипсина, урокиназы,

плазматического калликреина, активатора фактора роста гепатоцитов и активатора плазминогена урокиназного типа.

Для выделенного Fab, M71-F06, проводили созревание аффинности с помощью нескольких стратегий, включая перетасовку CDR1/2 тяжелой цепи, перетасовку легкой цепи, "качание" CDR3 тяжелой цепи и комбинацию качания CDR3 тяжелой цепи и перетасовки CDR1/2 тяжелой цепи. Библиотека с перетасованными CDR1/2 тяжелой цепи была сконструирована путем удаления области CDR1/2 из M71-F06 и замены ее библиотекой случайных последовательностей, чтобы получить библиотеку для созревания аффинности антитела с разнообразием $\sim 10^8$. CDR3 тяжелой цепи меняли по каждой аминокислотной позиции в родительской последовательности CDR3 из M71-F06, чтобы получить новую библиотеку, которую также далее комбинировали с перетасовкой CDR1/2 тяжелой цепи. Второй отбор проводили с использованием этих библиотек. В отличие от отбора, проводимого с иммобилизованным FXIIa на исходной библиотеке, библиотеки для созревания аффинности инкубировали с биотинилированной мишенью в растворе при концентрациях ниже родительской K_i^{app} .

Биотинилированный FXIIa и любые связавшиеся Fab из библиотек впоследствии осаживали на открытых стрептавидином шариках. На фиг. 2 представлена схема стратегии отбора для идентификации и создания анти-FXIIa антител.

Ингибирующая активность клона M71-F06 в отношении FXIIa человека и мыши, определенная с помощью анализа активности *in vitro*, описанного в примере 2 ниже, показана на фиг. 4. Значение АЧТВ для клона M71-F06 (см. пример 2 ниже) в сравнении с DX-2930 показано на фиг. 5. Результаты также показывают, что клон M71-F06 не имеет ингибирующей активности в отношении активированного белка C, белка C1s, катепсина G, эластазы, фактора VIIa, фактора Ха, фактора XIa, активированного плазматического калликреина, плазмина, альфа-тромбина, трипсина, урокиназы, HGFA и uPA, что свидетельствует о том, что его ингибирующая активность является специфичной для FXIIa.

Любые выделенные Fab после отбора подвергали скринингу с помощью ELISA, в результате получив 39 уникальных изолятов. Аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой цепи и вариабельных областей легкой цепи приведены выше. Эти клоны должны иметь такую же антиген-связывающую активность и специфичность, как родительский клон, с более высокой аффинностью связывания.

Пример 2. Характеристика анти-FXIIa антител

Способы:

Анализ активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ)

Ингибиторы (или контрольный буфер для разведения: 25 mM HEPES, pH 7,5, 125 mM NaCl) добавляли к чистой плазме крови (без добавок) в смеси 1:1 и предварительно уравнивали при 37°C в течение 5 мин. 2×50 мкл этой смеси разливали в 2 отдельных аналитических кюветы KC4 Delta (с металлическим шариком). Через 60 с 50 мкл АЧТВ-реагента (активатор, Pacific Hemostasis APTT-XL) добавляли во вращающиеся кюветы и через 180 с после добавления АЧТВ-реагента (при t=0 сек) добавляли 50 мкл CaCl₂. Прибор KC4 Delta регистрировал время коагуляции в секундах.

Анализ протромбинового времени (ПТВ)

Ингибиторы (или контрольный буфер для разведения: 25 mM HEPES, pH 7,5, 125 mM NaCl) добавляли к чистой плазме крови (без добавок) в смеси 1:1 и предварительно уравнивали при 37°C в течение 5 мин. 2×50 мкл этой смеси разливали в 2 отдельных аналитических кюветы KC4 Delta (с металлическим шариком). Через 4 мин добавляли ПТВ-активатор (Pacific Hemostasis Thromboplastin D) (при t=0 с). Время коагуляции автоматически регистрировалось прибором KC4 Delta.

Анализ ингибирования очищенных компонентов

Анализ ингибирования очищенных компонентов изображен на фиг. 3, панель 1. 20 nM FXIIa инкубировали с ингибиторами при различной концентрации в течение 1 ч при 30°C в 96-луночном микропланшете. 10 nM прекаликреин добавляли на 20 мин при 30°C, а затем 5 мин инкубировали с 100 nM трипсинового ингибитора из кукурузы (СТІ). Протеолиз затем оценивали в динамике путем добавления финальной концентрации 10 мкМ флуорогенного пептидного субстрата (PFR-AMC), с начальной скоростью протеолиза субстрата наносимой на график (ось ординат) в зависимости от концентрации ингибитора (ось абсцисс) и подгонки получаемых в результате данных к модифицированному уравнению Моррисона (уравнение 1) для ингибиторов с сильным связыванием. Все реагенты разводили в буфере для анализа: 20 mM Трис-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% PEG-8000 и 0,1% Triton X-100.

Анализ ингибирования в плазме крови

Анализ ингибирования в плазме крови изображен на фиг. 3, панель 2. Объединенную нормальную плазму крови человека разводили 1:40 в буфере для анализа (см. выше) и добавляли ингибиторы при различных концентрациях в 96-луночный микропланшет при комнатной температуре. Затем инициировали контактную активацию добавлением 25%-й (2,5%-я конечная концентрация) эллаговой кислоты, содержащее микропланшета смешивали осторожным встряхиванием, и реакции давали протекать в течение 2 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 100 nM СТІ. 10 мкл этой смеси затем переносили в репликатный микропланшет, содержащий 80 мкл буфера для анализа, предварительно уравновешен-

ный при 30°C. Этот планшет для разбавления инкубировали еще 5 мин при 30°C, и протеолиз PFR-AMC оценивали, как описано выше, но с обратно вычисляемой концентрацией ингибитора, откладываемой на оси абсцисс при аппроксимации кривой к стандартному IC_{50} -уравнению (разведение плазмы составляло 1:400 при финальном спектрофотометрическом измерении в анализе).

Одно или несколько из анти-FXIIa антител, раскрытых в данном описании, также тестировали в модели на приматах (за исключением человека) в двух различных дозировках. Исследование проводили в течение 30 дней, после чего отбирали образцы крови для оценки фармакокинетики, влияния на АЧТВ и влияния на активацию плазматического калликреина с помощью Вестерн-блот-анализа.

Анализ предпочтительного связывания

Для определения предпочтительного связывания анти-FXIIa антител, каждое антитело инкубировали с зимогеном FXII или другими родственными протеазами контактной/коагуляционной системы. Аффинность связывания затем оценивали с помощью анализа поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием биосенсора Biacore. См. фиг. 3, панель 3.

Анализ окклюзии в модели потока/капилляре

Антитела тестируют в *ex vivo* модели потока, в которой кровь человека с добавлением антител пропускают с различной скоростью потока через капилляры, покрытые коллагеном. Осаждение тромбоцитов и фибрина оценивают по флуоресценции. Тромбоциты и осаждение фибрина ингибируется в этой системе с помощью антител, которые связываются зимогеном фактора XI или фактора XII. В типичном эксперименте антителам позволяют связываться со своими мишенями до инициации потока крови.

Мышиная модель тромбоза

Антитела тестируют в мышинной модели индуцированного треххлористым железом тромбоза сонной артерии. Модель включает в себя различные концентрации $FeCl_3$, начиная с самой низкой концентрации, которыми последовательно индуцируют образование тромба у мышей C57B1/6 (3,5%). Если антитело демонстрирует антитромботический эффект при низкой концентрации $FeCl_3$, концентрацию повышают до тех пор, пока не истощается антитромботическая активность антитела.

Результаты:

39 изолятов анти-FXIIa антител были протестированы в различных *in vitro* анализах активности, чтобы определить следующие свойства: кажущуюся K_i , IC_{50} , предпочтительное связывание, например, связывание с зимогеном FXII, перекрестную реактивность с другими родственными протеазами в контактной/коагуляционной системе, перекрестную реактивность с близкородственными гомологами по последовательности, эффект на образование плазматического калликреина (pKal), активность в плазме крови человека, протромбиновое время (ПТВ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и время задержки образования тромбина.

Результаты анализов представлены в табл. 3. Было найдено, что все 39 изолятов увеличивали АЧТВ, при этом не оказывая никакого влияния на ПТВ. Каждый из 39 изолятов со зрелой аффинностью имел увеличение K_i^{app} в 10-100 раз по сравнению с родительским изолятом. Антитела снижали образование pKal, что было подтверждено с помощью двух независимых тестов на ингибирование: анализа ингибирования очищенных компонентов и анализа ингибирования в плазме.

Согласно SPR-анализу (Biacore) антитела не связывают зимоген FXII и имеют специфичность в отношении каталитического домена при тестировании с полноразмерным FXIIa. Антитела также предупреждают активацию FXI до FXIa.

Таблица 3

Изолят	Плазматическая Ki ^{APP} (нМ)	АЧТВ (разы увеличения)	Ki ^{APP} (пМ)
M0191-E09	31	3,70	5
M0183-C03	33	3,17	6
M0184-F12	38	3,74	4
M0183-H08	76	3,36	5
M0182-D04	96	3,13	11
M0192-H11	101	3,33	6
M0292-D07	115	3,11	14
M0183-D08	118	2,08	11
M0192-F07	125	3,00	7
M0192-G03	125	3,14	18
M0310-C06	135	2,46	57
M0192-F01	174	3,18	8
M0191-A03	176	2,88	13
M0192-A01	198	3,11	17
M0191-H10	216	3,81	13
M0177-C12	217	3,86	18
M0184-B04	269	3,76	8
M0308-H03	275	3,38	18
M0192-D02	279	3,30	5
M0310-G07	295	4,48	22
M0192-F06	304	3,49	9
M0310-A04	316	3,48	15
M0310-F02	319	1,86	106
M0310-B09	331	3,73	12
M0310-G06	353	3,18	7
M0182-H01	359	Нет данных	Нет данных
M0178-A08	381	3,26	7
M0184-D01	435	3,32	4
M0177-A06	458	4,08	17
M0191-E04	460	3,59	7
M0191-H09	463	3,61	16
M0192-H04	485	3,51	9
M0192-A03	514	3,34	13
M0310-G08	796	2,76	24
M0192-G05	852	3,38	15
M0183-B12	1004	3,06	11
M0308-F04	1570	3,29	17
M0182-B04	Нет данных	Нет данных	Нет данных
M0310-F04	Нет данных	Нет данных	Нет данных

Ингибирующая активность клона M0192-H11 в отношении FXIIa человека показана на фиг. 21, и было установлено, что она составляет примерно $4,7 \pm 0,6$ пМ.

Анти-FXIIa антитела M192-M192 и H11-E09 также были протестированы in vivo фармакокинетических экспериментах на крысах. Группам крыс вводили по 20 мг/кг анти-FXIIa антитела M191-E09 или M192-H11. В различные дни после инъекций у крыс собирали образцы и оценивали по концентрации анти-FXIIa антител и фармакокинетическим параметрам (фиг. 6 и табл. 4).

Таблица 4. Фармакокинетические характеристики антител M192 -H11 и M191-E09

Исследуемое антитело	C _{макс} (мкг/мл)	AUC _{0-последн.} (ч*мкг/мл)	CI (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	t _{1/2} (ч)
M192-H11	360	18375	0,92	242	220
M191-E09	269	7612	2,28	489	218

Пример 3. Получение и характеристика анти-FXIIa антитела 559C-X211-A01

559C-X211-A01 представляет собой аффинно зрелую, частично имеющую последовательности из зародышевой линии версию описанного выше родительского антитела 559C-M71-F06.

Аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи этого антитела показаны ниже:

559C-X211-A01_{HV} (CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **QYVMH** WVRQAPGKGLEWVS
SIWPSGGHTRYADSVKG RFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCTR
QRYRGPKYYYMDV WGKGTITVTVSS (SEQ ID NO:125)

559C-X211-A01_{LV} (CDR подчеркнуты и выделены жирным шрифтом)

DIVMTQSPPLSLPVPDPGEPASIS **RSSQSLLSNGYNYLD** WYLQKPGQSPQLLIY
LGSNRAS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC **MQALQTPWT**
FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:126)

559C-X211-A01 было протестировано в различных *in vitro* анализах активности, чтобы определить следующие свойства:

кажущуюся K_i , IC_{50} , связывание с зимогеном FXII, перекрестную реактивность с другими родственными протеазами в контактной/коагуляционной системе, перекрестную реактивность с близкородственными гомологами по последовательности, эффект на образование плазматического калликреина (pKal) и активность в плазме крови человека. Протромбиновое время (ПТВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) в плазме мышей также была определено *in vitro*.

Анализ на перекрестную реактивность

559C-X211-A01 не имело перекрестной реактивности по отношению к протестированным при 1 мкМ следующих протеаз: урокиназного активатора плазминогена, активатора фактора роста человека, активированного белка C, катепсина G, белка C1s, эластазы, фактора VIIa, фактора Ха, фактора XIa, плазмина, альфа-тромбина, трипсина, урокиназы и плазматического калликреина.

Анализ на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и протромбиновое время (ПТВ)

Ингибиторы (или контрольный буфер для разведения: 25 мМ HEPES, pH 7,5, 125 мМ NaCl) добавляли к чистой (без добавок) плазме крови мыши и человека в смеси 1:1 и предварительно уравнивали при 37°C в течение 5 мин. 2×50 мкл этой смеси разливали в 2 отдельных аналитических кюветы KC4 Delta (с металлическим шариком). Через 60 с 50 мкл АЧТВ-реагента (активатор, Pacific Hemostasis АРТТ-XL) добавляли во вращающиеся кюветы и через 180 с после этого (при t=0 с) добавляли 50 мкл CaCl₂. Прибор KC4 Delta регистрировал время коагуляции в секундах.

Как указано выше, за исключением того, что после 4-минутной инкубации после разнесения 2×50 мкл смеси ингибитора с плазмой по 2 отдельным аналитическим кюветам KC4 Delta, добавляли активатор ПТВ (Pacific Hemostasis Thromboplastin D), при t=0 с. Время коагуляции автоматически регистрировалось прибором KC4 Delta.

559C-X211-A01 увеличивает АЧТВ в плазме мышей, одновременно не оказывая никакого влияния на ПТВ. См. фиг. 7. Эти данные подтверждают видовую перекрестную реактивность с мышинным фактором XII.

Анализ ингибирования очищенных компонентов

20 пМ FXIIa инкубируют с ингибиторами при различной концентрации в течение 1 ч при 30°C в 96-луночном микропланшете. Затем добавляют 10 нМ прекалликреин на 20 мин при 30°C, а затем 5 мин инкубируют с 100 нМ ингибитором трипсина из кукурузы (СТИ). Протеолиз затем оценивают в динамике путем добавления финальной концентрации 10 мкМ флуорогенного пептидного субстрата (PFR-АМС), с начальной скоростью протеолиза субстрата наносимой на график (ось ординат) в зависимости от концентрации ингибитора (ось абсцисс) и подгонки получаемых в результате данных к модифицированному уравнению Моррисона для ингибиторов с сильным связыванием. Все реагенты разводили в буфере для анализа: 20 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1% PEG-8000 и 0,1% Triton X-100.

Анализ ингибирования в плазме

Объединенную нормальную плазму крови человека разводят 1:40 в буфере для анализа (см. выше) и добавляют ингибиторы при различных концентрациях в 96-луночный микропланшет при комнатной температуре. Затем инициируют контактную активацию добавлением 25%-го (2,5%-я конечная концентрация) реагента АРТТ-XL (разбавленной эллаговой кислоты; Pacific HAOmostasis), содержимое микропланшета смешивают осторожным встряхиванием, и реакции дают протекать в течение 2 мин при комнатной температуре, после чего добавляют 100 нМ СТИ. 10 мкл этой смеси затем переносят в репликатный микропланшет, содержащий 80 мкл буфера для анализа, предварительно уравновешенный при 30°C. Этот планшет для разбавления инкубируют еще 5 мин при 30°C, и протеолиз PFR-АМС оценивают, как описано выше, но с возвратно вычисляемой концентрацией ингибитора, откладываемой на оси абсцисс при аппроксимации кривой к стандартному IC_{50} -уравнению и/или модифицированному уравнению Моррисона (разведение плазмы составляет 1:400 при финальном спектрофотометрическом измерении в анализе).

Данные по активности 559C-X211-A01, наблюдаемой в вышеуказанных анализах, приведены ниже в табл. 5.

Таблица 5. Активность 559C-X211-A01

Изолят	Плазматическая IC_{50} (нМ)	АЧТВ (кратность увеличения) с использованием 1 мкМ X211-A01 в плазме человека	АЧТВ (кратность увеличения) с использованием 1 мкМ X211-A01 в плазме мыши	K_i^{app} (пМ)
559C-X211-A01	289	3,4	2,8	5

Согласно SPR-анализу это антитело связывается с FXIIa и не связывает зимоген FXII. Эксперименты по ферментному ингибированию с FXIIa-бета показали специфичность к каталитическому домену.

Ожидается, что 559C-X211-A01 уменьшает образование и осаждение фибрина, увеличивая время,

которое требуется крови для закупоривания покрытого коллагеном капилляра в анализе окклюзии в модели потока/капилляре, и/или для уменьшения агрегации тромбоцитов и частоты окклюзии артерий. 559C-211-A01, как ожидается, снижает частоту образования тромбов как мышинной модели тромбоза, так и модели тромбоза у приматов (кроме человека).

Пример 4. In Vivo исследования тромбоза с использованием DX-4012

Фармакокинетические исследования

Антикоагулянтное действие однократной дозы DX-4012 оценивали у здоровых павианов в качестве фармакодинамического маркера присутствия антитела в циркулирующей крови. Животные получали небольшую седацию, и у них отбирали кровь из локтевой вены для получения исходных значений коагуляции. Затем вводили антитело в насыщающей дозе. Вводили одну дозу антителовнутривенно и отбирали образцы крови в различные моменты времени до тех пор, пока антикоагулянтный эффект наблюдался в АЧТВ-анализе относительно базовой линии. Образцы плазмы замораживали для проведения дополнительных испытаний.

После завершения фармакокинетических исследований и определения эффективного времени полужизни антитела у павианов, фармакодинамические исследования тромбоза и гемостаза были продолжены.

Фармакодинамическое исследование тромбоза и гемостаза

Эксперименты по острому тромбозу и гемостазу проводили до и во время антикоагулянтной терапии, чтобы определить эффективность и безопасность антитела в виде однократной насыщающей дозы по сравнению с положительным и отрицательным контролем. Эксперименты по тромбозу проводились у тренированных павианов путем внедрения сегмента сосудистого трансплантата в постоянный выведенный наружу бедренный АВ-шунт. В каждый день исследования по 1 мл крови (с цитратом) отбирали из петли шунта в различные моменты времени для серийных тестов на время кровотечения, измерения объема и анализов антикоагулянтного эффекта. Время отбора образцов включает точку до введения исследуемого препарата (в день, когда животное получало эноксапарин или DX-4012 перед введением эноксапарина или DX-4012), перед исследованием (за 5 мин до начала исследования) и после исследования (за 5 мин до конца данного исследования, когда удаляли петлю шунта). Перед экспериментами по исследованию тромбоза и гемостаза павианы получали ¹¹¹In-радиоактивного меченые аутологичные тромбоциты и ¹²⁵I-радиоактивно меченый фибриноген. Антитромботическую активность DX-4012 сравнивали с эноксапарином (низкомолекулярным гепарином).

После отбора образцов крови для базовой линии начинали эксперименты по исследованию тромбоза. Постоянный АВ-шунт временно (на 60 мин) удлиняли с помощью силиконовой трубки, и во внешнюю АВ-петлю вставляли короткий сегмент покрытого коллагеном ePTFE-трансплантата или покрытого фактором роста ePTFE-сосудистого трансплантата (20 мм) (фиг. 10). Тромб образуется на трансплантате (головка тромба) и удлиняется на дистальной стороне (хвост тромба). Накопление радиоактивно меченых тромбоцитов в трансплантате контролировали в реальном масштабе времени с использованием визуализирующей гамма-камеры в течение 60 мин и рассчитывали как число тромбоцитов, осаждающихся на трансплантат через каждые 5 мин. Через 60 мин перфузии трансплантата его удаляли, шунт повторно подключали и количество фибрина, осажденного на трансплантате за 60 мин (конечная точка), определяли после распада ¹¹¹In (30⁺ дней приблизительно после 10 периодов полураспада). Фибрин и число тромбоцитов представляют размер тромба. Результаты АЧТВ- и ПТВ-анализы проводили, как описано в примерах 2 и 3. АЧТВ измеряли с использованием цитратной плазмы, реагента Syntha Sil® (Instrumentation Laboratories) и коагулометра KC-4. ПТВ измеряли с использованием цитратной плазмы, реагента Dade® Innovin® (Siemens) и коагулометра KC-4. Оба показателя, АЧТВ и ПТВ, измеряли сразу же после забора крови и центрифугирования образцов крови для получения обедненной тромбоцитами плазмы. Через 1 ч после введения DX-4012, измеренное изменение АЧТВ составило 2,2 раза (при ожидаемом >2,2 раза). Через 24-48 ч измеренное изменение АЧТВ составило 1,8 раза (при ожидаемом 1,8-2,0 раза), и через 1 неделю измеренное изменение АЧТВ составило 1,3 раза (при ожидаемом 1,3-1,5 раза). Не наблюдалось никаких изменений ПТВ.

Покрытый коллагеном трансплантат

Для исследований тромбоза, животные получали 10 мг/кг антитела DX-4012, а исследования проводились через 1, 24, 48, 168 и 192 ч после введения антитела. Для анализа данные из временных точек 24 и 48 ч были сгруппированы вместе и данные из временных точек 168 и 192 ч также были сгруппированы вместе. Как ожидалось, у контрольных животных образовалась иницированная коллагеном головка тромба (базовая линия). Головка тромба была значительно меньше у животных, получавших эноксапарин. В моменты времени до 48 ч после введения антитела размер головки тромба был меньше по сравнению с контрольными животными и был сравним с таковым у животных, которые получали эноксапарин. Через одну неделю после введения антитела (168-192 ч), размер головки тромба был сравним с таковым у контрольных животных (фиг. 11А). Во временных точках до 48 ч после введения антитела хвост тромба практически отсутствовал и был сравним с таковым у животных, получавших эноксапарин. Через одну неделю после введения антитела (168-192 ч) хвост тромба оставался уменьшенным, но в меньшей

степени, чем после введения эноксапарина (фиг. 11B).

В другом эксперименте в моменты времени до 48 ч после введения антитела размер головки тромба был меньше по сравнению с контрольными животными и был сравним с таковым у животных, которые получали эноксапарин. Через одну неделю после введения антитела (168-192 ч) размер головки тромба был все еще уменьшен, но в меньшей степени, чем после введения эноксапарина (фиг. 12). Фиг. 13 представляет образование тромба (всего тромба), указывающее на то, что образование тромба было сравнимо через 1, 24 и 48 ч после введения антитела. Скорость роста тромба (отложение тромбоцитов через каждые 5 мин) показана на фиг. 14. У контрольного тромба скорость роста увеличивалась в течение первых 30 мин до достижения плато. Скорость роста после введения эноксапарина достигала более низкого плато через 20 мин, начинала снижаться через 40 мин и тромб лизировался через 60 мин (отрицательная скорость роста). В течение первых 48 ч после введения DX-4012 скорость роста достигала плато через 15-20 мин и была сниженной. Через одну неделю после введения антитела тромбы находились между ранними временными точками (1 ч и 24-48 ч) и контролем.

В целом, введение 10 мг/кг DX-4012 уменьшало размер тромба после инициации его образования коллагеном, эффект, который наблюдался как для размера головки тромба, так и для хвоста тромба. Уменьшение размера тромба наблюдалось до 48 ч после введения антитела и было сравнимо с введением эноксапарина (1 мг/кг). Через одну неделю головка тромба возвращалась к исходному уровню у животных, которые получали антитело, но размер тромба хвоста оставался уменьшенным.

Покрытый тканевым фактором трансплантат

В общем, размеры тромбов имеют тенденцию меняться в большей степени в шунтах, покрытых тканевым фактором, по сравнению с шунтами, покрытыми коллагеном. В описанных экспериментах наблюдались сильные вариации (7,4, 14,0 и 2,3 млрд тромбоцитов). Как ожидалось, у контрольных животных образовалась инициированная тканевым фактором головка тромба (базовая линия). Головка тромба была значительно уменьшена у животных, получавших эноксапарин. Во временных точках до 48 ч после введения антитела размер головки тромба был сравним с таковым у контрольных животных (фиг. 15A). Через одну неделю после введения антитела (168-192 ч) размеры головки тромба сильно различались. Введение эноксапарина практически ликвидировало инициированное тканевым фактором образование тромба хвоста. Не наблюдалось никакого существенного уменьшения хвоста тромба у животных, получавших антитело, хотя данные позволяли предположить, что существует небольшая тенденция в сторону уменьшения хвоста тромба (фиг. 15B).

В другом эксперименте введение эноксапарина привело к уменьшению размера тромба более чем на 50%, в основном из-за практического исчезновения хвоста тромба. Не наблюдалось никакого существенного уменьшения хвоста тромба у животных, получавших антитело, хотя данные позволяют предположить, что существует небольшая тенденция в сторону уменьшения хвоста тромба (фиг. 16). На фиг. 17 представлено образование тромба (всего тромба). Анализ данных с помощью RM ANOVA показал, что наблюдалось снижение общего размера тромба через 1 ч после введения антител по сравнению с контролем. Скорость роста тромба (отложение тромбоцитов через каждые 5 мин) показана на фиг. 18. У контрольного тромба скорость роста увеличивалась в течение первых 30 мин до достижения плато. Скорость роста после введения эноксапарина достигала более низкого плато через 20 мин, начинала снижаться через 40 мин, и тромб лизировался через 60 мин (отрицательная скорость роста). В течение первых 48 ч после введения DX-4012 скорость роста тромба была аналогична скорости, наблюдаемой у контрольных животных (фиг. 18).

В целом, введение 10 мг/кг DX-4012 не оказывает влияния на размер головки тромба и мало влияет на размер хвоста тромба при инициированном тканевым фактором образовании тромба.

Финальное содержание фибрина и осаждение тромбоцитов

В конце эксперимента, шунты промывали физиологическим раствором и получали изображения для оценки окончательного количества тромбоцитов. Петлю также сохраняли для анализа содержания фибрина в головке и хвосте тромба.

Финальный размер тромба был снижен у животных, получавших эноксапарин. Размер тромба был также значительно снижен, согласно измерениям осажденных тромбоцитов и содержания фибрина, в покрытом коллагеном шунтах у животных, которые получали DX-4012, но не был снижен в покрытых тканевым фактором шунтах (фиг. 19A и 19B).

Исследования гемостаза

Гемостаз измеряли с помощью устройства и протокола, утвержденных FDA для измерения времени кровотечения Surgicutt™. Также измеряли объем крови. В один день исследования проводили одно измерение времени кровотечения и объема кровотечения. Как показано на фиг. 22A и 22B, DX-4012 было эффективно в отношении снижения времени кровотечения и объема кровотечения по сравнению с эноксапарином.

Пример 5. Идентификация критических остатков в каталитическом домене FXIIa на основе кристаллической структуры комплекса DX-4012-FXIIa

Рекомбинантный Fab-фрагмент DX-4012 был получен с помощью обычной рекомбинантной технологии в E.coli и очищен. FXIIa получали и очищали с помощью обычных способов.

Fab-фрагмент DX-4012 и FXIIa смешивали при различных концентрациях в подходящих условиях, позволяющих образование комплекса Fab-FXIIa. Комплексы были очищены с использованием SEC и визуализированы по следам, показанным на фиг. 20.

Комплекс Fab-FXIIa выдерживали при различных условиях, способствующих кристаллизации. Дифракционный анализ проводили на кристаллизованном комплексе. Кристаллические структуры (2,6 Å и 2,25 Å) были определены на основе статистической обработки дифракционных данных.

В соответствии с кристаллическими структурами были идентифицированы остатки в С-цепи FXIIa, которые участвуют во взаимодействии с Fab-фрагментом из DX-4012: L390, Y391, W392, G393, H394, S395, F396, C397, H412, C413, L414, Q415, D416, R432, N433, V456, Y458, H507, F509, E510, G511, A512, E513, Y515, D557, A558, C559, Q560, G561, D562, S563, I584, S585, W586, G587, S588, G589, C590, G591, D592, G597.

Кроме того, остатки в Fab из DX-4012, которые взаимодействуют с FXIIa, также были идентифицированы на основе кристаллической структуры, включая T28, S30, Q31, W52, P53, S54, G55, G56, H57, R59, N74, R100, Y101, R102, G103, P104, K105, Y106, Y107 и Y108 в варибельной области тяжелой цепи и H31, N33, Y35, Y54, L55, N58 и T99 в варибельной области легкой цепи.

Эти результаты указывают на то, что тяжелая цепь DX-4012 является основной областью, которая взаимодействует с FXIIa, и были найдены несколько остатков в LC CDR1, способствующие взаимодействию.

Кристаллические структуры также показали, что остаток R102 Fab-фрагмента анти-FXIIa антитела связывает S1-карман FXIIa и взаимодействует с остатком D557 с помощью опосредованных водой взаимодействий. Это позиционирует каркас Fab-остатков R102-G103-P104 вблизи каталитической триады FXIIa, но в каталитически некомпетентной ориентации. P104 может вносить вклад в жесткое удержание этой ориентации, тем самым ингибируя активность FXIIa.

Комплексы других анти-FXIIa антител и их Fab-фрагменты с FXIIa также были получены и совместно очищены с целью определения дополнительных кристаллических структур.

Другие варианты осуществления

Все признаки, раскрытые в данном описании, могут быть объединены в любом сочетании. Каждый признак, раскрытый в данном описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим такой же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если явно не указано иное, то каждый раскрытый признак является лишь примером общей серии эквивалентных или аналогичных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области может легко определить существенные характеристики настоящего изобретения и, не отступая от сущности и объема изобретения, может осуществить различные изменения и модификации изобретения, чтобы приспособить его к различным вариантам применения и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также входят в пределы формулы изобретения.

Эквиваленты

Хотя некоторые инновационные варианты осуществления были описаны и проиллюстрированы в данном документе, обычным специалистам в данной области техники легко будет представить себе множество других средств и/или структур для выполнения функции и/или получения результатов и/или одного или нескольких преимуществ, описанных в данном документе, и считается, что каждая такая вариация и/или модификация входит в объем инновационных вариантов осуществления, описанных в данном документе. В более общем плане, специалисты в данной области техники легко поймут, что все параметры, размеры, материалы и конфигурации, описанные в настоящем документе, приведены в качестве примера, и что фактические параметры, размеры, материалы и/или конфигурации будут зависеть от конкретного варианта или вариантов применения, в которых используются инновационные идеи. Специалистам в данной области техники будут очевидны, или они будут в состоянии определить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем документе. Поэтому следует понимать, что приведенные выше варианты осуществления изобретения представлены только в качестве примера, и что в пределах объема прилагаемой формулы изобретения и ее эквивалентов, варианты осуществления изобретения могут быть осуществлены иначе, чем конкретно описано и заявлено. Варианты осуществления изобретения по настоящему описанию направлены на каждый отдельный признак, систему, изделие, материал, набор и/или способ, описанный в настоящем документе. Кроме того, любая комбинация из двух или нескольких таких признаков, систем, изделий, материалов, наборов и/или способов, если такие признаки, системы, изделия, материалы, наборы и/или способы не являются взаимно несовместимыми, включена в объем настоящего изобретения.

Все определения, описанные и использованные в данном описании, следует понимать превалирующие над стандартными определениями, приведенными в документах, включенных в качестве ссылки, и/или обычными значениями определяемых терминов.

Все ссылки, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном описании, включены путем ссылки относительно объекта изобретения, для которого приводится каждая ссылка, которая в некоторых случаях может включать полный документ.

Единственное число, используемое в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, если явно не указано обратное, следует понимать "по меньшей мере один".

Фразе "и/или", используемую в настоящем документе в описании и в формуле изобретения, следует понимать в значении "один или оба" для элементов таким образом объединенных, то есть элементы, которые совместно присутствуют в некоторых случаях, в других случаях присутствуют по отдельности. Множество элементов, перечисленных с "и/или", следует истолковывать таким же образом, то есть "один или несколько" элементов, объединенных таким образом. Необязательно, могут присутствовать другие элементы, кроме элементов, специально определенных пунктом "и/или", независимо от того, связаны или не связаны они с этими специально указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, ссылка на "А и/или В", при использовании в сочетании с "открытым" выражением, таким как "содержащий", может относиться: в одном варианте осуществления - только к А (необязательно, включая элементы кроме В); в другом варианте - только к В (необязательно, включая элементы кроме А); в еще одном варианте осуществления, как к А, так и к В (необязательно, включая другие элементы); и т.п.

В контексте настоящего описания и формулы изобретения союз "или" следует рассматривать, как имеющий такое же значение, как связка союзов "и/или", определение которой дано выше. Например, при разделении элементов в списке союзы "или" или "и/или" должны интерпретироваться как включающие, т.е., включающие по меньшей мере один, но также включающие более одного из ряда или списка элементов и, необязательно, дополнительных неуказанных предметов. Только термины, четко указывающие обратное, такие как "только один из" или "точно один из", или (при использовании в формуле изобретения) "состоящей из", будут относиться к включению одного элемента из ряда или списка элементов. В общем, термин "или", используемый в данном описании, должен интерпретироваться только как указание на исключительные альтернативы (т.е. "один или другой, но не оба"), когда ему предшествует указание на исключительность, такое как "либо", "один из", "только один из" или "ровно один из". Фраза "состоящий по существу из" при использовании в формуле изобретения будет иметь обычное значение, используемое в области патентного права.

Используемую в настоящем описании и в формуле изобретения фразу "по меньшей мере один" в отношении списка из одного или нескольких элементов следует понимать, как обозначающую по меньшей мере один элемент, выбранный из одного или нескольких элементов в списке элементов, но необязательно включающую по меньшей мере один из каждого в отдельности элементов, специально перечисленных в списке элементов, и не исключающую любые комбинации элементов в списке элементов. Это определение также допускает, что необязательно могут присутствовать элементы, кроме элементов, специально указанных в списке элементов, к которым относится фраза "по меньшей мере один", вне зависимости от того, связаны или не связаны они с этими специально указанными элементами. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, "по меньшей мере один из А и В" (или аналогично "по меньшей мере один из А или В", или аналогично "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более одного А в отсутствие В (и, необязательно, включая элементы помимо В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно, включая более одного В, в отсутствие А (и, необязательно, включая элементы помимо В); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая более одного А, и к по меньшей мере одному, необязательно включая более одного В (и, необязательно, включая другие элементы); и т.п.

Следует также понимать, что, если явно не указано обратное, в любых способах, заявленных в настоящем документе, которые включают в себя более одной стадии или действия, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничивается изложенным порядком стадий или действий способа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое связывается с фактором XIIa (FXIIa) и не связывается с фактором XII (FXII), содержащее тяжелую цепь, которая содержит переменную область тяжелой цепи, и легкую цепь, которая содержит переменную область легкой цепи, где

вариабельная область тяжелой цепи содержит определяющую комплементарность область 1 (CDR1) тяжелой цепи (HC), HC CDR2 и HC CDR3), где:

(i) HC CDR1 содержит QYVMH (SEQ ID NO: 58), HC CDR2 содержит SIWPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO: 75), HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(ii) HC CDR1 содержит WYSMH (SEQ ID NO: 41), HC CDR2 содержит VIYPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 74) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(iii) HC CDR1 содержит QYVMH (SEQ ID NO: 42), HC CDR2 содержит SIWPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO: 75) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(iv) HC CDR1 содержит WYVMH (SEQ ID NO: 43), HC CDR2 содержит GIWPSGGRTKYADSVKG (SEQ ID NO: 76) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(v) HC CDR1 содержит NYVMH (SEQ ID NO: 44), HC CDR2 содержит SIWPSGGKTKYADSVKG

(SEQ ID NO: 77) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDA (SEQ ID NO: 112);
 (vi) HC CDR1 содержит MYTMN (SEQ ID NO: 45), HC CDR2 содержит RIYPSGGKTLYADSVKG (SEQ ID NO: 78) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (vii) HC CDR1 содержит QYVMS (SEQ ID NO: 46), HC CDR2 содержит RIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 79) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (viii) HC CDR1 содержит WYNMH (SEQ ID NO: 47), HC CDR2 содержит YIYPSGGKTKYTDSVKG (SEQ ID NO: 80) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (ix) HC CDR1 содержит RYIMH (SEQ ID NO: 48), HC CDR2 содержит SIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 81) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (x) HC CDR1 содержит RYIMG (SEQ ID NO: 49), HC CDR2 содержит SIYPSGGVTRYADSVKG (SEQ ID NO: 82) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xi) HC CDR1 содержит QYNMV (SEQ ID NO: 50), HC CDR2 содержит RIWPSGGKTTYADSVKG (SEQ ID NO: 83) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xii) HC CDR1 содержит RYVMV (SEQ ID NO: 51), HC CDR2 содержит RIYPSGGMTQYADSVKG (SEQ ID NO: 84) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xiii) HC CDR1 содержит WYNMA (SEQ ID NO: 52), HC CDR2 содержит RIYPSGGMTQYADSVKG (SEQ ID NO: 84) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xiv) HC CDR1 содержит QYIMH (SEQ ID NO: 53), HC CDR2 содержит SIYPSGGNTKYADSVKG (SEQ ID NO: 85) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xv) HC CDR1 содержит HYVMH (SEQ ID NO: 54), HC CDR2 содержит SIYPSGGLTKYADSVKG (SEQ ID NO: 86) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xvi) HC CDR1 содержит WYTMH (SEQ ID NO: 55), HC CDR2 содержит SIYPSGGFTRYADSVKG (SEQ ID NO: 87) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xvii) HC CDR1 содержит FYHMH (SEQ ID NO: 56), HC CDR2 содержит RIVPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 88) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xviii) HC CDR1 содержит FYSMH (SEQ ID NO: 57), HC CDR2 содержит RIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 89) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xix) HC CDR1 содержит QYVMH (SEQ ID NO: 58), HC CDR2 содержит SIWPSGGKTTYADSVKG (SEQ ID NO: 90) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xx) HC CDR1 содержит QYVMH (SEQ ID NO: 58), HC CDR2 содержит SIWPSGGFTKYADSVKG (SEQ ID NO: 91) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxi) HC CDR1 содержит FYNMH (SEQ ID NO: 59), HC CDR2 содержит SIYPSGGVTRYADSVKG (SEQ ID NO: 92) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxii) HC CDR1 содержит WYVMH (SEQ ID NO: 43), HC CDR2 содержит SIYPSGGKTSYADSVKG (SEQ ID NO: 93) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxiii) HC CDR1 содержит PYIMH (SEQ ID NO: 60), HC CDR2 содержит VIYPSGSKTNYADSVKG (SEQ ID NO: 94) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxiv) HC CDR1 содержит RYTMR (SEQ ID NO: 61), HC CDR2 содержит SIWPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 95) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxv) HC CDR1 содержит QYVMH (SEQ ID NO: 58), HC CDR2 содержит SIYPSGGLTRYADSVKG (SEQ ID NO: 96) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxvi) HC CDR1 содержит WYIMG (SEQ ID NO: 62), HC CDR2 содержит YIYPSGGNTRYADSVKG (SEQ ID NO: 97) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxvii) HC CDR1 содержит RYVMH (SEQ ID NO: 63), HC CDR2 содержит SIWPSGGMTKYADSVKG (SEQ ID NO: 98) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxviii) HC CDR1 содержит FYIMG (SEQ ID NO: 64), HC CDR2 содержит RIYPSGGATQYADSVKG (SEQ ID NO: 99) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxix) HC CDR1 содержит FYVMG (SEQ ID NO: 65), HC CDR2 содержит RIYPSGGLTQYADSVKG (SEQ ID NO: 100) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxx) HC CDR1 содержит FYSMH (SEQ ID NO: 66), HC CDR2 содержит RIYPSGGITSYADSVKG (SEQ ID NO: 101) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxxii) HC CDR1 содержит MYIMH (SEQ ID NO: 67), HC CDR2 содержит SIYPSGGMTKYADSVKG (SEQ ID NO: 102) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxxii) HC CDR1 содержит MYVMH (SEQ ID NO: 68), HC CDR2 содержит SIYPSGGLTKYADSVKG (SEQ ID NO: 103) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxxiii) HC CDR1 содержит QYVMH (SEQ ID NO: 58), HC CDR2 содержит RIYPSGGLTNYADSVKG (SEQ ID NO: 104) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);
 (xxxiv) HC CDR1 содержит WYVMQ (SEQ ID NO: 69), HC CDR2 содержит SIYPSGGMTKYADSVKG (SEQ ID NO: 102) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

111);

(xxxv) HC CDR1 содержит WYIMG (SEQ ID NO: 62), HC CDR2 содержит RIYPSGGSTHYADSVKG (SEQ ID NO: 105) и HC CDR3 содержит QRYRGPRYYYYIDA (SEQ ID NO: 113);

(xxxvi) HC CDR1 содержит QYTMV (SEQ ID NO: 70), HC CDR2 содержит RIYPSGGVTQYADSVKG (SEQ ID NO: 106) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(xxxvii) HC CDR1 содержит WYVMY (SEQ ID NO: 71), HC CDR2 содержит RIYPSGGITHYADSVKG (SEQ ID NO: 107) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(xxxviii) HC CDR1 содержит FYVML (SEQ ID NO: 72), HC CDR2 содержит SIWPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 108) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(xxxix) HC CDR1 содержит WYVMQ (SEQ ID NO: 69), HC CDR2 содержит YIYPSGGHTKYADSVKG (SEQ ID NO: 109) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

(xxxx) HC CDR1 содержит RYSMN (SEQ ID NO: 73), HC CDR2 содержит GIYPSGGKTKYADSVKG (SEQ ID NO: 110) и HC CDR3 содержит QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111);

вариабельная область легкой цепи (LC) содержит LC CDR1, содержащую аминокислотную последовательность RSSQSLHLSNGYNYLD (SEQ ID NO: 114), LC CDR2, содержащую аминокислотную последовательность LGSNRAS (SEQ ID NO: 115), и LC CDR3, содержащую аминокислотную последовательность MQALQTPWT (SEQ ID NO: 116); и

где антитело не является биспецифическим антителом.

2. Антитело по п.1, где антитело представляет собой полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

3. Антитело по п.2, где антитело представляет собой Fab.

4. Антитело по любому из пп.1-3, где антитело представляет собой антитело человека.

5. Антитело по любому из пп.1-3, где антитело представляет собой гуманизированное антитело.

6. Антитело по любому из пп.1-5, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-39 и SEQ ID NO: 125.

7. Антитело по п.6, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 125.

8. Антитело по любому из пп.1-7, где легкая цепь содержит вариабельную область легкой цепи, которая содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 126.

9. Антитело по любому из пп.1-8, где тяжелая цепь дополнительно содержит константную область тяжелой цепи.

10. Антитело по п.9, где константная область тяжелой цепи содержит по меньшей мере одну мутацию, которая увеличивает время полужизни антитела по сравнению с аналогом дикого типа, где по меньшей мере одна мутация находится в положении, соответствующем положениям 145, 147 или 149 SEQ ID NO: 119.

11. Антитело по п.10, где по меньшей мере одна мутация представляет собой аминокислотную замену, выбранную из группы, состоящей из M145Y, S147T и T149E.

12. Антитело по п.10, где константная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120.

13. Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело по любому из пп.1-12.

14. Вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по п.13.

15. Клетка-хозяин, содержащий вектор п.14.

16. Клетка по п.15, где клетка представляет собой бактериальную клетку, дрожжевую клетку, клетку насекомого, клетку растения или клетку млекопитающего.

17. Способ получения антитела, которое связывается с фактором XIIa (FXIIa), включающий

культивирование клеток по п.15 или 16 в культуральной среде и

сбор культивированных клеток или культуральной среды для выделения антитела.

18. Фармацевтическая композиция, содержащая:

(a) антитело по любому из пп.1-12, нуклеиновую кислоту по п.13 или вектор по п.14 и

(b) фармацевтически приемлемый носитель.

19. Способ лечения заболевания, связанного с активацией контактной системы, причем способ включает введение нуждающемуся в этом субъекту антитела по любому из пп.1-12, нуклеиновой кислоты по п.13, вектора по п.14 или фармацевтической композиции по п.18.

20. Способ по п.19, где заболевание представляет собой наследственный ангиоотек (НАО).

21. Способ по п.20, где НАО представляет собой НАО 1-го типа, 2-го типа или 3-го типа.

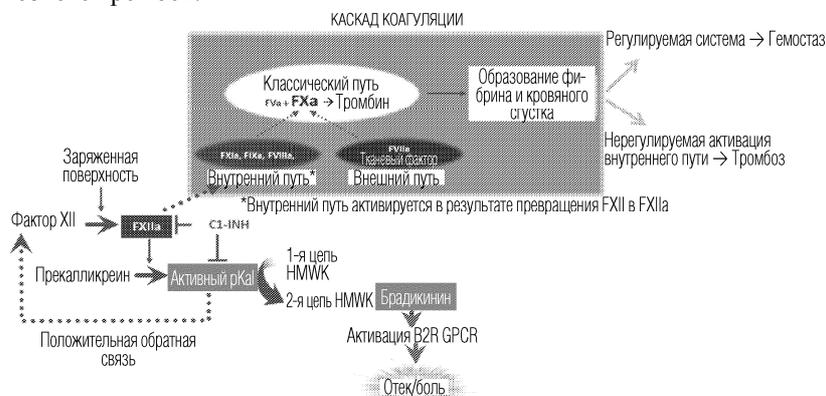
22. Способ по п.19, где заболевание представляет собой глазное заболевание.

23. Способ по п.22, где субъект имеет, предположительно имеет или имеет риск глазного заболева-

ния.

24. Способ по п.23, где глазное заболевание представляет собой макулярный отек, диабетическую ретинопатию, гипертоническую ретинопатию, возрастную макулярную дегенерацию или окклюзию вены сетчатки.

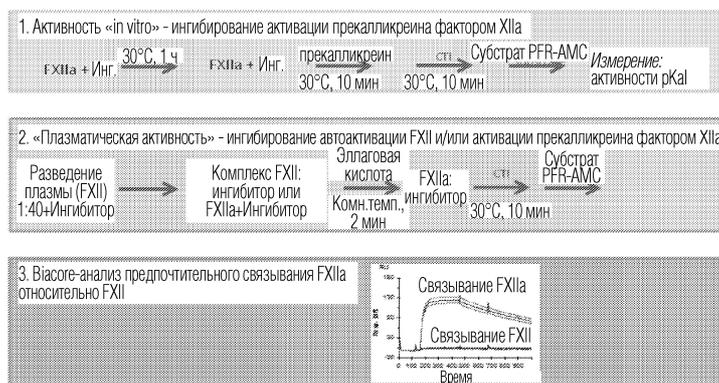
25. Способ по п.19, где заболевание представляет собой тромбоз, тромбоз, ассоциированный с мерцательной аритмией, тромбоз глубоких вен, эмболию легочной артерии, инсульт или образование артериального или венозного тромбов.



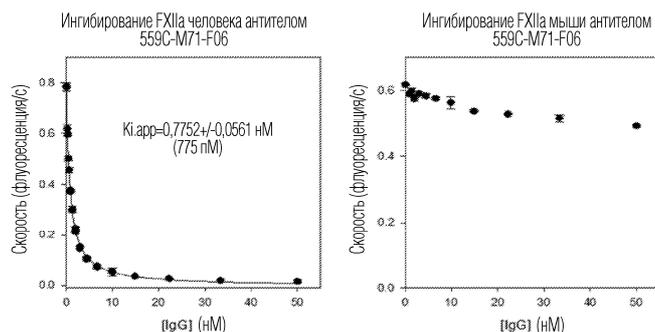
Фиг. 1



Фиг. 2



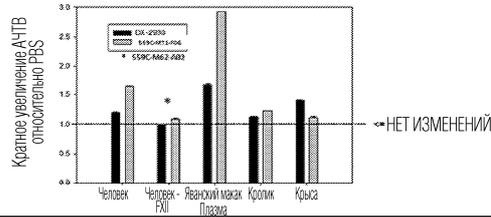
Фиг. 3



Фиг. 4

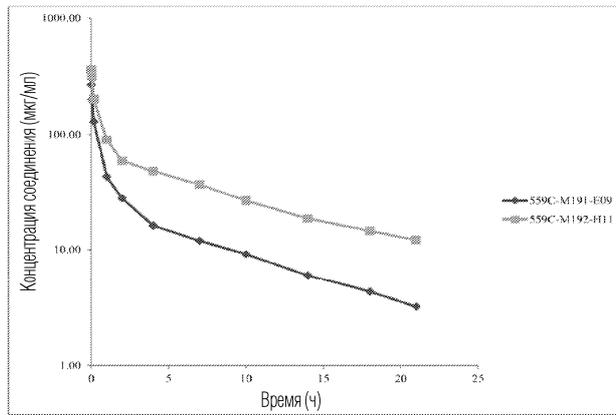
АРТТ

- 1 мкМ IgG или PBS предварительно инкубировали с плазмой в течение ~15 мин, инициировали активацию FXII (фактическая концентрация IgG ~0,5 мкМ) в течение 3 мин
- В момент времени t=0 сек добавляли CaCl₂ и регистрировали коагуляцию
- Время нормализовали на изменение при добавлении PBS ($\frac{\text{время}}{\text{средн}}$) из-за различий в фоновом времени коагуляции для различных образцов плазмы



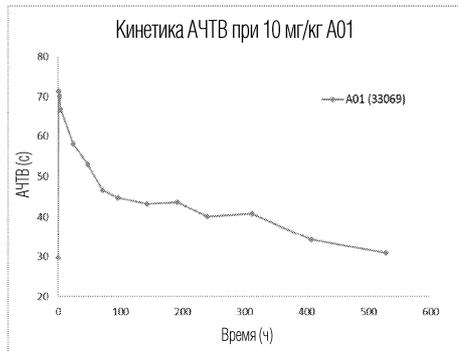
- Некоторая задержка коагуляции в FXII-истощенной плазме - неспецифичное ингибирование или остаточный FXII?
- Измеримая задержка коагуляции у видов - превосходное ингибирование у яванского макака
- Низкая активность M71-F06 у крыс (ожидаемая вследствие плохой перекрестной реактивности с мышью)

Фиг. 5

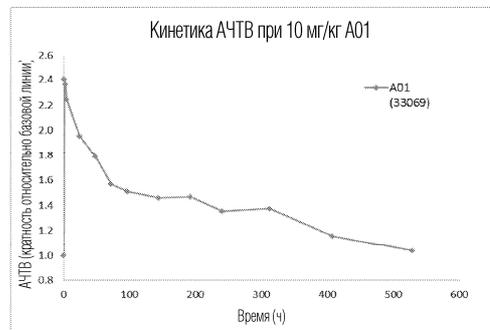


Фиг. 6

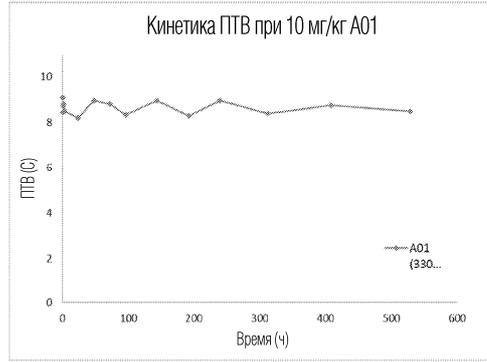
А.



В.

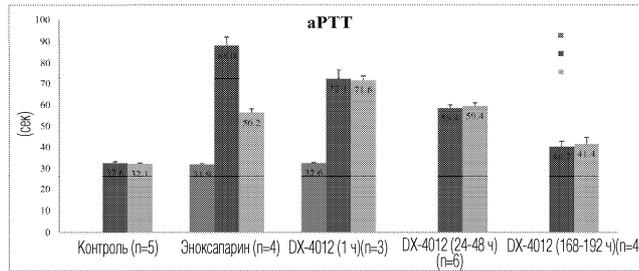


С.

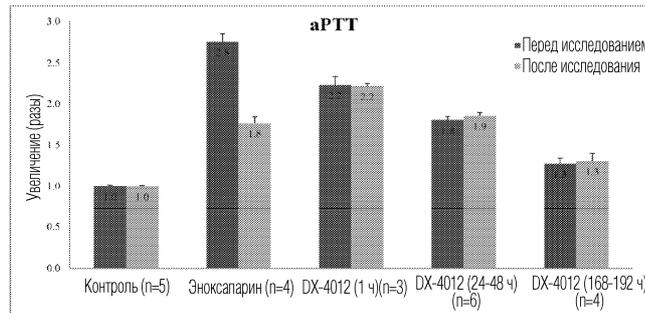


Фиг. 7 (Продолжение)

А.

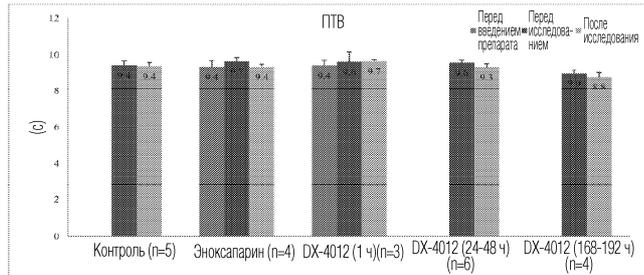


В.

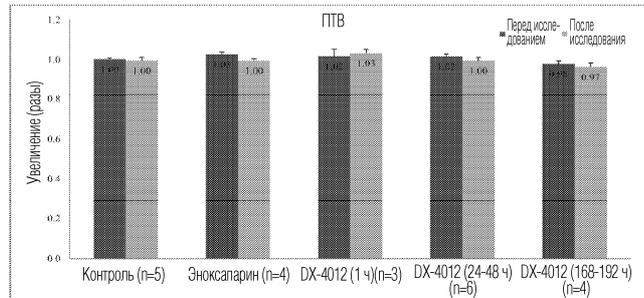


Фиг. 8 (Продолжение)

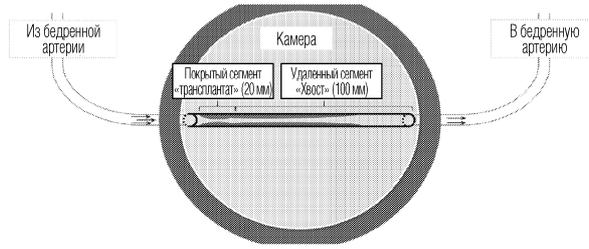
А.



В.

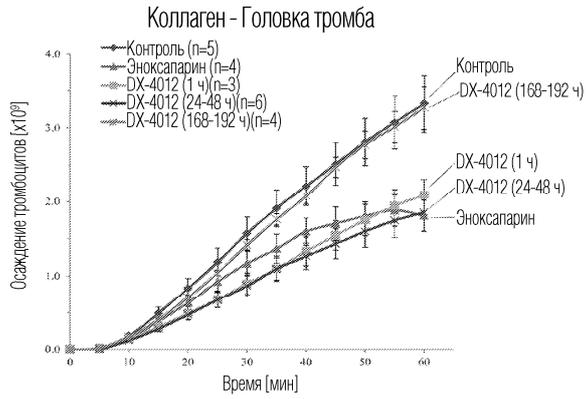


Фиг. 9 (Продолжение)

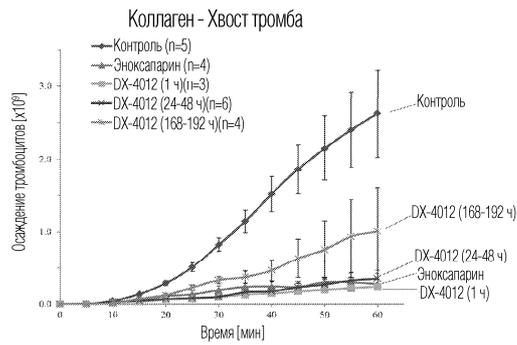


Фиг. 10

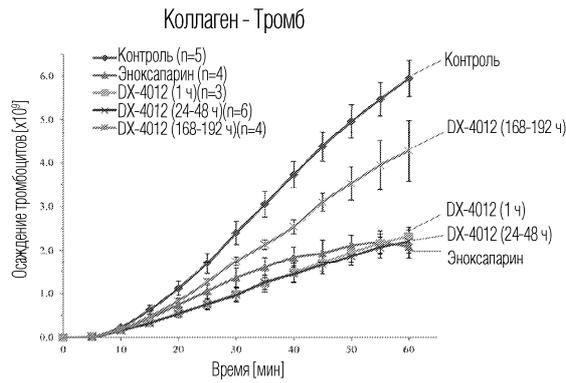
А.



В.

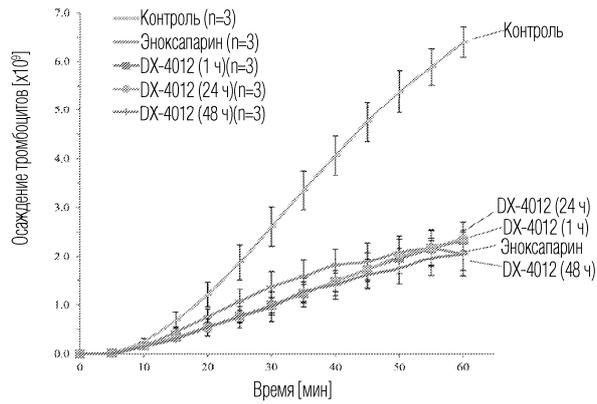


Фиг. 11 (Продолжение)



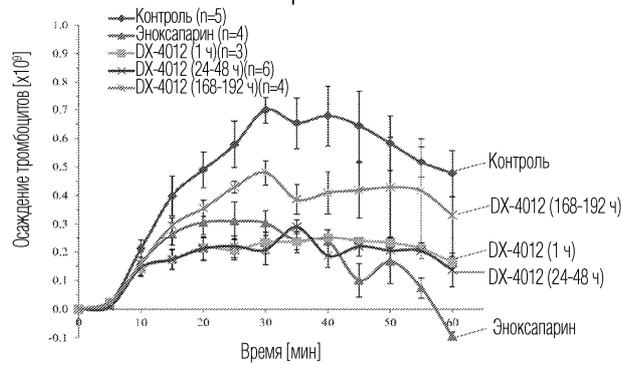
Фиг. 12

Коллаген - Тромб



Фиг. 13

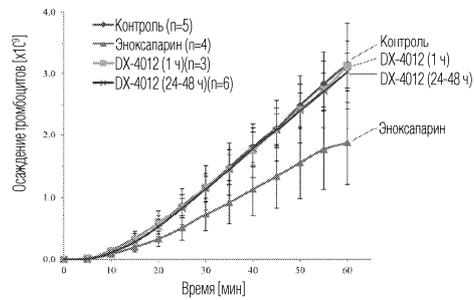
Коллаген - Тромб



Фиг. 14

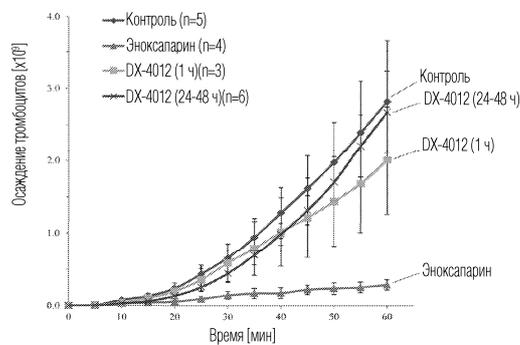
а.

Тканевый фактор - Головка тромба

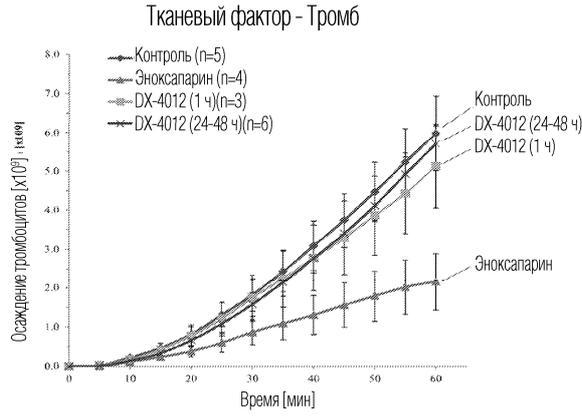


в.

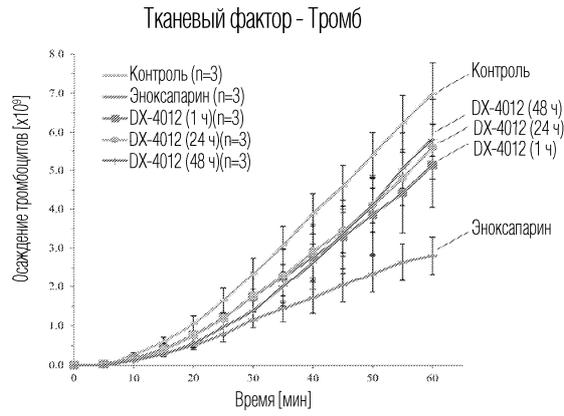
Тканевый фактор - Хвост тромба



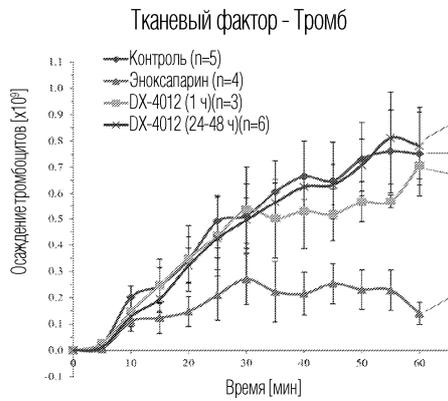
Фиг. 15 (Продолжение)



Фиг. 16

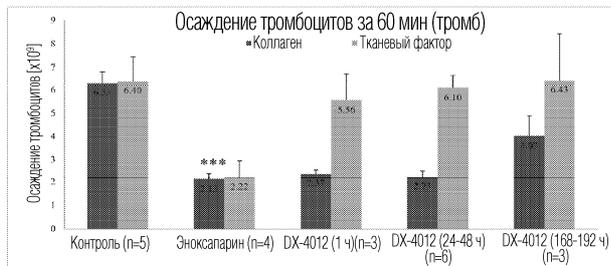


Фиг. 17

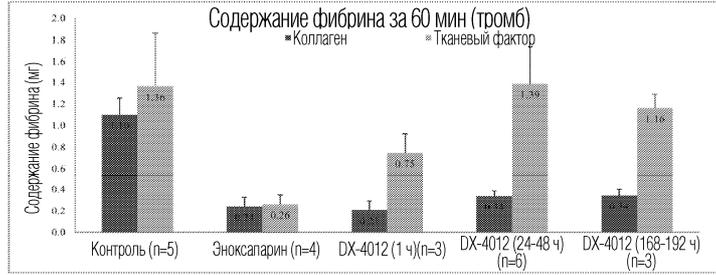


Фиг. 18

A.

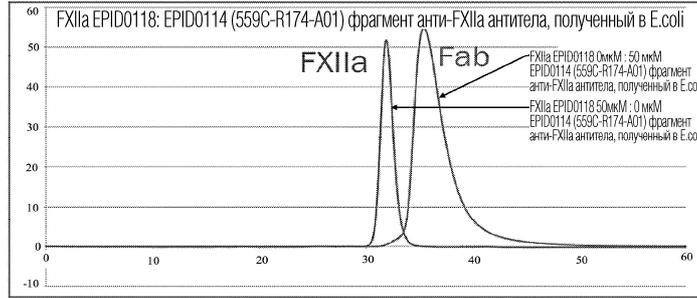


В.

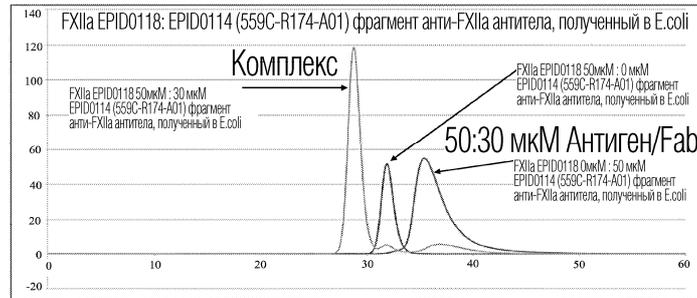


Фиг. 19 (Продолжение)

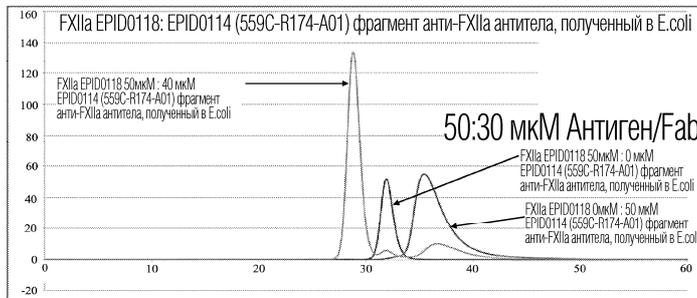
А.



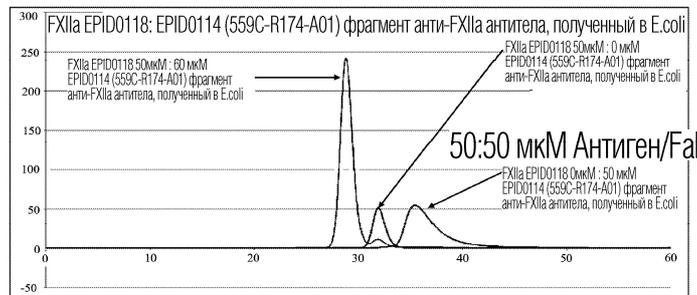
В.

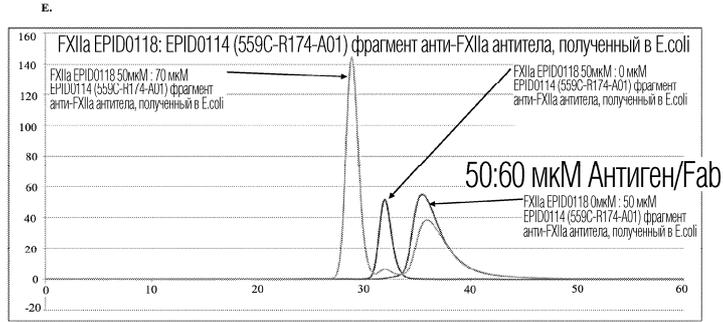


С.



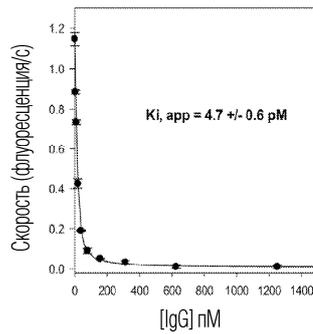
Д.



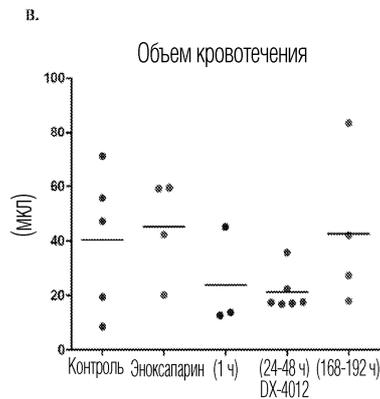
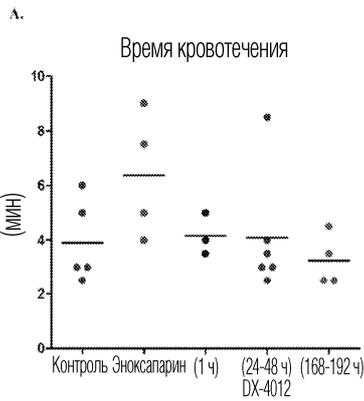


Фиг. 20 (Продолжение)

Ингибирование FXIIa человека антителом 559C-M192-H11



Фиг. 21



Фиг. 22

