

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046649**

(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.04.03**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/40** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201792161**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2016.03.30**

---

**(54) ИНГИБИТОРЫ КАЛЛИКРЕИНОВ ПЛАЗМЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ  
ПРОФИЛАКТИКИ ПРИСТУПА НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО  
ОТЕКА**

---

**(31)** 62/140,289; 62/140,277; 62/214,293

**(32)** 2015.03.30; 2015.03.30; 2015.09.04

**(33)** US

**(43)** 2018.04.30

**(86)** PCT/US2016/024921

**(87)** WO 2016/160926 2016.10.06

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

**(72)** Изобретатель:  
**Чиунг Юнг, Эйделман Берт, Секстон  
Дэниел Дж. (US)**

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

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

FAIR DISCLOSURE WIRE "Dyax Corp. announces positive results from phase 1a clinical trial of DX2930" 25 February 2014 [online] [Retrieved on 20 May 2016 Retrieved from website<URL:http://dialog.proquest.com/professional/docview/1506520567?accountid=157282>especially page 11, para 4; page 11, para 5-6; page 11, para 1; page 1, para 2; page 2, para 7-8

CHYUNG et al. "A phase 1 study investigating DX-2930 in healthy subjects". Ann Allergy Asthma Immunol. October 2014. Vol. 113. No. 4. pp 460-466. especially, whole document.

WO-A1-2014113712

---

**(57)** Настоящее изобретение относится к антителам против калликреина плазмы, связывающимся с активным калликреином плазмы, и способам применения таких антител в профилактике приступа наследственного ангионевротического отека или снижении частоты приступов наследственного ангионевротического отека.

---

**B1**

**046649**

**046649  
B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C. 119 (e) по предварительной патентной заявке США № 62/140277, зарегистрированной 30 марта 2015 года, предварительной патентной заявке США № 62/214293, зарегистрированной 24 сентября 2015 года, и предварительной патентной заявке США № 62/140289, зарегистрированной 30 марта 2015 года, содержание каждой из которых включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

### Уровень техники

Калликреин плазмы является сериновой протеазой, компонентом контактной системы и потенциальной мишенью лекарственных средств при различных воспалительных, сердечнососудистых, инфекционных (сепсис) и онкологических заболеваниях (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). Контактная система активируется фактором XIIa после воздействия чужеродных или отрицательно заряженных поверхностей или на поверхности эндотелиальных клеток под действием пролилкарбокисипептидаз (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). Активация калликреина плазмы усиливает внутренний путь коагуляции через активацию фактора XII посредством обратной связи и усиливает воспалительное посредство продукции провоспалительного нонапептида брадикинина. Как основная кининогеназа в кровотоке, калликреин плазмы, главным образом, отвечает за образование брадикинина в сосудистой системе. Генетическая недостаточность белка-ингибитора C1 (C1-INH), основного природного ингибитора калликреина плазмы, приводит к наследственному ангионевротическому отеку (НАЕ). Пациенты с НАЕ страдают острыми приступами болезненного отека, зачастую вызываемыми неизвестными триггерами (Zuraw B.L. et al., *N Engl J* 359 Med 1027-1036, 2008).

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение частично основано на результатах, полученных в клинических исследованиях, показавших, что дозы DX-2930, антитела, связывающегося с активной формой калликреина плазмы человека, (например, 30 мг, 100 мг, 300 мг или 400 мг, вводимых каждые две недели) демонстрировали неожиданную эффективность в профилактике приступа НАЕ или снижении частоты приступов НАЕ у людей. Кроме того, при лечении DX-2930 не наблюдали признаков дозо-лимитирующей токсичности при введении людям. В целом, результаты, полученные в настоящем исследовании, являлись неожиданными, т.к. DX-2930 является первым полностью специфическим ингибитором калликреина плазмы, демонстрирующим высокую эффективность при лечении НАЕ. Это свидетельствует о том, что калликреин плазмы играет ключевую роль в патогенезе заболевания.

Таким образом, один аспект настоящего изобретения относится к способу профилактики приступа НАЕ или снижению частоты приступов НАЕ (например, НАЕ типа I, II или III), включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела, связывающегося с активной формой калликреина плазмы человека (например, DX-2930), в эффективном количестве (например, приблизительно 30-400 мг, приблизительно 100-400 мг, приблизительно 100-300 мг или приблизительно 300-400 мг). В некоторых вариантах осуществления антитело вводят каждые две-четыре недели по меньшей мере два раза. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят в дозе 300 мг или 400 мг каждые 2-4 недели (например, каждые две недели или каждые четыре недели).

В любом из способов, представленных в настоящем описании, антитело можно вводить посредством подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом-человеком, испытывающим по меньшей мере два приступа НАЕ в год (например, по меньшей мере один приступ НАЕ в течение 6 месяцев перед первым введением, по меньшей мере 2 приступа НАЕ в течение 3 месяцев перед первым введением или по меньшей мере 9 приступов НАЕ в течение 3 месяцев перед первым введением). НАЕ может являться НАЕ типа I или НАЕ типа II. Например, способ, представленный в настоящем описании, предназначен для профилактического лечения НАЕ.

Антитело, используемое в любом из способов, представленных в настоящем описании, может являться антителом (например, полноразмерным антителом или антигенсвязывающим фрагментом), связывающимся с тем же эпитопом, что и DX-2930, или конкурирующим с DX-2930 за связывание с активным калликреином плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит те же CDR тяжелой цепи и легкой цепи. В одном из примеров антитело является DX-2930. Любое из антител, представленных в настоящем описании (например, DX-2930), можно составлять в фармацевтической композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых примерах фармацевтическая композиция содержит фосфат натрия, лимонную кислоту, гистидин, хлорид натрия и Tween 80. В одном из примеров антитело (например, DX-2930) составляют в 30 мМ фосфате натрия, 8,6 мМ лимонной кислоте, 50 мМ гистидине, 90 мМ хлориде натрия и 0,01% Tween 80, pH 6,0.

В других аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения НАЕ (например, типа I, II или III), включающему введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела, связывающегося с активной формой калликреина плазмы человека (например, DX-2930), в эффективном количестве (например, 100-400 мг, 100-300 мг, 150 мг или 300 мг), где антитело DX-2930 вводят в режиме дозирования, включающем период введения нагрузочной дозы (например, вводимой первой каждую неделю, например, в течение по меньшей мере одной недели), период поддержания дозы (например, вводимой впоследствии каждые две-четыре недели) и, необязательно, период последующего наблюдения.

В некоторых вариантах осуществления антитело вводят индивидууму в дозе от 100 до 300 мг (например, 150 мг или 300 мг) в течение периода введения нагрузочной дозы. Период введения нагрузочной дозы может составлять две недели. Антитело можно вводить в день 0, день 7 и день 14 в дозе, например, 150 мг или 300 мг.

Альтернативно или дополнительно, антитело вводят индивидууму в дозе от 100 до 300 мг (например, 150 мг или 300 мг) в течение периода поддержания дозы. Период поддержания дозы может длиться в течение 10 недель. Антитело можно вводить в день 28, день 42, день 56, день 70 и день 84.

В любом из способов, представленных в настоящем описании, способ может дополнительно включать введение индивидууму антитела после периода поддержания дозы один раз каждые две-четыре недели (например, каждые две недели или каждые четыре недели). В некоторых примерах антитело вводят в дозе от 100 до 400 мг (например, от 100 мг до 300 мг, например, 150 мг или 300 мг).

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, представленных в настоящем описании, антитело можно вводить посредством подкожного введения. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является пациентом-человеком, страдающим, предположительно страдающим или имеющим риск приступов НАЕ. Например, способ, представленный в настоящем описании, предназначен для профилактического лечения НАЕ. Индивидуум может являться пациентом-человеком, испытывающим по меньшей мере 2 приступа в год (например, по меньшей мере один приступ за 4 недели) перед лечением. В некоторых вариантах осуществления антитело вводят для профилактики приступа НАЕ или для снижения частоты приступов НАЕ.

В некоторых вариантах осуществления антитело (например, DX-2930) сначала вводят каждую неделю в течение одной, двух или трех недель, а затем вводят каждые две, три или четыре недели. В некоторых вариантах осуществления антитело (например, DX-2930) впоследствии вводят каждые две недели в течение десяти недель. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет по меньшей мере один приступ каждые четыре недели перед первым введением.

Антитело, подлежащее использованию в любом из способов, представленных в настоящем описании, может являться антителом, связывающимся с тем же эпитопом, что и DX-2930, или конкурирующим с DX-2930 за связывание с активным калликреином плазмы человека. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит те же CDR тяжелой цепи и легкой цепи. В одном из примеров антитело является DX-2930.

В объем настоящего изобретения также входят (а) фармацевтические композиции для применения в лечении НАЕ (например, профилактике приступа НАЕ или снижении частоты приступов НАЕ), фармацевтическая композиция, содержащая любые антитела против калликреина, представленные в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтическую композицию вводят индивидууму, следуя любой из схем лечения, представленных в настоящем описании; и (б) применение фармацевтической композиции для производства лекарственного средства для лечения НАЕ. Применение антител для намеченных целей можно осуществлять в соответствии со схемами лечения, представленными в настоящем описании.

Подробности одного или нескольких вариантов осуществления изобретения приведены в описании ниже. Другие признаки или преимущества настоящего изобретения будут очевидны из чертежей и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из формулы изобретения.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1 представлены уровни лекарственного средства DX-2930 в плазме после подкожного введения пациентам с НАЕ в исследовании фазы 1b.

На фиг. 2 представлен флуорогенный анализ активности образцов пациентов с НАЕ из исследования фазы 1b.

На фиг. 3 представлен анализ вестерн-блоттинга SCAT169 в плазме пациентов с НАЕ из исследования фазы 1b.

На фиг. 4 представлен анализ вестерн-блоттинга цитратной плазмы пациентов с НАЕ из исследования фазы 1b.

На фиг. 5 представлен анализ вестерн-блоттинга цитратной плазмы, активированной FXIIIa ex vivo, от пациентов с НАЕ из исследования фазы 1b.

На фиг. 6 представлен период первичной оценки эффективности в случае пациентов в различных исследуемых когортах. А.: когорта 300 мг. В.: когорта 400 мг. Красными столбиками показан интервал, оцениваемый в случае эффективности.

На фиг. 7 показано снижение частоты приступов НАЕ у пациентов, которых лечили 300 мг, 400 мг, комбинированной дозой (300 и 400 мг) или плацебо. Исходный уровень определяли как приступы НАЕ в анамнезе за последние 3 месяца перед введением. Данные включают пациентов с исходной частотой  $\geq 2$  приступов за последние 3 месяца. В дни 8-50 частоты приступов не корректировали по исходным частотам. Процент снижения частоты приступов НАЕ по сравнению с плацебо и значение  $p$  вычислили с учетом смешанной модели повторных измерений с дисперсионным анализом (исходная частота приступов в качестве ковариаты) и с учетом распределения Пуассона.

На фиг. 8 представлена частота приступов НАЕ у индивидуумов, которым вводили плацебо. По оси

X отложен номер дней исследований.

На фиг. 9 представлена средняя концентрация DX-2930 и частота приступов НАЕ после дозы 30 мг.

На фиг. 10 представлена средняя концентрация DX-2930 и частота приступов НАЕ после дозы 100 мг.

На фиг. 11 представлена средняя концентрация DX-2930 и частота приступов НАЕ после дозы 300 мг.

На фиг. 12 представлена средняя концентрация DX-2930 и частота приступов НАЕ после дозы 400 мг.

За исключением одного пациента, которому вводили только одну дозу (для получения средней фармакокинетической кривой).

На фиг. 13 представлена концентрация DX-2930 и приступы НАЕ у пациентов с частотой приступов  $\geq 9$  приступов/3 месяца в анамнезе. А.: пациент, которому вводили плацебо. В.: пациент, которому вводили 300 мг. и С.-Ф.: пациенты, которым вводили 400 мг.

На фиг. 14 представлен пример схемы лечения, включающей период введения нагрузочной дозы и период поддержания дозы, за которыми может следовать увеличенный период лечения или период отмывки.

### Подробное описание

#### Определения

Для удобства перед дальнейшим описанием настоящего изобретения приводят определения конкретных терминов, используемых в описании, примерах и формуле изобретения. Другие термины определены так, как они указаны в описании.

Формы в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст четко не указывает на иное.

Термин "антитело" относится к белку, включающему по меньшей мере один переменный домен иммуноглобулина (вариабельную область) или последовательность переменного домена иммуноглобулина (вариабельной области). Например, антитело может включать переменную область тяжелой (H) цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как  $V_H$  или  $H_V$ ) и переменную область легкой (L) цепи (сокращенно обозначаемую в настоящем описании как  $V_L$  или  $L_V$ ). В другом примере антитело включает две переменные области тяжелой (H) цепи и две переменные области легкой (L) цепи. Термин "антитело" включает антигенсвязывающие фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела, Fab- и sFab-фрагменты,  $F(ab')_2$ , Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, scFv и фрагменты доменных антител (dAb) (de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39)), а также полные антитела. Антитело может иметь структурные признаки IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипов). Антитела могут быть из любого источника, но предпочтительными являются антитела приматов (человека и не являющегося человеком примата) и приматизированные антитела.

Области  $V_H$  и  $V_L$  можно дополнительно подразделять на гипервариабельные области, обозначаемые как "определяющие комплементарность области" ("CDR"), перемежающиеся с более консервативными областями, обозначаемыми как "каркасные области" ("FR"). Определяют протяженность каркасной области и CDR (см., Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, и Chothia, C et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). В настоящем описании используют определения Kabat. Каждая  $V_H$  и  $V_L$ , как правило, состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В рамках изобретения термин "последовательность переменного домена иммуноглобулина" относится к аминокислотной последовательности, которая может образовывать структуру переменного домена иммуноглобулина таким образом, что одна или несколько областей CDR расположены в конформации, подходящей для антигенсвязывающего участка. Например, последовательность может включать всю или часть аминокислотной последовательности природного переменного домена. Например, в последовательности могут отсутствовать одна, две или более N- или C-концевых аминокислот, внутренних аминокислот, она может включать одну или несколько инсерций или дополнительных концевых аминокислот или может включать другие изменения. В одном из вариантов осуществления полипептид, включающий последовательность переменного домена иммуноглобулина, можно связывать с другой последовательностью переменного домена иммуноглобулина для получения антигенсвязывающего участка, например, структуры, предпочтительно взаимодействующей с калликреином плазмы.

Цепь  $V_H$  или  $V_L$  антитела может дополнительно включать всю или часть константной области тяжелой или легкой цепи, чтобы, таким образом, образовывать тяжелую или легкую цепь иммуноглобулина, соответственно. В одном из вариантов осуществления антитело является тетрамером из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина, где тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина соединены, например, дисульфидными связями. В IgG константная область тяжелой цепи включает три иммуноглобулиновых домена, CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи включает домен CL. Вариабельная область тяжелых и легких цепей содержит связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител, как правило, опосредуют связывание антитела с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Легкие цепи иммуноглобулина могут иметь типы каппа или лямбда. В одном из вариантов осуществления антитело является гликозили-

рованным. Антитело может являться функциональным в отношении антителозависимой цитотоксичности и/или комплемент-опосредованной цитотоксичности.

Один или несколько областей антитела могут являться человеческими или, по существу, человеческими. Например, одна или несколько вариабельных областей могут являться человеческими или, по существу, человеческими. Например, одна или несколько CDR могут являться человеческими, например, CDR1 HC, CDR2 HC, CDR3 HC, CDR1 LC, CDR2 LC и/или CDR3 LC. Каждая из CDR легкой цепи (LC) и/или тяжелой цепи (HC) может являться человеческой. CDR3 HC может являться человеческой. Одна или несколько каркасных областей могут являться человеческими, например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4 HC и/или LC. Например, Fc-область может являться человеческой. В одном из вариантов осуществления все каркасные области являются человеческими, например, полученными из соматической клетки человека, например, гематопоэтической клетки, продуцирующей иммуноглобулина, или негематопоэтической клетки. В одном из вариантов осуществления последовательности человека являются последовательностями зародышевой линии, например, кодируемыми нуклеиновой кислотой зародышевой линии. В одном из вариантов осуществления каркасные (FR) остатки выбранного Fab можно преобразовывать в тип аминокислоты соответствующего остатка в большинстве схожих генов примата зародышевой линии зародышевой линии, особенно, гена человека зародышевой линии. Одна или несколько константных областей могут являться человеческой или, по существу, человеческой. Например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 или 100% вариабельного домена иммуноглобулина, константной области, константных доменов (CH1, CH2, CH3 и/или CL1) или целого антитела могут являться человеческими или, по существу, человеческими.

Все или часть антитела может кодироваться геном иммуноглобулина или его сегментом. Примеры генов иммуноглобулина человека включают гены константной области каппа, лямбда, альфа (IgA1 и IgA2), гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эпсилон и мю, а также многие гены вариабельной области иммуноглобулина. Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулина (приблизительно 25 КДа или приблизительно 214 аминокислот) кодируются геном вариабельной области на NH<sub>2</sub>-конце (приблизительно 110 аминокислот) и геном константной области каппа или лямбда на COOH-конце. Полноразмерные "тяжелые цепи" иммуноглобулина (приблизительно 50 КДа или приблизительно 446 аминокислот), аналогично, кодируются геном вариабельной области (приблизительно 116 аминокислот) и одним из других указанных выше генов константной области, например, гамма (кодирующего приблизительно 330 аминокислот). Длина HC человека значительно варьируется, т.к. размер CDR3 HC варьируется от приблизительно 3 остатков аминокислот до более 35 остатков аминокислот.

Термин "антигенсвязывающий фрагмент" полноразмерного антитела относится к одному или нескольким фрагментам полноразмерного антитела, сохраняющим способность специфически связываться с интересующей мишенью. Примеры связывающих фрагментов, входящих в термин "антигенсвязывающий фрагмент" полноразмерного антитела и сохраняющих функциональность, включают (i) Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) F (ab')<sub>2</sub>-фрагмент, бивалентный фрагмент, включающий два Fab-фрагмента, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) dAb-фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), состоящий из домена VH; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединять, используя рекомбинантные способы, с помощью синтетического линкера, позволяющего получать их в виде единой белковой цепи, в которой области VL и VH спаривают для образования моновалентных молекул, известных как одноцепочечный Fv (scFv). См., например, патенты США №№ 5260203, 4946778 и 4881175; Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

Фрагменты антител можно получать любым подходящим способом, включая общепринятые способы, известные специалистам в этой области. Термин "моноспецифическое антитело" относится к антителу, проявляющему одну специфичность связывания и аффинность к конкретной мишени, например, эпитопу. В рамках изобретения этот термин включает термины "моноклональное антитело" или "композицию моноклонального антитела", относящиеся к препарату антител или их фрагментов с одной молекулярной композицией, независимо от способа получения антитела.

Антитела "подвергают модификации на уровне генов зародышевой линии", возвращая одну или несколько аминокислот, не относящихся к зародышевой линии, в каркасных областях в соответствующие аминокислоты антитела зародышевой линии при условии, что связывающие свойства, по существу, сохраняются.

Константа ингибирования ( $K_i$ ) представляет собой меру активности ингибитора; она представляет собой концентрацию ингибитора, необходимую для снижения активности фермента наполовину, и не зависит от концентраций фермента или субстрата. Кажущуюся  $K_i$  ( $K_{i,app}$ ) получают при различных концентрациях субстрата посредством измерения ингибиторного эффекта различных концентраций ингибитора (например, ингибиторного связывающего белка) на степень реакции (например, активность фермента); аппроксимации изменения константы скорости реакции псевдо-первого порядка как функции концентрации ингибитора к уравнению Моррисона (уравнению 1) приводит к оценки значения кажущейся

$K_i$ ,  $K_i$  получают из свободного члена, получаемого при линейном регрессионном анализе графика  $K_{i,app}$  относительно концентрации субстрата.

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

Уравнение 1.

Где  $v$ =измеряемая скорость;

$v_o$ =скорость в отсутствие ингибитора;

$K_{i,app}$ =кажущаяся константа ингибирования;

$I$ =общая концентрация ингибитора; и

$E$ =общая концентрация фермента.

В рамках изобретения термин "аффинность связывания" относится к кажущейся константе ассоциации или  $K_A$ .  $K_A$  противоположна константе диссоциации ( $K_D$ ). Связывающееся антитело, например, может иметь аффинность связывания по меньшей мере  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  и  $10^{11}$   $M^{-1}$  для конкретной молекулы-мишени, например, калликреина плазмы. О более аффинном связывании связывающего антитела с первой мишенью относительно второй мишени может свидетельствовать более высокая  $K_A$  (или меньшее числовое значение  $K_D$ ) для связывания первой мишени, чем  $K_A$  (или числовое значение  $K_D$ ) для связывания второй мишени. В таких случаях связывающее антитело имеет специфичность для первой мишени (например, белка в первой конформации или его миметика) относительно второй мишени (например, того же белка во второй конформации или его миметика; или второго белка). Различия аффинности связывания (например, в случае специфичности или других сравнений) могут являться 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.

Аффинность связывания можно определять множеством способов, включая равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с использованием флуоресцентного анализа). Примером условий для оценки аффинности связывания является буфер HBS-P (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005 об./об.% поверхностно-активного вещества P20). Эти способы можно использовать для измерения концентрации связанного и свободного связывающего белка как функции концентрации связывающего белка (или мишени). Концентрация связанного связывающего белка ([Связанного]) относится к концентрации свободного связывающего белка ([Свободного]) и концентрации участков связывания для связывающего белка на мишени, где (N) является количеством участков связывания на молекулу мишень, в соответствии со следующим уравнением:

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

Не всегда обязательно точно определять  $K_A$ , т.к. иногда достаточно осуществлять количественное измерение аффинности, например, определяемой способом, таким как ELISA или анализ FACS, она пропорциональна  $K_A$  и, таким образом, ее можно использовать для сравнения, такого как определение, является ли более высокая аффинность, например, в 2 раза более высокой, для осуществления качественного измерения аффинности, или для получения вывода об аффинности, например, по активности в функциональном анализе, например, анализе *in vitro* или *in vivo*.

Термин "связывающее антитело" (или термин "связывающий белок", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо) относится к антителу, которое может взаимодействовать с молекулой-мишенью. Этот термин используют взаимозаменяемо с термином "лиганд". Термин "антитело, связывающееся с калликреином плазмы" относится к антителу, которое может взаимодействовать (например, связываться) с калликреином плазмы, и включает, в частности, антитела, преимущественно или специфически связывающиеся и/или ингибирующие калликреин плазмы. Антитело ингибирует калликреин плазмы, если оно вызывает снижение активности калликреина плазмы по сравнению с активностью калликреина плазмы в отсутствие антитела и в тех же условиях.

"Консервативная аминокислотная замена" является заменой, при которой аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. В этой области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи. Эти семейства включают аминокислоты с основными боковыми цепями (например, лизин, аргинин, гистидин), кислыми боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Один или несколько аминокислотных остатков каркаса и/или CDR связывающего белка могут включать одну или несколько мутаций (например, замен (например, консервативных замен или замен незаменимых аминокислот), инсерций или делеций) относительно связывающего белка, представлен-

ного в настоящем описании. Белок, связывающий калликреин плазмы, может иметь мутации (например, замены (например, консервативные замены или замены незаменимых аминокислот), инсерций или делеций) (например, по меньшей мере одну, две, три или четыре и/или менее 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 мутаций) относительно связывающего белка, представленного в настоящем описании, например, мутации, не имеющие значительного эффекта в отношении функции белка. Мутации могут присутствовать в каркасных областях, CDR и/или константных областях. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в каркасной области. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в CDR. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в константной области. То, является ли переносимой конкретная замена, или нет, т.е. будет ли иметь место неблагоприятный эффект в отношении биологических свойств, таких как связывающая активность, можно прогнозировать, например, посредством оценки того, является ли мутация консервативной, или способом по Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310.

"По существу, человеческая" вариабельная область иммуноглобулина является вариабельной областью иммуноглобулина, включающей достаточное количество положений аминокислот каркаса человека таким образом, что вариабельная область иммуноглобулина не вызывает иммуногенный ответ у нормального человека. "По существу, человеческое" антитело является антителом, включающим достаточное количество положений аминокислот человека таким образом, что антитело не вызывает иммуногенный ответ у нормального человека.

Термин "эпитоп" относится к участку на соединении-мишени, связанному связывающим белком (например, антителом, таким как Fab или полноразмерным антителом). В случае, если соединение-мишень является белком, участок может полностью состоять из аминокислотных компонентов, полностью состоять из химических модификаций аминокислот белка (например, гликозильных остатков) или состоять из их комбинаций. Перекрывающиеся эпитопы включают по меньшей мере один распространенный аминокислотный остаток, гликозильную группу, фосфатную группу, сульфатную группу или другой молекулярный признак.

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

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

Вычисления "гомологии" или "идентичности последовательности" между двумя последовательностями (эти термины в настоящем описании используют взаимозаменяемо) осуществляют следующим образом. Последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например, можно включать пропуски в одну или обе из первой и второй аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания и в целях сравнения можно пренебрегать негомологичными последовательностями). Оптимальное выравнивание определяют по лучшим баллам при использовании программы GAP в пакете программ GCG с матрицей замен Blossum 62 со штрафом за пропуск 12, штрафом за увеличение пропуска 4 и штрафом за пропуск со сдвигом рамки считывания 5. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих положениях аминокислот или положениях нуклеотидов. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении (в рамках изобретения "идентичность" аминокислоты или нуклеиновой кислоты эквивалентна "гомологии" аминокислоты или нуклеиновой кислоты). Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей.

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

"Гуманизированная" вариабельная область иммуноглобулина является вариабельной областью иммуноглобулина, модифицированной так, чтобы она включала достаточное количество положений аминокислот

кислот каркаса человека таким образом, что вариабельная область иммуноглобулина не вызывает иммунный ответ у нормального человека. Описания "гуманизированных" иммуноглобулинов включают, например, патенты США №№ 6407213 и 5693762.

Термин "выделенное" антитело относится к антителу, отделенному по меньшей мере от 90% по меньшей мере одного компонента природного образца, из которого можно получать выделенное антитело. Антитела могут иметь, "по меньшей мере", конкретную степень чистоты, если интересующая молекула или популяция молекул является по меньшей мере на 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 или 99% чистой по массе.

Термин "пациент", "индивидуум" или "хозяин" (эти термины используют взаимозаменяемо), подлежащий лечению способом по настоящему изобретению, может означать человека или не являющегося человеком животного.

Термины "прекалликреин" и "прекалликреин плазмы" в настоящем описании используют взаимозаменяемо, и они относятся к форме зимогена активного калликреина плазмы, также известного как прекалликреин.

В рамках изобретения термин "по существу, идентичный" (или "по существу, гомологичный") используют в настоящем описании для обозначения первой аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты, содержащей достаточное количество идентичных или эквивалентных (например, со схожей боковой цепью, например, консервативными заменами аминокислот) аминокислотных остатков или нуклеотидов относительно второй последовательности аминокислот или последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, что первая и вторая последовательности аминокислот или последовательности нуклеиновой кислоты имеют (или кодируют белки, имеющие) схожие активности, например, связывающую активность, предпочтительность связывания или биологическую активность. В случае антител второе антитело имеет ту же специфичность и имеет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 25%, или по меньшей мере 10% аффинности относительно того же антигена.

Последовательности, схожие или гомологичные (например, по меньшей мере приблизительно на 8 5% идентичности последовательности) последовательностям, представленным в настоящем описании, также являются частью настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательности может составлять приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, может иметь идентичность последовательности приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более относительно антитела, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, может иметь идентичность последовательности приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более в каркасных областях HC и/или LC (например, FR 1, 2, 3 и/или 4 HC и/или LC) относительно антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930). В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, может иметь идентичность последовательности приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более в CDR HC и/или LC (например, CDR1, 2 и/или 3 HC и/или LC) относительно антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930). В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, может иметь идентичность последовательности приблизительно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более в константной области (например, CH1, CH2, CH3 и/или CL1) относительно антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930).

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

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

"Терапевтически эффективная доза" предпочтительно модулирует измеримый параметр, например, активность калликреина плазмы, в статистически значимой степени или по меньшей мере приблизительно на 20%, более предпочтительно - по меньшей мере приблизительно на 40%, даже более предпочтительно - по меньшей мере приблизительно на 60%, и еще более предпочтительно - по меньшей мере приблизительно на 80% относительно индивидуумов, не подвергнутых лечению. Способность соединения модулировать измеримый параметр, например, ассоциированный с заболеванием параметр, можно оценивать в системе модели на животных, прогностической в отношении эффективности при нарушениях и



состояниях человека. Альтернативно, это свойство композиции можно оценивать посредством исследования способности соединения модулировать параметр *in vitro*.

В рамках изобретения термин "лечение" относится к использованию или введению композиции, включающей одно или несколько активных средств, индивидууму, имеющему аллергическое заболевание, симптом аллергического заболевания или предрасположенность к аллергическому заболеванию, с целью излечения, лечения, облегчения, изменения, улучшения или воздействия на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию. Термин "профилактическое лечение" относится к лечению, направленному к защите индивидуума или снижению риска заболевания, которому подвергают, или могут подвергать, его или ее.

Термин "профилактика" заболевания у индивидуума относится к подверганию индивидуума фармацевтическому лечению, например, введению лекарственного средства, таким образом, что подвергают профилактике по меньшей мере один симптом заболевания, т.е. введение осуществляют при клинической манифестации нежелательного состояния (например, заболевания или другого нежелательного состояния животного-хозяина), т.е. оно защищает хозяина от развития нежелательного состояния. "Профилактику" заболевания также можно обозначать как "профилактическое лечение".

Термин "профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в необходимых дозах и в течение периодов времени для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, т.к. профилактическую дозу используют у индивидуумов до развития заболевания или на его ранней стадии, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

Антитела, специфические для калликреина плазмы.

Антитела, связывающие калликреин плазмы, для применения в способах, представленных в настоящем описании, могут являться полноразмерными (например, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (например, IgA1, IgA2), IgD и IgE) или могут включать только антигенсвязывающий фрагмент (например, Fab-, F(ab')<sub>2</sub>- или scFv-фрагмент). Связывающее антитело может включать две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина или может являться одноцепочечным антителом. Антитела, связывающие калликреин плазмы, могут являться рекомбинантными белками, такими как гуманизированные антитела, антитела с пересаженными CDR, химерные, деиммунизированные или полученные *in vitro* антитела и, необязательно, могут включать константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. В одном из вариантов осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, является моноклональным антителом.

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

Антитело может включать один или несколько из следующих признаков: (a) CDR человека или каркасную область человека; (b) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина содержит одну или несколько (например, 1, 2 или 3) CDR, являющихся по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичными CDR переменного домена HC, представленной в настоящем описании; (c) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина содержит одну или несколько (например, 1, 2 или 3) CDR, являющихся по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичными CDR переменного домена LC, представленной в настоящем описании; (d) последовательность LC переменного домена иммуноглобулина является по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной переменному домену LC, представленному в настоящем описании (например, в целом или в каркасных областях или CDR); (e) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина является по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной переменному домену HC, представленному в настоящем описании (например, в целом или в каркасных областях или CDR); (f) антитело связывается с эпитопом, связываемым антителом, представленным в настоящем описании, или конкурирует за связывание с антителом, представленным в настоящем описании; (g) CDR примата или каркасная область примата; (h) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина содержит CDR1, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более чем 2 или 3 аминокислотами от CDR1 переменного домена HC, представленного в настоящем описании; (i) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина содержит CDR2, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более, чем 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислотами от CDR2 переменного домена HC, представленного в настоящем описании; (j) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина содержит CDR3, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более, чем 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотами от CDR3 переменного домена HC, представленного в настоящем описании; (k) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина содержит CDR1, отличающуюся по меньшей

мере одной аминокислотой, но не более, чем 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от CDR1 переменного домена LC, представленного в настоящем описании; (l) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина содержит CDR2, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более, чем 2, 3 или 4 аминокислотами от CDR2 переменного домена LC, представленного в настоящем описании; (m) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина содержит CDR3, отличающуюся по меньшей мере одной аминокислотой, но не более, чем 2, 3, 4 или 5 аминокислотами от CDR3 переменного домена LC, представленного в настоящем описании; (n) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина отличается по меньшей мере одной аминокислотой, но не более, чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами от переменного домена LC, представленного в настоящем описании (например, в целом или в каркасных областях или CDR); и (o) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина отличается по меньшей мере одной аминокислотой, но не более, чем 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотами от переменного домена HC, представленного в настоящем описании (например, в целом или в каркасных областях или CDR).

Белок, связывающий калликреин плазмы, может являться выделенным антителом (например, по меньшей мере на 70, 80, 90, 95 или 99% не содержащим другие белки). В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, или его композиция выделены из фрагментов расщепленного антитела (например, DX-2930), являющихся неактивными или частично активными (например, связывают калликреин плазмы с  $K_{i,app}$  5000 нМ или более) по сравнению с антителом, связывающим калликреин плазмы. Например, антитело, связывающее калликреин плазмы, по меньшей мере на 70% не содержит фрагменты расщепленного антитела; в других вариантах осуществления связывающее антитело по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 99% или даже 100% не содержит фрагменты расщепленного антитела, являющимися неактивными или частично активными.

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

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

В определенных вариантах осуществления антитело связывается с активным центром или вблизи активного центра каталитического домена калликреина плазмы или его фрагментом или связывается с эпитопом, перекрывающимся с активным центром калликреина плазмы.

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

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

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

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

Антитела, связывающие калликреин плазмы, могут иметь последовательности переменного домена HC и LC, включенные единый полипептид (например, scFv) или разные полипептиды (например, IgG или Fab).

В одном из вариантов осуществления последовательности переменного домена HC и LC являются компонентами одной полипептидной цепи. В другом аспекте последовательности переменного домена

НС и LC являются компонентами разных полипептидных цепей. Например, антитело является IgG, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитело может являться растворимым Fab. В других вариантах осуществления антитело включает Fab<sub>2</sub>, scFv, минитело, слитый белок scFv::Fc, слитый белок Fab::HSA, слитый белок HSA: :Fab, слитый белок Fab: :HSA: :Fab или другую молекулу, содержащую антигенраспознающий участок одного из связывающих белков, представленных в настоящем описании. Области V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> этих Fab можно получать в виде IgG, Fab, Fab<sub>2</sub>, Fab'<sub>2</sub>, scFv, пегилированного Fab, пегилированного scFv, пегилированного Fab<sub>2</sub>, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA+VH::CH1, HSA::LC+VH::CH1 или другой подходящей конструкции.

В одном из вариантов осуществления антитело является антителом человека или гуманизированным антителом или является неиммуногенным для человека. Например, антитело включает одну или несколько каркасных областей антитела человека, например, все каркасные области человека, или каркасные области, по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичные каркасным областям человека. В одном из вариантов осуществления антитело включает Fc-домен человека или Fc-домен, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичный Fc-домену человека.

В одном из вариантов осуществления антитело является антителом примата или приматизированным антителом или является неиммуногенным для человека. Например, антитело включает одну или несколько каркасных областей антитела примата, например, все каркасные области примата или каркасные области, по меньшей мере на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичные каркасным областям примата. В одном из вариантов осуществления антитело включает Fc-домен примата или Fc-домен, по меньшей мере на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичный Fc-домену примата. Термин "примат" включает людей (*Homo sapiens*), шимпанзе (*Pan troglodytes* и *Pan paniscus* (бонобо)), горилл (*Gorilla gorilla*), гиббонов, обезьян, лемуров, мадагаскарскую руконожку (*Daubentonia madagascariensis*) и долгопятов.

В некоторых вариантах осуществления аффинность антитела примата к калликреину плазмы человека отличается K<sub>D</sub> менее 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 нМ, например, менее 10 нМ, менее 1 нМ или менее 0,5 нМ.

В определенных вариантах осуществления антитело не включает последовательности мышей или кроликов (например, не является антителом мыши или кролика).

В некоторых вариантах осуществления антитело, используемое в способах, представленных в настоящем описании, может являться DX-2930, как представлено в настоящем описании, или его функциональным вариантом, или антителом, связывающимся с тем же эпитопом, что и DX-2930, или конкурирующим с DX-2930 за связывание с активным калликреином плазмы.

В одном из примеров функциональный вариант DX-2930 содержит те же определяющие комплементарности области (CDR), что и DX-2930, определяемые тем же способом. В другом примере функциональные варианты DX-2930 могут содержать одну или несколько мутаций (например, консервативных замен) в FR V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> по сравнению с таковыми в V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> DX-2930. Предпочтительно, такие мутации не имеют место в остатках, которые, как прогнозируют, взаимодействуют с одним или несколькими CDR, которые можно определять общепринятыми способами. В других вариантах осуществления функциональные варианты, представленные в настоящем описании, содержат одну или несколько мутаций (например, 1, 2 или 3) в одной или нескольких областях CDR DX-2930. Предпочтительно, такие функциональные варианты сохраняют те же области/остатки, отвечающие за связывание антигена, что и в родительском антителе. В других вариантах осуществления функциональный вариант DX-2930 может содержать цепь V<sub>H</sub>, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную таковой у V<sub>H</sub> DX-2930 и/или цепи V<sub>L</sub>, имеющей аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85% (например, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичную таковой у V<sub>L</sub> DX-2930. Эти варианты способны связываться с активной формой калликреина плазмы и, предпочтительно, не связываются с прекалликреином.

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

В некоторых вариантах осуществления антитело, используемое в способах и композициях, представленных в настоящем описании, может являться антителом DX-2930. Полноразмерные последовательности и последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи DX-2930 представлены ниже, при этом сигнальные последовательности отмечены курсивом. CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты (с учетом схемы нумерации Kabat).

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

MGWSCILFLVATATGAHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAP  
 GKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAYRRIGVPR  
RDEFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP  
 CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
 EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRE  
 EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 1)

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

MGWSCILFLVATATGAHSDIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQKPG  
 KAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEI  
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность варибельного домена тяжелой цепи DX-2930.

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITV  
YADSVKGRRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVTVSS  
 (SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность варибельного домена легкой цепи DX-2930.

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

Таблица 1

CDR DX-2930

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

#### Получение антитела

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

Последовательность, кодирующую интересующее антитело, например, DX-2930, можно поддерживать в векторе в клетке-хозяине, а затем клетку-хозяина можно выращивать и замораживать для последующего использования. Альтернативно, полинуклеотидную последовательность можно использовать для генетической манипуляции для "гуманизации" антитела или для улучшения аффинности (созревание аффинности) или других характеристик антитела. Например, константную область можно конструировать так, чтобы она больше напоминала константные области человека во избежание иммунного ответа, если антитело используют в клинических испытаниях и лечении людей. Желательной может являться генетическая манипуляция с последовательностью антитела для достижения большей аффинности к антигену-мишени и большей эффективности в ингибировании активности PKa1. Специалисту в этой области очевидно, что можно осуществлять одно или несколько изменений полинуклеотидов в антителе и все равно сохранять его специфичность связывания с антигеном-мишенью.

В других вариантах осуществления полностью человеческие антитела можно получать с использованием коммерчески доступных мышей, созданных для экспрессии специфических иммуноглобулиновых белков человека. Трансгенных животных, созданных для достижения более желательного (например, полностью человеческие антитела) или более устойчивого иммунного ответа, также можно использовать для получения гуманизированных антител или антител человека. Примерами такой технологии

являются Xenomouse<sup>RTM</sup> от Amgen, Inc. (Fremont, Calif.) и HuMAb-Mouse<sup>RTM</sup> и TC Mouse<sup>TM</sup> от Medarex, Inc. (Princeton, N.J.). Альтернативно, антитела можно получать рекомбинантно с помощью фагового дисплея или дрожжевой технологии. См., например, патенты США №№ 5565332; 5580717; 5733743 и 6265150; и Winter et al. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455. Альтернативно, можно использовать технологию фагового дисплея (McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-553) для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro* из репертуара генов переменных (V) доменов иммуноглобулина от неиммунизированных доноров.

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

Генетически сконструированные антитела, такие как гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела и биспецифические антитела, можно получать с помощью, например, общепринятой рекомбинантной технологии. В одном из примеров ДНК, кодирующую моноклональные антитела, специфические для антигена-мишени, легко можно выделять или синтезировать. ДНК можно помещать в один или несколько экспрессирующих векторов, с помощью которых затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьян, клетки яичника китайского хомяка (CHO) или миеломные клетки, которые в ином случае не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для осуществления синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. См., например, публикацию РСТ № WO 87/04462. Затем ДНК можно модифицировать, например, заменяя кодирующую последовательность константными доменами тяжелой и легкой цепи человека вместо гомологичных последовательностей мыши, Morrison et al. (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, или посредством ковалентного соединения с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида. Таким образом, можно получать генетически сконструированные антитела, такие как "химерные" или "гибридные" антитела; имеющие специфичность связывания антигена-мишени.

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

В этой области также хорошо известны способы конструирования гуманизированных антител. См., например, Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989). В одном из примеров переменные области VH и VL родительского, не принадлежащего человеку антитела подвергают трехмерному молекулярному моделированию известными в этой области способами. Затем с использованием того же молекулярного моделирования идентифицируют каркасные аминокислотные остатки, которые, как прогнозируют, будут важны для образования правильных структур CDR. Параллельно, цепи V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> человека, имеющие аминокислотные последовательности, гомологичные последовательностям родительского, не принадлежащего человеку антитела, идентифицируют из любой базы данных генов антител с использованием родительских последовательностей VH и VL в качестве поисковых запросов. Затем выбирают акцепторные гены VH и VL человека.

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

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

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

Антитела также можно получать в эукариотических клетках. В одном из вариантов осуществления антитела (например, scFv) экспрессируются в дрожжевой клетке, такой как *Pichia* (см., например, Powers et al., 2001, *J. Immunol. Methods.* 251:123-35; Schoonooghe S. et al., 2009 *BMC Biotechnol.* 9:70; Abdel-Salam, H.A. et al., 2001 *Appl Microbiol Biotechnol* 56 (1-2):157-64; Takahashi K. et al., 2000 *Biosci Biotechnol*

Biochem 64(10):2138-44; Edqvist, J. et al., 1991 J Biotechnol 20 (3):291-300), Hanseula или *Saccharomyces*. Специалист в этой области может оптимизировать продукцию антитела в дрожжах посредством оптимизации, например, кислородных условий (см., например, Baumann K., et al., 2010 BMC Syst. Biol. 4:141), осмолярности (см., например, Dragosits, M. et al., 2010 BMC Genomics 11:207), температуры (см., например, Dragosits, M. et al., 2009 J Proteome Res. 8(3):1380-92), условиях ферментации (см., например, Ning, D. et al. 2005 J. Biochem. и Mol. Biol. 38(3): 2 94-2 99), штамма дрожжей (см., например, Kozug, AV et al. 2004 Mol Biol (Mosk) 38 (6):1067-75; Horwitz, AH. et al., 1988 Proc Natl Acad Sci USA 85 (22):8678-82; Bowdish, K. et al. 1991 J Biol Chem 266 (18):11901-8), гиперэкспрессии белков для усиления продукции антител (см., например, Gasser, B. et al., 2006 Biotechnol. Bioeng. 94(2):353-61), уровня кислотности культуры (см., например, Kobayashi H., et al., 1997 FEMS Microbiol Lett 152 (2):235-42), концентраций субстратов и/или ионов (см., например, Ko JH. et al., 2006 Appl Biochem Biotechnol 60(1):41-8). Кроме того, дрожжевые системы можно использовать для продукции антител с увеличенным временем полужизни (см., например, Smith, BJ. et al., 2001 Bioconj Chem 12 (5):750-756).

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

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

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

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

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

Антитела также можно получать с помощью трансгенного животного. Например, в патенте США № 5849992 описывают способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, включающий специфичный для молока промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие интересующее антитело и сигнальную последовательность для секреции. Молоко, продуцируемое особями таких трансгенных млекопитающих женского пола, включает секретлируемое в нем ин-

тересующее антитело. Антитело можно очищать из молока или, для некоторого применения, использовать напрямую.

#### Фармацевтические композиции

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), может присутствовать в композиции, например, фармацевтически приемлемой композиции или фармацевтической композиции. Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно составлять вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления в композиции присутствуют 30-400 мг антитела DX-2930, необязательно, с фармацевтически приемлемым носителем, например, фармацевтически приемлемой композицией или фармацевтической композицией. В некоторых вариантах осуществления в композиции присутствуют 30 мг, 100 мг, 150 мг, 300 мг или 400 мг антитела DX-2930, необязательно, с фармацевтически приемлемым носителем, например, фармацевтически приемлемой композицией или фармацевтической композицией.

Фармацевтически приемлемый носитель включает любой и все из растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических и замедляющих абсорбцию средств и т.п., являющихся физиологически совместимыми. Предпочтительно, носитель подходит для подкожного, внутривенного, внутримышечного, парентерального, спинномозгового или эпидурального введения (например, посредством инъекции или инфузии), хотя также предусмотрены носители, подходящие для ингаляции и интраназального введения. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель является одним или несколькими из фосфата натрия, лимонной кислоты, гистидина, хлорида натрия и Tween 80. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель является фосфатом натрия, лимонной кислотой, гистидином, хлоридом натрия и Tween 80. В некоторых вариантах осуществления антитело, такое как DX-2930, составляют в 30 мМ фосфате натрия, 8,6 мМ лимонной кислоте, 50 мМ гистидине, 90 мМ хлориде натрия, 0,01% Tween 80, pH 6,0. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит или состоит из 100 мг DX-2930 на 1 мл раствора 30 мМ фосфата натрия, 8,6 мМ лимонной кислоты, 50 мМ гистидина, 90 мМ хлорида натрия, 0,01% Tween 80.

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

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

Фразы "парентеральное введение" и "вводимый парентерально" в рамках изобретения означают способы введения, иные, чем энтеральное и местное введение, как правило, посредством инъекции, и включают, в качестве неограничивающих примеров, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратрахеальную, внутрикапсульную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, подкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию.

Композицию можно составлять в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъекционные растворы можно получать посредством включения связывающего белка в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают посредством включения активного соединения в стерильный наполнитель, содержащий основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных

порошков для получения стерильных инъеклируемых растворов предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, посредством которой получают порошок активного ингредиента с любым дополнительным желаемым ингредиентом из их ранее простерилизованного фильтрацией раствора. Подходящую текучесть раствора можно поддерживать, например, с использованием покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания необходимого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированной абсорбции инъеклируемых композиций можно достигать посредством включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина.

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно вводить множеством способов, включая внутривенную инъекцию или инфузию. Например, в случае некоторого терапевтического применения антитело можно вводить посредством внутривенной инфузии со скоростью менее 30, 20, 10, 5 или 1 мг/мин для достижения дозы приблизительно от 1 до 100 мг/м<sup>2</sup> или от 7 до 25 мг/м<sup>2</sup>. Путь и/или способ введения можно варьировать в зависимости от желаемых результатов. В определенных вариантах осуществления активного соединения можно получать с использованием носителя, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, такого как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Доступно множество способов получения таких составов. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

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

В определенных вариантах осуществления антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно составлять для обеспечения правильного распределения *in vivo*.

Например, гематоэнцефалический барьер (BBB) исключает многие высокогидрофильные соединения. Для обеспечения того, чтобы терапевтические соединения, представленные в настоящем описании, пересекали BBB (при желании), их можно составлять, например, в липосомах. Способы производства липосом, см., например, в патентах США №№ 4522811, 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать одно или несколько веществ, селективно транспортируемых в конкретные клетки или органы, таким образом, повышая доставку целевого лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, 1989, *J. Clin. Pharmacol.* 29:685).

Режимы дозирования корректируют для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить единичный болюс, можно вводить несколько раздельных доз с течением времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать в зависимости от терапевтических условий. Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения и единообразия доз. Термин "стандартная лекарственная форма" в рамках изобретения относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для индивидуумов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, вычисленного для достижения желаемого терапевтического эффекта, вместе с желаемым фармацевтическим носителем. Описание стандартных лекарственных форм может определяться и напрямую зависеть от (а) уникальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, которого хотят достичь, и (б) ограничений, характерных для области смешивания такого активного соединения, для лечения чувствительности у индивидуумов.

Пример неограничивающего диапазона терапевтически или профилактически эффективного количества антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930), представляет собой от 30 мг до 400 мг или любое целое число в нем, например, 100-400 мг, 100-300 мг или 300-400 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 30 мг, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг, 300 мг, 350 мг или 400 мг.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930), составляет 30 мг, 100 мг, 150 мг, 300 мг или 400 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 150 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 300 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 400 мг.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество вводят по меньшей мере два раза, по меньшей мере три раза, по меньшей мере четыре раза, по меньшей мере пять раз, по меньшей мере шесть раз, по меньшей мере семь раз, по меньшей мере восемь раз, по меньшей мере девять раз, по меньшей мере десять раз или более. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество вводят через неделю (т.е. каждые две недели). В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффек-



тивное количество составляет 300 мг или 400 мг, и количество вводят каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 300 мг, и это количество антитела вводят каждые две недели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 400 мг, и это количество антитела вводят каждые две недели.

В некоторых вариантах осуществления лечение любым антителом против PKa1, таким как DX-2930, включает схему лечения, содержащую, по меньшей мере, период введения нагрузочной дозы и период поддержания дозы. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела в течение периода введения нагрузочной дозы составляет от 100 до 300 мг (например, 150 мг или 300 мг) на каждое введение. В течение этого периода антитело можно вводить каждую неделю (например, каждую неделю в течение одной, двух или трех недель). В одном из примеров период введения нагрузочной дозы составляет 2 недели, и антитело вводят в день 0, день 7 и день 14.

Альтернативно или дополнительно, терапевтически или профилактически эффективное количество в течение периода поддержания дозы составляет приблизительно от 100 до 300 мг (например, 150 мг или 300 мг) на каждое введение. В течение этого периода антитело можно вводить через неделю (т.е. каждые две недели), каждые три недели или каждые четыре недели (например, каждые две недели в течение десяти недель, вводя всего 5 доз). В одном из примеров период поддержания дозы может длиться в течение 10 недель, и антитело вводят в день 28, день 42, день 56, день 70 и день 84.

В некоторых вариантах осуществления антитело против PKa1, такое как DX-2930, вводят в дозе 150 мг или 300 мг, и количество сначала вводят каждую неделю в течение подходящего периода (например, каждую неделю в течение одной, двух или трех недель), а затем вводят каждые две-четыре недели (например, каждые две, три или четыре недели) в течение подходящего периода.

В любом из способов, представленных в настоящем описании, схема лечения может дополнительно включать период последующего наблюдения после периода поддержания дозы. В период последующего наблюдения антитело, такое как DX-2930, можно вводить каждые 2-4 недели в дозе 100-300 мг, например, 300 мг. В некоторых случаях дозу можно повышать до 400 мг в один или несколько из периода введения нагрузочной дозы, периода поддержания дозы и периода последующего наблюдения.

Фармацевтические композиции, представленные в настоящем описании, могут включать "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" антитела, как представлено в настоящем описании (например, DX-2930).

#### Наборы

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно предоставлять в наборе, например, в виде компонента набора. Например, набор включает (а) антитело DX-2930, например, композицию (например, фармацевтическую композицию), включающую антитело, и, необязательно, (б) информационный материал. Информационный материал может являться описательным, инструктивным, маркетинговым или другим материалом, относящимся к способу, представленному в настоящем описании, и/или применению антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930), например, для способа, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одну или несколько доз DX-2930. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько доз составляют 30 мг, 100 мг, 150 мг, 300 мг или 400 мг.

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

В одном из вариантов осуществления информационный материал может включать инструкции по введению антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930), подходящим образом для осуществления способов, представленных в настоящем описании, например, в подходящей дозе, лекарственной форме, способе введения или схеме дозирования (например, дозе, лекарственной форме, схеме дозирования или способе введения, представленных в настоящем описании). В другом варианте осуществления информационный материал может включать инструкции по введению антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930), подходящему индивидууму, например, человеку, например, человеку, страдающему или имеющему риск развития заболевания или состояния, ассоциированного с калликреином плазмы. Например, материал может включать инструкции по введению антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930), пациенту с нарушением или состоянием, представленным в настоящем описании, например, заболеванием, ассоциированным с калликреином плазмы, например, в соответствии со схемой дозирования, представленной в настоящем описании. Информационный материал из наборов не ограничен в своей форме. Во многих случаях информационный материал, например, инструкции, представлен в печатном виде, но также может находиться в других форматах, таких как машиночитаемый материал.

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно предоставлять в

любой форме, например, жидкой, высушенной или лиофилизированной форме. Предпочтительно, чтобы антитело являлось, по существу, чистым и/или стерильным. Если антитело предоставляют в жидком растворе, жидкий раствор, предпочтительно, является водным раствором, при этом стерильный водный раствор является предпочтительным. Если антитело предоставляют в высушенной форме, восстановление, как правило, осуществляют посредством добавления подходящего растворителя. В наборе, необязательно, можно предоставлять растворитель, например, стерильную воду или буфер.

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

Набор, необязательно, включает устройство, подходящее для введения композиции, например, шприц, или любое такое устройство для доставки. В одном из вариантов осуществления устройство является имплантируемым устройством, с помощью которого распределяют отмеренные дозы антитела. Настоящее изобретение также относится к способу получения набора, например, посредством комбинирования компонентов, представленных в настоящем описании.

#### Лечение

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к применению антитела, представленного в настоящем описании (например, DX-2930), в лечении НАЕ.

Наследственный ангионевротический отек.

Наследственный ангионевротический отек (НАЕ) также известен как "отек Квинке", недостаточность ингибитора С1-эстеразы, недостаточность ингибитора С1 и наследственный ангионевротический отек (HANE). НАЕ отличается рецидивирующими эпизодами тяжелого отека (ангионевротического отека), который может поражать, например, конечности, лицо, гениталии, желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути. Симптомы НАЕ включают, например, отек рук, ног, губ, глаз, языка и/или горла; блокаду дыхательных путей, которая может включать отек горла и внезапную хрипоту; повторяющиеся эпизоды абдоминальных спазмов без очевидной причины и/или отек кишечника, который может являться тяжелым и может приводить к абдоминальным спазмам, рвоте, дегидратации, диарее, боли и/или шоку. Приблизительно у трети индивидуумов с НАЕ в течение приступа развивается незудящая супь под названием ревматическая эритема.

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

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

Существует три типа НАЕ, известных как типы I, II и III, все из которых можно лечить способами, представленными в настоящем описании. Считают, что НАЕ поражает 1 на 50000 человек, при этом на тип I приходится приблизительно 85 процентов случаев, на тип II приходится приблизительно 15 процентов случаев, а тип III является очень редким. Пациенты, имеющие тип I или тип II НАЕ, как правило, имеют недостаточность С1-INH. Такие пациенты имеют дефектный ген С1-INH и, таким образом, не продуцируют С1-INH или продуцируют атипичные белки С1-INH. Тип III является самым последним из описанных форм, и исходно считали, что он развивается только у женщин, но определены семьи с больными мужчинами. Считают, что НАЕ типа III не ассоциирован с С1-INH. Пациенты, имеющие НАЕ типа III, могут иметь нормальные белки С1-INH.

НАЕ наследуется по аутосомно-доминантному типу, таким образом, что больной индивидуум мо-

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

Мутации в гене SERPING1 вызывают наследственный ангионевротический отек типа I и типа II. Ген SERPING1 обеспечивает инструкции для образования белка-ингибитора C1, важного для контроля воспаления. Ингибитор C1 блокирует активность конкретных белков, стимулирующих воспаление. Мутации, вызывающие наследственный ангионевротический отек типа I, приводят к сниженным уровням ингибитора C1 в крови. И наоборот, мутации, вызывающие тип II, приводят к продукции ингибитора C1, функционирующего аномально. Без правильных уровней функционального ингибитора C1 образуются избыточные количества брадикинина. Брадикинин способствует воспалению посредством проникновения жидкости через стенки кровеносных сосудов в ткани организма. Избыточное накопление жидкостей в тканях организма вызывает эпизоды отека, наблюдаемые у индивидуумов с наследственным ангионевротическим отеком типа I и типа II.

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

НАЕ может присутствовать аналогично другим формам ангионевротического отека, являясь результатом аллергий или других медицинских состояний, но значительно отличаются причиной и лечением. Если наследственный ангионевротический отек неправильно диагностируют как аллергию, его чаще всего лечат антигистаминными средствами, стероидами и/или эпинефрином, как правило, являющимися неэффективными при НАЕ, хотя в случае реакций, угрожающих жизни, можно использовать эпинефрин. Неправильный диагноз также приводит к необязательному диагностическому хирургическому вмешательству в случае пациентов с абдоминальным отеком, и у некоторых пациентов с НАЕ абдоминальную боль неправильно диагностируют как психосоматическую.

Терапевтические средства, ингибирующие C1, а также другие терапевтические средства для НАЕ, описывают в Kaplan, A.P., *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126 (5):918-925.

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

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

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

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

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

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

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

Симптомы НАЕ можно оценивать, например, с использованием опросников, например, опросников, заполняемых пациентами, клиницистами или членами семьи. Такие опросники известны в этой области и

включают, например, визуальные аналоговые шкалы. См., например, McMillan, C.V. et al. Patient. 2012; 5 (2):113-26.

Лечение НАЕ антителами против РКaI.

Настоящее изобретение относится к способам лечения (например, улучшения, стабилизации или устранения одного или нескольких симптомов) наследственного ангионевротического отека (НАЕ) посредством введения антитела, представленного в настоящем описании (например, терапевтически эффективного количества антитела, представленного в настоящем описании), индивидууму, страдающему или, как предполагают, страдающему НАЕ, например, в соответствии со схемой дозирования, представленной в настоящем описании. Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения НАЕ посредством введения антитела, представленного в настоящем описании (например, терапевтически эффективного количества антитела, представленного в настоящем описании), например, в соответствии со схемой дозирования, представленной в настоящем описании, или в комбинации с второй терапией, например, с использованием одного другого средства, например, представленного в настоящем описании. Настоящее изобретение также относится к способам профилактики НАЕ или его симптома посредством введения антитела, представленного в настоящем описании (например, профилактически эффективного количества антитела, представленного в настоящем описании), индивидууму, имеющему риск развития НАЕ (например, индивидууму, имеющему члена семьи с НАЕ или генетической предрасположенности к нему), например, в соответствии со схемой дозирования, представленной в настоящем описании. В некоторых примерах индивидуум может являться пациентом-человеком, не имеющим симптомов НАЕ на момент лечения.

Лечение включает введение количества, эффективного для облегчения, изменения, лечения, улучшения или влияния на нарушение, симптомы нарушения или предрасположенность к нарушению. Лечение также может замедлять дебют, например, предотвращать дебют, или предотвращать ухудшение заболевания или состояния.

Способы введения антител DX-2930 также описаны в "Фармацевтических композициях". Используемые подходящие дозы антитела могут зависеть от возраста и массы тела индивидуума и конкретного используемого лекарственного средства. Антитело можно использовать в качестве конкурентных средств для ингибирования, снижения нежелательного взаимодействия, например, между калликреином плазмы и его субстратом (например, фактором XII или HMWK). Доза антитела может являться количеством, достаточным для блокирования 90%, 95%, 99% или 99,9% активности калликреина плазмы у пациента, особенно в месте заболевания. Она может представлять собой 30 мг, 100 мг, 300 мг или 400 мг, например, вводимых каждые две недели.

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

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

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

Терапевтически эффективное количество антитела, представленного в настоящем описании, можно вводить индивидууму, имеющему, как предполагают, имеющему или имеющему риск НАЕ, таким образом, осуществляя лечение (например, улучшение симптома или признака нарушения, замедления, стабилизации и/или задержки прогрессирования заболевания) нарушения.

Антитело, представленное в настоящем описании, можно вводить в терапевтически эффективном количестве. Терапевтически эффективное количество антитела является количеством, эффективным после введения однократной или многократных доз индивидууму в лечении индивидуума, например, излечения, облегчения или улучшения по меньшей мере одного симптома нарушения у индивидуума до степени, превышающей степень, ожидаемую в отсутствие такого лечения.

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно вводить единичный болюс, можно вводить несколько отдельных доз с течением времени или дозу можно пропорционально снижать или повышать в зависимости от терапевтических условий. Особенно предпочтительно составлять парентеральные композиции в стандартной лекарственной форме для простоты введения и единообразия доз. Термин "стандартная лекарственная форма" в рамках изобретения относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для индивидуумов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, вычисленного для достижения желаемого терапевтического эффекта, вместе с желаемым фармацевтическим носителем.

В некоторых вариантах осуществления антитело DX-2930 вводят с помощью множества доз, например, раз каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые четыре недели, каждые 6 недель, каждые 8 недель или реже. Каждая из многократных доз может составлять 30 мг, 100 мг, 150 мг, 300 мг, 350 мг или 400 мг. В некоторых случаях пациенту можно вводить множество доз один раз каждые 2 недели в течение подходящего периода времени. В некоторых вариантах осуществления DX-2930 можно вводить в дозе 300 мг или 400 мг каждые две недели. В других вариантах осуществления DX-2930 можно вводить в дозе 300 мг или 400 мг каждые четыре недели. В других вариантах осуществления DX-2930 можно вводить в дозе 150 мг каждые четыре недели. В любом из способов, представленных в настоящем описании, можно осуществлять последующее наблюдение за индивидуумом, подвергнутым лечению многократными дозами DX-2930, как представлено в настоящем описании, с использованием поддерживающего лечения.

В любом из способов, представленных в настоящем описании, индивидуума можно лечить многократными дозами DX-2930 в течение периода введения нагрузочной дозы, а затем осуществлять последующее наблюдение с периодом поддержания дозы. В период введения нагрузочной дозы индивидуума можно лечить DX-2930 в дозе от приблизительно 100 мг до приблизительно 400 мг (например, 100-300 мг или 150-300 мг, например, 100 мг, 150 мг, 200 мг, 300 мг или 400 мг) один раз каждые 2-4 недели (например, каждые 2 недели, каждые 3 недели или каждые 4 недели) в течение подходящего периода. В период введения нагрузочной дозы индивидуума можно лечить DX-2930 в дозе от приблизительно 100 мг до приблизительно 300 мг (например, 100-300 мг или 150-300 мг, например, 100 мг, 150 мг, 200 мг или 300 мг) один раз каждые 2-4 недели (например, каждые 2 недели, каждые 3 недели или каждые 4 недели) в течение подходящего периода.

В некоторых вариантах осуществления пациента можно подвергать мониторингу на побочные эффекты (например, повышение уровней креатинфосфатазы) и/или уровни ингибирования PKa1 антителом (например, концентрацию антитела в сыворотке или плазме или уровень активности PKa1) до и после лечения или в течение лечения. Если наблюдают побочный эффект, дозу антитела можно снижать или лечение можно прекращать. Если уровень ингибирования составляет менее минимального терапевтического уровня, пациенту можно вводить дополнительные дозы антитела.

В некоторых вариантах осуществления концентрацию антитела в плазме или сыворотке (например, DX-2930) можно измерять в течение лечения (например, после начальной дозы) для оценки эффективности лечения. Если концентрация антитела в плазме или сыворотке является более низкой, чем приблизительно 80 нМ, может потребоваться последующая доза, которая может являться такой же или превышать исходную дозу. Концентрацию антитела в плазме или сыворотке можно измерять посредством определения уровня белка антитела в образце плазмы или сыворотке, полученном от индивидуума, например, посредством иммунологического анализа или MS-анализа. Концентрацию антитела в плазме или сыворотке также можно измерять посредством определения ингибиторного уровня PKa1 в образце плазмы или сыворотки, полученном от индивидуума, которого лечили антителом. Такие анализы могут включать анализ синтетического субстрата или анализ вестерн-блоттинга для измерения расщепленного кининогена, как представлено в настоящем описании.

Альтернативно или дополнительно, уровень креатинкиназы в плазме или сыворотке можно подвергать мониторингу в течение лечения. Если обнаруживают, что уровень креатинкиназы в плазме или сыворотке повышается в течение лечения, можно снижать дозу антитела или можно прекращать лечение.

В некоторых вариантах осуществления оптимальную дозу (например, оптимальную профилактическую дозу или оптимальную терапевтическую дозу) антитела (например, DX-2930) можно определять следующим образом. Антитело вводят индивидууму, нуждающемуся в лечении, в начальной дозе. Измеряют концентрацию антитела в плазме индивидуума. Если концентрация в плазме является более низкой, чем 80 нМ, дозу антитела повышают при последующем введении. Дозу антитела, благодаря которой поддерживают концентрацию антитела в плазме выше приблизительно 80 нМ, можно выбирать как оптимальную дозу для индивидуума. Уровень креатинфосфокиназы у индивидуума можно подвергать мониторингу в течение лечения и оптимальную дозу для этого индивидуума можно дополнительно корректировать с учетом уровня креатинфосфокиназы, например, дозу антитела можно снижать, если наблюдают повышение креатинфосфокиназы в течение лечения. В некоторых вариантах осуществления антитело, такое как DX-2930, вводят для снижения уровня расщепленного кининогена до уровней, сравнимых со здоровыми индивидуумами.

В некоторых вариантах осуществления любое из антител, представленных в настоящем описании, таких как DX-2930 и его функциональные варианты, можно использовать для профилактики приступа НАЕ или снижения частоты приступов НАЕ у пациентов-людей, имеющих приступ НАЕ в анамнезе. В некоторых примерах пациенты-люди, перенесшие по меньшей мере два приступа НАЕ в год и, необязательно, по меньшей мере один приступ в течение 6 месяцев перед лечением. В других примерах пациенты-люди перенесли по меньшей мере два приступа НАЕ в течение 3 месяцев перед лечением. В других примерах пациенты-люди имели по меньшей мере 9 приступов НАЕ в течение 3 месяцев перед лечением и, необязательно, по меньшей мере 25 приступов (например, 36 приступов) в течение 12 месяцев перед лечением.

Способы комбинированного лечения.

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно вводить в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими средствами для лечения заболевания или состояния, ассоциированного с активностью калликреина плазмы, например, заболевания или состояния, представленного в настоящем описании. Например, антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно использовать терапевтически или профилактически с хирургическим вмешательством, другим Fab или IgG против калликреина плазмы (например, другим Fab или IgG, представленным в настоящем описании), другим ингибитором калликреина плазмы, пептидным ингибитором или низкомолекулярным ингибитором. Примеры ингибиторов калликреинов плазмы, которые можно использовать в комбинированном лечении с антителами, связывающими калликреин плазмы, представленными в настоящем описании, включают ингибиторы калликреина плазмы, описываемые, например, в WO 95/21601 или WO 2003/103475.

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

Антитело, представленное в настоящем описании (например, DX-2930), можно вводить в комбинации с одним или несколькими известными в настоящее время терапевтическими средствами для лечения НАЕ. Например, антитело DX-2930 можно использовать совместно со вторым терапевтическим средством против НАЕ, таким как экаллангид, ингибитор C1-эстеразы (например, CINRYZE™), апротинин (TRASYLOL®) и/или ингибитор рецептора брадикинина B2 (например, икатибант (FIRAZYR®)).

Термин "комбинация" относится к использованию двух или более средств или терапевтических средств для лечения одного пациента, где использование или действие средств или терапевтических средств перекрываются во времени. Средства или терапевтические средства можно вводить одновременно (например, в виде одного состава, вводимого пациенту, или в виде двух отдельных составов, вводимых одновременно) или последовательно в любом порядке. Последовательные введения являются введениями, производимыми в разное время. Время между введением одного средства и другого средства может составлять минуты, часы, дни или недели. Антитело, связывающее калликреин плазмы, представленное в настоящем описании, также можно использовать для снижения дозы другого терапевтического средства, например, для снижения побочных эффектов, ассоциированных с другим вводимым средством. Таким образом, комбинация может включать введение второго средства в дозе, по меньшей мере на 10, 20, 30 или 50% ниже той, которую использовали бы в отсутствие антитела, связывающего калликреин плазмы.

Комбинированное лечение может включать введение средства, снижающего побочные эффекты других терапевтических средств. Средство может являться средством, снижающим побочные эффекты лечения заболевания, ассоциированного с калликреином плазмы.

Без дальнейшей разработки, полагают, что специалист в этой области, учитывая представленное выше описание, может использовать настоящее изобретение в полной мере. Таким образом, следующие конкретные варианты осуществления следует истолковывать исключительно в качестве иллюстраций, а не ограничений остальной части настоящего изобретения каким бы то ни было образом. Все публикации, процитированные в настоящем описании, включены в качестве ссылок в целях или для объекта, упоминаемого в настоящем описании.

### Примеры

Пример 1. Двойное слепое исследование действия многократных нарастающих доз фазы 1b для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики DX-2930 у индивидуумов с наследственным ангионевротическим отеком.

Исследование фазы 1b осуществляли для оценки безопасности и переносимости многократного подкожного введения DX-2930 в различных дозах у пациентов с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ). Пациенты НАЕ, включенные в исследование, включали пациентов с задокументированным диагнозом НАЕ (типа I или типа II) с учетом следующего: задокументированным анамнезом, соответствующим НАЕ (эпизодам подкожного или слизистого, незудящего отека без сопутствующей крапивницы), антиген ингибитора C1 (C1-INH) или функциональный уровень <40% от нормального уровня (включали индивидуумов с антигеном или функциональным уровнем C1-INH 40-50% от нормального

уровня, если они также имели уровень С4 ниже нормального диапазона, и семейным анамнезом, соответствующим НАЕ типа I или II), возраст задокументированного дебюта первых симптомов ангионевротического отека  $\leq 30$  лет или семейный анамнез, соответствующий НАЕ типу I или II, и  $\geq 2$  перенесенных приступов НАЕ в год по меньшей мере с 1 приступом за последние 6 месяцев, о чем сообщил индивидуум. Включенные пациенты с НАЕ случайным образом распределяли в соотношении 2:1 по группам введения активного лекарственного средства и плацебо и подкожно вводили им дозы DX-2930 в количестве 30 мг (n=4), 100 мг (n=4), 300 мг (n=5) и 400 мг (n=11) или плацебо (n=13) в двух дозах с интервалом 14 дней. Одному пациенту в группе 400 мг вводили только одну дозу, но затем пациент был недоступен для введения второй дозы и заменен. Пациент, который послужил в качестве замены, также был неспособен завершить участие в исследовании по причинам, не относящимся к исследованию, что привело к тому, что всего 10 пациентов завершали исследование в группе дозы 400 мг и были включены в оценку. Плазме собирали в моменты времени после введения до дня 120 (15 недель), за исключением группы, которой вводили дозу 400 мг, где данные были доступны до дня 50. Анализы включали анализы безопасности, фармакокинетики, фармакодинамики (биомаркеры) и эффективности. Группу, которой вводили лекарственное средство, и группу, которой вводили плацебо, укомплектовывали, учитывая возраст, расу, этническую принадлежность и BMI, хотя в группе, которой вводили DX-2930, было немного больше женщин (67%), чем в группе, которой вводили плацебо (54%).

#### Фармакокинетика DX-2930.

Уровни лекарственного средства DX-2930 измеряли в плазме с помощью валидированного иммунологического анализа, в котором используют антиидиотипическое антитело против DX-2930 (M293-D02). Из графика средних уровней лекарственного средства в плазме для группы каждой дозы относительно дней после введения DX-2930, очевидно, что уровни лекарственного средства зависели от дозы и демонстрировали пролонгированное время полужизни, типичное для моноклонального антитела человека. Ключевые фармакокинетические параметры приведены в табл. 2 и на фиг. 1. Во-первых, уровни  $C_{max}$  лекарственного средства, как и ожидалось, повышались с повышением дозы. Кроме того,  $T_{max}$  после второй дозы составляла приблизительно 20 дней, и время полужизни составляло приблизительно 14 дней. Эти параметры соответствовали значениям, наблюдаемым в исследовании фазы 1a у здоровых добровольцев, и подтверждали введение один или два раза в месяц.

Таблица 2

#### Фармакокинетические параметры

Дозы	$C_{max}$ (нг/мл)	$T_{max}$ (дни)	$t^{1/2}$ (дни)
30 мг	3895,0 (2159,8)	17,9 (1,1)	14,2 (0,8)
100 мг	7890,0 (2058,4)	18,0 (0,5)	14,6 (3,4)
300 мг	27460,0 (14542,5)	18,2 (1,5)	13,8 (3,3)
400 мг	45322,2 (8704,6)	17,7 (1,0)	15,0 (2,4)

Приведенные значения представляют собой средние значения для оцениваемых пациентов со стандартным отклонением в скобках.

#### Фармакодинамическая активность DX-2930: флуорогенный анализ активности.

Для исследования фармакодинамической (PD) активности DX-2930 в плазме пациентов с НАЕ использовали два различных анализа биомаркеров. Первый анализ PD обозначают как флуорогенный анализ активности, и с помощью него измеряют биологическую активность DX-2930 в цитратной плазме, полученной от подвергнутых лечению пациентов в одинаковые моменты времени после введения дозы, которую используют для определения фармакокинетических свойств DX-2930. В этом анализе измеряли количество активного калликреина плазмы, образующегося в разведенной плазме после активации контактного пути. В частности, разведенную плазму, дополненную активным фактором XIIa (FXIIa), стимулирующим ферментативный каскад контактного пути, через 2 минуты добавляли ингибитор FXIIa ингибитор трипсина кукурузы для остановки реакции и измеряли количество активного калликреина плазмы, присутствующего в образце, по его способности гидролизовать профлуоресцентный синтетический пептидный субстрат. Наличие повышающихся уровней DX-2930 в плазме подвергнутых лечению здоровых добровольцев (исследование фазы 1a) или пациентов с НАЕ (исследование фазы 1b) было ассоциировано с дозозависимым снижением наблюдаемой скорости ферментативной реакции калликреина плазмы (фиг. 2). Вычисляли процент ингибирования, наблюдаемый в каждый момент времени относительно степени активности калликреина плазмы в образцах до введения дозы для каждого пациента. Наблюдаемая на фиг. 2 биологическая активность хорошо коррелировала с фармакокинетическими свойствами DX-2930 на фиг. 1. Наблюдали значительное ингибирование при дозах 300 и 400 мг после введения. Наблюдали промежуточное ингибирование при дозе 100 мг и не наблюдали ингибирование при дозе 30 мг.

Фармакодинамическая активность DX-2930: анализ вестерн-блоттинга.

У пациентов с НАЕ имеет место недостаточность ингибитора С1, эндогенного ингибитора калликрина плазмы. В результате эти пациенты имели повышенный активный калликреин плазмы, преобразующий его одноцепочечный высокомолекулярный кининогеновый субстрат в двухцепочечный кининоген и брадикинин, ключевой медиатор боли и отека при НАЕ. DX-2930 является очень мощным ингибитором активного калликрина плазмы, блокирующим образование двухцепочечного кининогена и брадикинина.

Разрабатывали анализ вестерн-блоттинга для измерения относительных количеств одноцепочечного и двухцепочечного высокомолекулярного кининогена в плазме в условиях различных антикоагулянтов плазмы и обработки. На фиг. 3 показан % двухцепочечного кининогена, который наблюдали в плазме пациентов с НАЕ, собранной в присутствии ингибиторов протеаз (плазмы SCAT169). Наличие плазмы SCAT169 предотвращало активацию контактной системы и последующее образование двухцепочечного кининогена, которые могут происходить при сборе крови и обработке плазмы. Таким образом, ожидали, что этот уровень двухцепочечного кининогена будет близко соответствовать эндогенным уровням у пациентов с НАЕ в исследовании фазы 1b (27%) и у здоровых добровольцев (12%). Пациенты с НАЕ, которых лечили DX-2930, демонстрировали меньшие уровни двухцепочечного кининогена, измеряемые в образцах, собранных через 8 или 22 дней после введения дозы.

Как показано на фиг. 4, цитратная плазма до введения доз, полученная от пациентов НАЕ в исследовании фазы 1b, содержала приблизительно 52% двухцепочечного кининогена. И наоборот, образцы цитратной плазмы от здоровых добровольцев, полученные в исследовании фазы 1a, содержали приблизительно 8% двухцепочечного кининогена. Также исследовали средние уровни двухцепочечного кининогена в плазме у индивидуумов в исследовании фазы 1b, собранной в дни 8 и 22, и они представлены на фиг. 4. Статистически значимое снижение уровней двухцепочечного кининогена в группах, которым вводили дозу 300 и 400 мг, относительно уровней до введения доз свидетельствовало о фармакодинамической активности DX-2930.

На фиг. 5 показано, что в цитратной плазме от пациентов с НАЕ, которым вводили DX-2930, определяли меньше двухцепочечного кининогена после активации *ex vivo* с использованием фактора свертывания XIIIa (FXIIIa). В группах, которым вводили дозы 300 и 400 мг, количество двухцепочечного кининогена снижалось до уровня ниже наблюдаемого у здоровых добровольцев. Эту активацию *ex vivo* можно считать моделью тяжелого приступа НАЕ *in vitro*.

С помощью обоих из этих анализов биомаркеров PD подтверждали выбор дозы, посредством которых будут достигать уровней лекарственного средства, достигаемых в группах, которым вводили дозы 300 и 400 мг.

#### Безопасность

Общие сведения о побочных эффектах представлены в табл. 3 ниже. Не наблюдали дисбаланса в возникших во время лечения нежелательных явлениях (TEAE), который бы свидетельствовал об угрозе безопасности DX-2930. Наиболее распространенными АЕ являлись приступы НАЕ, боль в месте инъекции и головная боль. Наблюдали 3 тяжелых TEAE (боль в месте инъекции, длящаяся 1 мин, ухудшение головной боли, длящаяся 1 мин, и ночную потливость). Не определяли опасные показатели в случае отклонений клинических лабораторных показателей или изменений относительно исходного уровня, показателей жизнедеятельности или результатов физикального осмотра или отклонений или изменений электрокардиограммы (ECG). Эти результаты позволяют предполагать, что DX-2930, по-видимому, хорошо переносится пациентами с НАЕ в дозах до 400 мг.



Таблица 3

## Общие сведения о побочных эффектах лечения

	30 мг DX- 2930 (N=4)	100 мг DX- 2930 (N=4)	300 мг DX- 2930 (N=5)	400 мг DX- 2930 (N=11)	Все подвергнутые лечению DX- 2930 (N=24)	Плацебо (N=13)
ТЕАЕ*	1	3	2	8	14 (58%)	10 (77%)
Гибель или прекращение участия индивидуума в исследовании	0	0	0	0	0	0
Серьезные побочные эффекты	0	0	0	0	0	1 (8%)
Тяжелые ТЕАЕ	1	0	2	2	5 (21%)	5 (39%)
Связанные ТЕАЕ**	1	2	0	4	7 (29%)	5 (39%)

\*ТЕАЕ: Возникшие во время лечения нежелательные явления. АЕ появляются во время лечения, если время дебюта приходится на время после введения исследуемого лекарственного средства до дня 120 после последнего посещения в рамках последующего наблюдения или, в случае, когда время дебюта предшествует введению исследуемого лекарственного средства, тяжесть АЕ повышается в течение 120 дней после периода последующего наблюдения

\*\*Связанные с лечением АЕ: Связь АЕ с исследуемым лекарственным средством исследователь оценивал "слепым" способом

## Иммуногенность

5 пациентов являлись положительными по антителу против лекарственного средства (2 из 5 имели периодические, неустойчивые результаты). Однако, ни один из положительных образцов не являлся нейтронизирующим, не было клинических доказательств гиперчувствительности и очевидных эффектов в отношении фармакокинетики или биомаркеров.

Оценка эффективности.

Осуществляли проспективный первичный анализ эффективности, сфокусированный на дозах 300 и 400 мг DX-2930, индивидуально и в комбинации, по сравнению с плацебо.

Использовали шестинедельный период первичной оценки (в дни 8-50) (фиг. 6А и 6В), т.к. моделирование РК из исследования фазы 1а позволило предполагать значительное воздействие лекарственного средства в течение этого временного интервала. Первичный анализ был сфокусирован на индивидуумах с минимальным исходным анамнезом по меньшей мере 2 приступов в последние 3 месяца. Большинство индивидуумов удовлетворяли требованию необходимого минимального исходного анамнеза по меньшей мере 2 приступа за последние 3 месяца. Из 13 индивидуумов, которым вводили плацебо, 11 удовлетворяли этому требованию. Из 16 индивидуумов, которых лечили 300 или 400 мг DX-2930, 15 удовлетворяли этому требованию. Исходная частота приступов НАЕ в группах, которым вводили плацебо, 300 мг и 400 мг, составляла 0,39, 0,33 и 0,55 приступов в неделю, соответственно. Исходная частота в комбинированной группе 300 и 400 мг составляла 0,49 приступов в неделю.

Первичным подходом являлся анализ всех пациентов, изначально отобранных для исследования (ITT). Использовали модель повторных измерений с дисперсионным анализом (ANOVA), в котором в качестве ковариаты используют исходные частоты приступов. Данные выражали как процент снижения приступов НАЕ под действием DX-2930 по сравнению с частотами приступов в группе, которой вводили плацебо, и вычисляли значения  $p$ .

Результаты оценки эффективности представлены в табл. 4 и 5 и на фиг. 7, что свидетельствовало о снижении частоты приступов НАЕ при дозах 300 и 400 мг DX-2930, отдельно и в комбинации, по сравнению с плацебо. В частности, у 13 из 15 индивидуумов, которых лечили 300 или 400 мг DX-2930, не наблюдали приступы в течение исследования, в то время как в группе плацебо только у 3 из 11 индивидуумов не наблюдали приступы.

Таблица 4

## Снижение частоты приступов НАЕ в дни 8-50

	300 мг DX-2930 (N=4)	400 мг DX- 2930 (N=11)	Комбинированная доза 300 и 400 мг DX-2930 (N=15)
% снижения по сравнению с плацебо	100	88	91
Значение P при сравнении с плацебо*	<0,0001	0,005	0,0012

Примечание: Включали только индивидуумов, имеющих исходную частоту приступов по меньшей мере 2 приступа за последние 3 месяца.

\*Смешанная модель повторных измерений с дисперсионным анализом (исходная частота приступов в качестве ковариаты) с учетом распределения Пуассона.

Таблица 5

## Доля индивидуумов без приступов

	300 мг DX-2930 (N=4)	400 мг DX-2930 (N=11)	Комбинированная доза 300 и 400 мг DX-2930 (N=15)	Плацебо (N=11)
Индивидуумы без приступов (дни 8-50)	4/4 (100%) p=0,026	9/11 (82%) p=0,030	13/15 (87%) p=0,004	3/11 (27%)

Среди индивидуумов в группе плацебо наблюдали всего 24 приступа в течение периода первичной оценки эффективности. Из этих 24 приступов первичная локализация приступа являлась абдоминальной у 13 и ларингеальной у 1 из них. 10 из приступов являлись тяжелыми и 6 являлись умеренными. Неотложное лечение приступов проводили в случае 22 из 24 приступов.

Среди индивидуумов, которых лечили 300 или 400 мг DX-2930, один индивидуум, которого лечили 400 мг, имел один приступ НАЕ. Этот приступ являлся периферическим, слабым, длился 8 ч, и в его случае не потребовалось неотложное лечение. Другой индивидуум, которого лечили 400 мг DX-2930, перенесший приступы, имел два периферических приступа. Один приступ являлся умеренным, а другие являлись тяжелыми; оба приступа подвергали неотложному лечению. Общие характеристики приступов НАЕ представлены в табл. 6.

Таблица 6

## Характеристики приступов НАЕ (дни 8-50)

	300 мг DX-2930 (N=4)	400 мг DX-2930 (N=11)	Плацебо (N=11)
Приступы	0	3	24
<b>Первичная локализация приступа</b>			
Периферическая	0	3	10
Абдоминальная	0	0	13
Ларингеальная	0	0	1
<b>Тяжесть приступа</b>			
Слабая	0	1	8
Умеренная	0	1	6
Тяжелая	0	1	10
Острые приступы, в случае которых потребовалось лечение	0	2	22

Затем осуществляли модифицированный апостериорный анализ всех пациентов, изначально отобранных для исследования (mITT). Использовали выборку ITT за исключением 2 индивидуумов (один индивидуум, которому не проводили 2 введения, и 1 индивидуум, не имевший НАЕ типа 1 или типа 2). Результаты модифицированного анализа представлены в табл. 7. В этом модифицированном анализе всех пациентов, изначально отобранных для исследования в дни 8-50 при сравнении с плацебо в группе, которой вводили 300 мг DX-2930, наблюдали 100% снижение приступов со значением  $p < 0,0001$ . В группе, которой вводили 400 мг DX-2930, наблюдали 95% снижение приступов со значением  $p < 0,0022$ . В группе комбинированной дозы 300 и 400 мг DX-2930, наблюдали 97% снижение приступов НАЕ со значением  $p < 0,0007$ .

Таблица 7

## Первичный анализ эффективности (дни 8-50) (модифицированный анализ всех пациентов, изначально отобранных для исследования)

	300 мг DX-2930 (N=4)	400 мг DX-2930 (N=9)	Комбинированная доза 300 и 400 мг DX-2930 (N=13)
% снижение по сравнению с плацебо	100	95	97
Значение $P$ при сравнении с плацебо*	$<0,0001$	0,0022	0,0007

Примечание: Включали только индивидуумов, имевших исходную частоту приступов по меньшей мере 2 приступа за последние 3 месяца. Из выборки mITT исключали 2 индивидуумов, один из которых без НАЕ типа I или II и одному индивидууму провели лишь 1 введение DX-2930.

\*Смешанная модель повторных измерений с дисперсионным анализом (исходная частота приступов в качестве ковариаты) с учетом распределения Пуассона.

Также оценивали частоту приступов НАЕ относительно воздействия лекарственного средства с те-

чением времени. Не желая быть связанными какой-либо теорией, выдвигали гипотезу о том, что более высокие уровни лекарственного средства должны коррелировать с профилактикой приступов НАЕ, что означает (а) что перед введением дозы, а также в течение нескольких дней после введения дозы, должны наблюдать приступы, (b) что с накоплением уровней лекарственного средства, приступы должны становиться редкими или даже прекращаться, и (с) что со снижением уровней лекарственного средства приступы должны снова возникнуть. Результаты этой оценки представлены на фиг. 8-13.

В группе плацебо была очевидна высокая частота приступов (фиг. 8). Эти события были распределены на всем протяжении исследования без какой-либо четкой закономерности.

В группах, которым вводили 30 и 100 мг DX-2930, в дни 8-50 не происходили приступы (фиг. 9 и 10). Однако, исходные частоты приступов в этих группах являлись относительно более низкими, и фармакодинамический эффект в группе 30 мг не отличался от плацебо значительно. В группе 300 мг DX-2930 наблюдали приступы, происходившие до введения дозы. С ростом уровней лекарственного средства у индивидуумов прекращаются приступы, и со снижением уровней лекарственного средства приступы возникают снова (фиг. 11). Аналогичную закономерность также наблюдали в группе 400 мг DX-2930 (фиг. 12). Частота приступов, по существу, снижалась в течение периода значительного воздействия лекарственного средства, в частности, в течение интервала времени в дни 8-50. Этот период был ограничен приступами, развившимися в течение периодов более низкого воздействия лекарственного средства как до накопления лекарственного средства, так и со снижением уровней лекарственного средства. Эти результаты свидетельствуют о том, что существует четкая ассоциация между воздействием лекарственного средства DX-2930 и профилактикой приступов НАЕ.

Для дальнейшей оценки эффективности DX-2930, также наблюдали за терапевтическими эффектами DX-2930 у пациентов с НАЕ с высокими исходными частотами приступов. Идентифицировали и оценивали индивидуумов по меньшей мере с 9 приступами за последние 3 месяца перед введением дозы. Было 6 таких индивидуумов - 1 лечили плацебо, 1 лечили 300 мг DX-2930 и 4 лечили 400 мг DX-2930.

У индивидуума, которого лечили плацебо, приступы происходили на всем протяжении периода наблюдения с высокой частотой (фиг. 13, панель А). И наоборот, у индивидуума, которого лечили 300 мг DX-2930, отсутствовали приступы, когда уровни лекарственного средства являлись высокими (фиг. 13, панель В).

Среди четырех индивидуумов с высокими исходными частотами приступов, которых лечили 400 мг DX-2930, у всех четырех из этих индивидуумов отсутствовали приступы в течение интервала времени в дни 8-50 (фиг. 13, панели С-Ф). Они включали одного индивидуума с очень высокой исходной частотой 36 приступов за последние 3 месяца. Закономерность приступов у этих индивидуумов, которых лечили DX-2930, в целом, соответствовала закономерности, наблюдаемой в группах 300 и 400 мг. Эти индивидуумы не испытывали каких-либо приступов, когда уровни лекарственного средства являлись высокими. Приступы происходили только тогда, когда уровни лекарственного средства являлись низкими как до значительного накопления лекарственного средства, так и после снижения уровней лекарственного средства.

Из этих данных следует, что терапевтический эффект DX-2930 также был очевиден у пациентов с НАЕ с высокими исходными частотами приступов.

В целом, это исследование показало, (а) что не наблюдали опасных показателей в случае DX-2930, (b) что профиль РК, в целом, соответствовал моноклональному антителу и подтверждал схему дозирования раз каждые 2 недели или даже реже, (с) что фармакодинамические данные свидетельствовали о том, что DX-2930 нормализовало аномальную нестабильность плазмы пациента с НАЕ, по меньшей мере, в том, что касается анализов биомаркеров кининогена, и (d) что получали статистически очень значимые данные о профилактике приступов НАЕ с использованием DX-2930. В частности, при сравнении с плацебо наблюдали 100% и 88% снижения приступов в группах, которым вводили 300 и 400 мг DX-2930, соответственно. Этот клинический эффект логически ассоциирован с воздействием лекарственного средства с течением времени, и его также наблюдали в подгруппе пациентов с высокими исходными частотами приступов.

Эти данные являются доказательством правильности концепции в случае DX-2930 при длительной профилактике приступов НАЕ.

Пример 2. Фармакодинамический эффект DX-2930 в отношении калликреина плазмы у пациентов с наследственным ангионевротическим отеком.

Приступы наследственного ангионевротического отека (НАЕ) являются результатом неконтролируемой активации контактной системы, приводящей к резкому повышению калликреина плазмы (PKa1), расщепляющего высокомолекулярный кининоген (HMWK) с образованием двухцепочечного HMWK и индуцирующего отек пептида, брадикинина. DX-2930 является моноклональным антителом человека, ингибитором PKa1, находящимся в стадии разработки, для профилактики приступов НАЕ. Фармакодинамическую биологическую активность DX-2930 оценивали у индивидуумов с НАЕ.

Как описано в примере 1 выше, в многоцентровом, двойном слепом исследовании фазы 1b индивидуумов с НАЕ типа 1 или 2 рандомизировали для введения 2 подкожных доз DX-2930 в группах, которым вводили дозу 30, 100, 300 или 400 мг (n=4, 4, 5, 11) или плацебо (n=13). Образцы крови получали до и после введения исследуемого лекарственного средства (дни 1, 8, 22, 64, 92, 120). Способность DX-2930

ингибировать PKa1 в исходной и FXIIA-активированной цитратной плазме оценивали с использованием вестерн-блоттинга для двухцепочечного HMWK.

Результаты, полученные в этом исследовании, свидетельствовали о том, что средние уровни двухцепочечного HMWK значительно снижались и, по существу, нормализовались в группах, которым вводили дозы 300 и 400 мг, в дни 8 и 22 и в дни 8, 22 и 50, соответственно, по сравнению с индивидуумами, которым вводили плацебо. Лечение 300 или 400 мг DX-2930 также снижало резкое повышение образования двухцепочечного кининогена до уровней, наблюдаемых у здоровых индивидуумов в FXIIA-активированных образцах, или ниже. Уровни двухцепочечного HMWK не отличались от образцов плазмы перед введением дозы в активированных или неактивированных образцах, собранных в дни 64, 92 или 120 после введения DX-2930, что соответствует периодам низкого воздействия лекарственного средства.

В целом, это исследование свидетельствует о том, что DX-2930 ингибирует PKa1 у пациентов с НАЕ в зависимости от дозы и времени.

Пример 3. Взаимосвязь между воздействием лекарственного средства и клиническим ответом, наблюдаемым в исследовании фазы 1b DX-2930 у индивидуумов с наследственным ангионевротическим отеком.

DX-2930 является моноклональным антителом человека, ингибитором калликреина плазмы, находящимся в стадии разработки, для профилактики приступов наследственного ангионевротического отека (НАЕ). Данные исследования фазы 1b DX-2930 на индивидуумах с НАЕ, как описано в примере 1 выше, анализировали для характеристики взаимосвязи между воздействием лекарственного средства и клиническим ответом.

В этом многоцентровом, двойном слепом исследовании фазы 1b, индивидуумов с НАЕ типа 1 или 2 рандомизировали для введения 2 подкожных доз DX-2930 в группах, которым вводили дозы 30, 100, 300 или 400 мг (n=4, 4, 5, 11) или плацебо (n=13). В этом апостериорном анализе частоту приступов НАЕ оценивали в связи с воздействием лекарственного средства с течением времени. Кроме того, апостериорный модифицированный анализ всех пациентов, изначально отобранных для исследования эффективности (MITT), осуществляли для оценки клинического эффекта в отношении индивидуумов, в отношении которых использовали схему лечения полной дозой DX-2930.

У индивидуумов, которым вводили плацебо, наблюдали приступы НАЕ на всем протяжении исследования (9 индивидуумов, 65 приступов НАЕ). В группах, которым вводили дозы 300 и 400 мг, приступы НАЕ наблюдали до или сразу после исходного введения дозы. Если уровни лекарственного средства являлись высокими (дни 8-50), у всех, кроме 1 индивидуума, отсутствовали приступы. Со снижением уровней лекарственного средства приступы появлялись снова. В анализе эффективности MITT, в дни 8-50 по сравнению с плацебо в группах, которым вводили 300 и 400 мг DX-2930, наблюдали 100% (P<0,0001) и 95% (P=0,0022) снижение приступов, соответственно.

Таким образом, это исследование свидетельствует о том, что приступы НАЕ, по существу, снижались, или их устраняли в течение периодов значительного воздействия лекарственного средства, что соответствовало предположению о том, что более высокие уровни лекарственного средства должны коррелировать с профилактикой приступов НАЕ.

Пример 4. Моделирование и анализы для идентификации потенциальных схем дозирования DX-2930 для длительной профилактики наследственного ангионевротического отека.

DX-2930 является моноклональным антителом человека, ингибитором калликреина плазмы, находящимся в стадии разработки, для профилактики приступов наследственного ангионевротического отека (НАЕ). Данные исследования фазы 1 DX-2930, как описано в примере 1 выше, моделировали и анализировали для идентификации потенциальных схем дозирования.

Исследовали фармакокинетические, фармакодинамические данные и данные об эффективности клинических исследований фазы 1. Частоту приступов НАЕ оценивали в связи с концентрациями лекарственного средства в плазме для оценки устойчивого минимума уровней лекарственного средства, необходимого для профилактики приступов.

Для опорного исследования эффективности рассматривали схемы дозирования 300 мг DX-2930 каждые 2 (q2) или 4 (q4) недели и 150 мг q4 недели. С помощью фармакокинетического моделирования прогнозируют устойчивый минимум концентраций в плазме 27000, 9500 и 4750 нг/мл, соответственно. В исследовании фазы 1b при 27000 нг/мл (соответствующей приблизительно уровням лекарственного средства в день 22 в случае 300 мг DX-2930) двухцепочечный высокомолекулярный кининоген супрессировали до уровня, приближающегося к уровню, наблюдаемому у здоровых индивидуумов. Таким образом, прогнозируют, что триста мг q2 будут нормализовать нестабильность плазмы пациента с НАЕ в равновесном состоянии. Т.к. для успешной профилактики НАЕ может не потребоваться такой высокий уровень фармакодинамического эффекта, также осуществляли анализ клинического эффекта в связи с концентрациями лекарственного средства в плазме. В исследовании фазы 1b после лечения DX-2930 происходило 24/25 приступов (96%), 21/25 (84%) и 18/25 приступов (72%) при концентрациях в плазме ниже 27000, 9500 и 4750 нг/мл, соответственно, что позволяет предполагать, что значительный диапазон клинического ответа ассоциирован с этим диапазоном воздействия лекарственного средства.

В этом анализе определяли потенциальные схемы дозирования DX-2930 для дальнейшего клиниче-

ского исследования в опорном исследовании эффективности.

Пример 5. Наследственный ангионевротический отек ассоциирован с нейропатической болью, системной красной волчанкой и системным мастоцитозом в анализе Базы данных аналитических отчетов в области здравоохранения.

Кинин-калликреиновая система (KKS) ассоциирована со множеством заболеваний в дополнение к тому, что она является ключевым медиатором наследственного ангионевротического отека (НАЕ). В этом исследовании определяли, предрасположены ли пациенты с НАЕ к развитию таких KKS-ассоциированных заболеваний, как: аневризма брюшной аорты, анафилаксия, синдром вазоплегии сердца, болезнь Крона, диабетический отек желтого пятна, идиопатическая анафилаксия, нейропатическая боль, псориаз, псориатический артрит, ретинопатия, ревматоидный артрит, системная красная волчанка (SLE), системный мастоцитоз, системный васкулит, тромботическое нарушение мозгового кровообращения и язвенный колит.

В этом исследовании использовали базу данных Truven MarketScan, содержащую отдельные отчеты по данным из медицинских страховых компаний и Дополнительного медицинского страхования для 80 миллионов человек в США с января 2010 года по июль 2014 года. В этом массиве данных выборку НАЕ (n=1063) и 2 контрольные выборки, выборку с ангионевротическим отеком (n=138851) и общую выборку, (n=79971098) за исключением пациентов с НАЕ, определяли с использованием комбинации ICD-9 и кодов рецептурных лекарственных средств. Определяли отчеты по сопутствующим заболеваниям и сравнивали среди выборок с вычисленными отношениями шансов и 95%-ными доверительными интервалами (CI).

Как представлено в табл. 8 ниже, в выборке пациентов с НАЕ SLE наблюдали в 2,3 раза чаще (OR 2,30, 95% CI: 1,47-3,59), чем в контрольной выборке с ангионевротическим отеком. Нейропатическую боль наблюдали в 1,45 раз (OR 1,45, 95% CI: 1,01-2,09) и системный мастоцитоз наблюдали в 4,79 раз (OR 4,79, 95% CI: 1,51-15,18) чаще, чем в контрольной выборке с ангионевротическим отеком.

Таблица 8

Ассоциация между НАЕ и другими связанными с KKS заболеваниями

Ассоциированные заболевания	Выборка с НАЕ		Контрольная выборка с ангионевротическим отеком		Отношение шансов (95% CI)
	N=1063	%	N=138851	%	
Аневризма брюшной аорты (AAA)	6	0,56	583	0,42	1,35 (0,60, 3,02)
Анафилаксия	86	8,09	15,293	11,01	0,72 (0,57, 0,89)
Синдром вазоплегии сердца	2	0,19	88	0,06	2,97 (0,73, 12,09)
Болезнь Крона	6	0,56	848	0,61	0,92 (0,41, 2,07)
Диабетический отек желтого пятна	2	0,19	140	0,10	1,87 (0,46, 7,55)
Идиопатическая	59	5,5	8,442	6,08	0,91

анафилаксия		5			(0,70, 1,18)
Нейропатическая боль	30	2,8 2	2,726	1,96	1,45 (1,01, 2,09)
Псориаз	14	1,3 2	2,182	1,57	0,84 (0,49, 1,42)
Псориатический артрит	4	0,3 8	382	0,28	1,37 (0,51, 3,67)
Ретинопатия	2	0,1 9	85	0,06	3,08 (0,76, 12,52)
Ревматоидный артрит	30	2,8 2	3,093	2,23	1,27 (0,89, 1,84)
Системная красная волчанка	20	1,8 8	1,148	0,83	2,30 (1,47, 3,59)
Системный мастоцитоз	3	0,2 8	82	0,06	4,79 (1,51, 15,18)
Системный васкулит	2	0,1 9	189	0,14	1,38 (0,34, 5,58)
Тромботическое нарушение мозгового кровообращения (CVA)	2	0,1 9	375	0,27	0,70 (0,17, 2,80)
Язвенный колит	9	0,8 5	902	0,65	1,31 (0,68, 2,53)

В целом, при анализе крупной базы данных многолетних отчетов выявлено, что сопутствующие заболевания SLE, нейропатическая боль и системный мастоцитоз имеют более значительное распространение среди пациентов НАЕ, чем при других типах ангионевротического отека, что позволяет предполагать, что активность KKS может способствовать манифестации этих заболеваний. Таким образом, пациенты, страдающие или имеющие риск НАЕ, могут иметь предрасположенность к KKS-ассоциированным заболеваниям, включающим нейропатическую боль, системную красную волчанку и системный мастоцитоз. Таким образом, лечение ингибитором PKa1, таким как DX-2930, может снижать риск развития такого KKS-ассоциированного заболевания.

Пример 6. Двойное слепое исследование, включающее период введения нагрузочной дозы и период поддержания дозы.

Осуществляют рандомизированное, двойное слепое, плацебо-контролируемое исследование в параллельных группах. Выбирают пациентов с НАЕ типа I или II по меньшей мере с 1 приступом за 4 недели. Используют вводный период для оценки исходной частоты приступов НАЕ. Пациентов подвергают рандомизации 1:1:1 на 3 различные исследуемые группы (300 мг DX-2930, 150 мг DX-2930 или плацебо), которым вводят лекарственное средство посредством подкожной инъекции. Исследование спланировано так, чтобы оно включало период введения нагрузочной дозы и период поддержания дозы (фиг. 14). Индивидуумам вводили лекарственное средство в дни 0, 7 и 14 в течение периода введения нагрузочной

дозы, с последующим введением каждые 2 недели в течение периода поддержания дозы (дни 28, 42, 56, 70 и 84).

#### Другие варианты осуществления

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

Из приведенного выше описания, специалист в этой области легко может определять основные характеристики настоящего изобретения и, без отклонения от его сущности и объема, может осуществлять различные изменения и модификации изобретения для его адаптации к различному применению и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также входят в объем формулы изобретения.

#### Эквиваленты

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

Следует понимать, что все определения, определенные и используемые в настоящем описании, имеют приоритет относительно определений, приведенных в словарях, определений в документах, включенных в качестве ссылок, и/или обычных значения определенных терминов.

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

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

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

Следует понимать, что в рамках изобретения в описании и формуле изобретения фраза "по меньшей мере один" по отношению к списку из одного или нескольких элементов означает по меньшей мере один элемент, выбранный из любого одного или нескольких элементов в списке элементов, но не обязательно,



включая по меньшей мере один из каждого элемента, конкретно приведенного в списке элементов и не исключающего какие-либо комбинации элементов из списка элементов. Это определение также делает возможным то, что, необязательно, могут присутствовать иные элементы, чем элементы, конкретно определенные в списке элементов, к которому относится фраза "по меньшей мере", относится ли она, или нет, к этим конкретно определенным элементам. Таким образом, в качестве неограничивающего примера, фраза "по меньшей мере один из А и В" (или эквивалентно "по меньшей мере один из А или В", или, эквивалентно "по меньшей мере один из А и/или В") может относиться в одном из вариантов осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая несколько, А в отсутствие В (и, необязательно, включая элементы, иные, чем В); в другом варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно включая несколько, В в отсутствие А (и, необязательно, включая элементы, иные, чем А); в еще одном варианте осуществления по меньшей мере к одному, необязательно, включая несколько, А и по меньшей мере одному, необязательно включая несколько, В (и, необязательно, включая другие элементы); и т.д.

Также следует понимать, что, если четко не указано иное, в любых способах, заявленных в настоящем описании, включающих несколько стадий или действий, порядок стадий или действий способа не обязательно ограничен порядком, в котором стадии или действия способа указаны.

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

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения наследственного ангионевротического отека (НАЕ), который включает введение нуждающемуся в этом индивидууму фармацевтической композиции, содержащей 300 мг антитела, которое связывается с активным калликреином плазмы, и фармацевтически приемлемый носитель,

где фармацевтически приемлемый носитель содержит фосфат натрия в концентрации 30 мМ, лимонную кислоту, гистидин в концентрации 50 мМ, хлорид натрия в концентрации 90 мМ и Tween 80 в количестве 0,01%; рН 6,0,

где антитело содержит определяющую комплементарность область

(CDR) 1 тяжелой цепи с последовательностью HYIMM (SEQ ID NO: 5),

CDR2 тяжелой цепи с последовательностью GIYSSGGITVYADSVKG (SEQ ID NO: 6),

CDR3 тяжелой цепи с последовательностью RRIGVPRRDEFDI (SEQ ID NO: 7),

CDR1 легкой цепи с последовательностью RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 8),

CDR2 легкой цепи с последовательностью KASTLES (SEQ ID NO: 9),

CDR3 легкой цепи с последовательностью QQYNTYWT (SEQ ID NO: 10); и

где индивидуумом является пациент-человек, у которого перед лечением наблюдалось по меньшей мере два приступа НАЕ в год.

2. Способ по п.1, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи с последовательностью EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 3) и

вариабельную область легкой цепи с последовательностью

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPS

RFGSGSGTEFTLTISLQPDFFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4).

3. Способ по п.1 или 2, где антитело представляет собой полноразмерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

4. Способ по любому из пп.1-3, где антитело представляет собой антитело IgG.

5. Способ по п.4, где антитело IgG представляет собой антитело IgG1.

6. Способ по любому из пп.1-5, где антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 2.

7. Способ по любому из пп.1-6, в котором фармацевтическая композиция предназначена для подкожного введения.

8. Способ по любому из пп.1-7, в котором фармацевтическую композицию вводят один раз в две недели или один раз в четыре недели.

9. Способ по п.8, в котором фармацевтическую композицию сначала вводят в течение периода нагрузки, а затем в течение периода поддержания, где в период нагрузки фармацевтическую композицию вводят один раз в неделю и где в период поддержания антитело вводят от одного раза в две недели до одного раза в четыре недели.

10. Способ профилактики наследственного ангионевротического отека (НАЕ) или снижения частоты

ты приступов НАЕ, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, как определено в любом из пп.1-7.

11. Способ по п.10, в котором фармацевтическую композицию вводят пациенту от одного раза в две недели до одного раза в четыре недели.

12. Способ по п.10, в котором фармацевтическую композицию сначала вводят в течение периода нагрузки, а затем в течение периода поддержания, где в период нагрузки фармацевтическую композицию вводят один раз в неделю и где в период поддержания фармацевтическую композицию вводят от одного раза в две недели до одного раза в четыре недели.

13. Способ профилактики наследственного ангионевротического отека (НАЕ) или снижения частоты приступов НАЕ, включающий введение пациенту фармацевтической композиции, как определено в любом из пп.1-7, где фармацевтическую композицию вводят по меньшей мере от двух раз в две недели до по меньшей мере двух раз в четыре недели.

14. Способ по любому из пп.8-13, где фармацевтическую композицию вводят подкожно.

15. Способ по любому из пп.8-14, где пациентом является человек с НАЕ типа I или типа II.

16. Способ по любому из пп.8-15, в котором у человека случался по меньшей мере один приступ НАЕ в течение 6 месяцев перед первым введением; или

где у человека случались по меньшей мере 2 приступа НАЕ в течение 3 месяцев перед первым введением; или

где у человека случалось по меньшей мере 9 приступов НАЕ в течение 3 месяцев перед первым введением.

17. Способ по любому из пп.8-16, в котором фармацевтическую композицию вводят пациенту каждые две недели.

18. Способ по любому из пп.8-16, в котором фармацевтическую композицию вводят пациенту каждые четыре недели.

19. Способ по любому из пп.8-18, в котором введение фармацевтической композиции снижает уровень расщепленного кининогена у пациента до уровня, сравнимого с уровнем здоровых субъектов.

20. Способ лечения наследственного ангионевротического отека (НАЕ), включающий введение пациенту фармацевтической композиции, как определено в любом из пп.1-7, в течение периода нагрузки, а затем в течение периода поддержания;

где в период нагрузки фармацевтическую композицию вводят один раз в неделю и

где в период поддержания фармацевтическую композицию вводят от одного раза в две недели до одного раза в четыре недели.

21. Способ по п.20, в котором фармацевтическую композицию вводят подкожно.

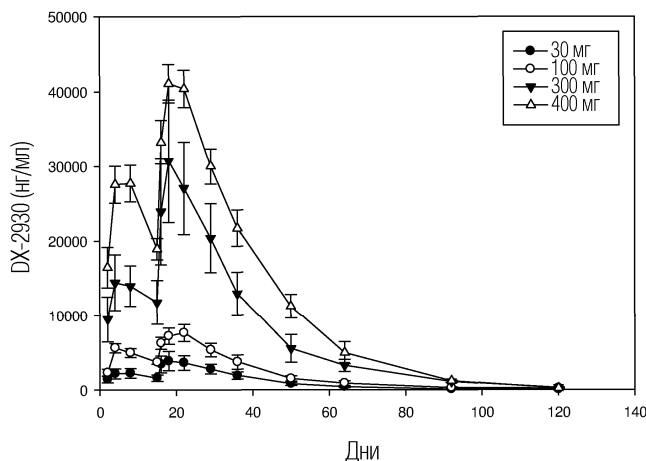
22. Способ по п.20 или 21, в котором пациентом является человек, имеющий НАЕ.

23. Способ по любому из пп.20-22, где период нагрузки составляет две недели и антитело вводят в день 0, день 7 и день 14.

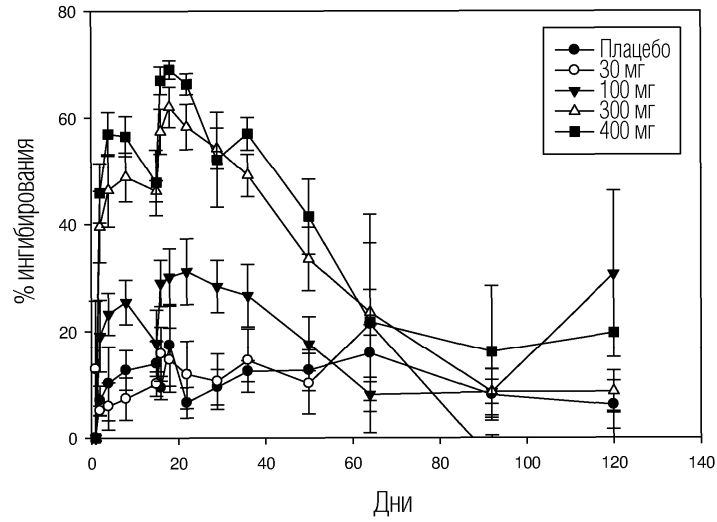
24. Способ по любому из пп.20-23, в котором период поддержания составляет 10 недель и антитело вводят в день 28, день 42, день 56, день 70 и день 84.

25. Способ по любому из пп.20-24, в котором фармацевтическую композицию дополнительно вводят пациенту после периода поддержания от одного раза в две недели до одного раза в четыре недели.

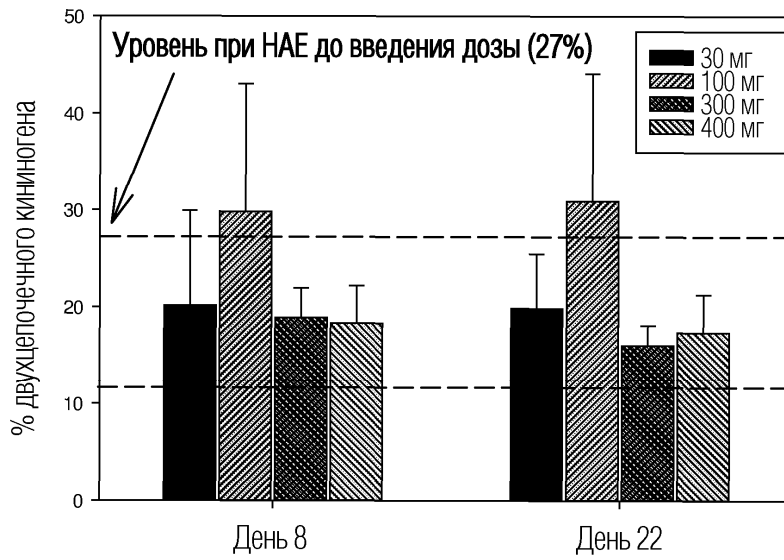
26. Способ по любому из пп.20-25, в котором пациент страдает НАЕ типа I или типа II; и/или где у пациента случался по меньшей мере один приступ каждые четыре недели перед первым введением.



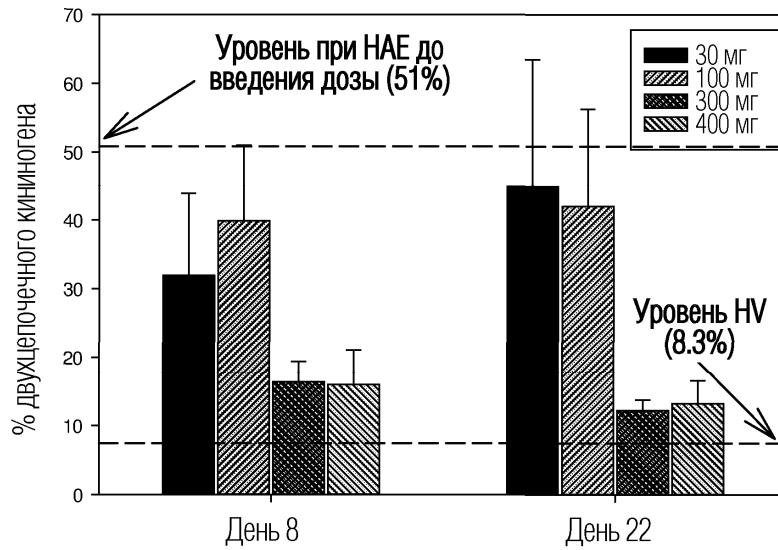
Фиг. 1



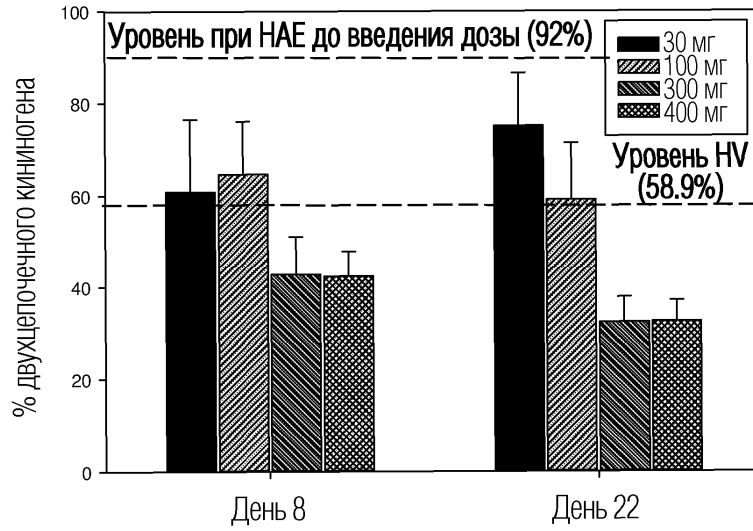
Фиг. 2



Фиг. 3

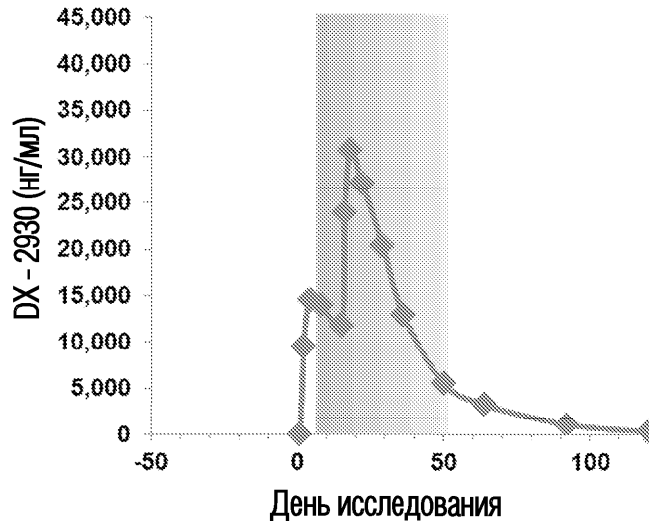


Фиг. 4

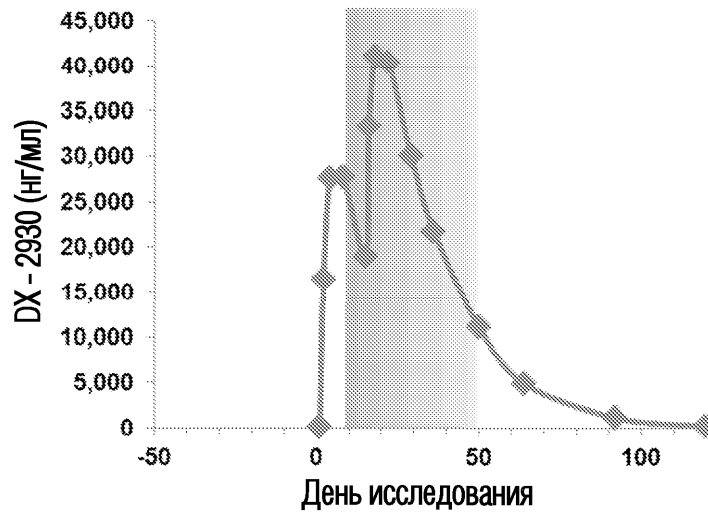


Фиг. 5

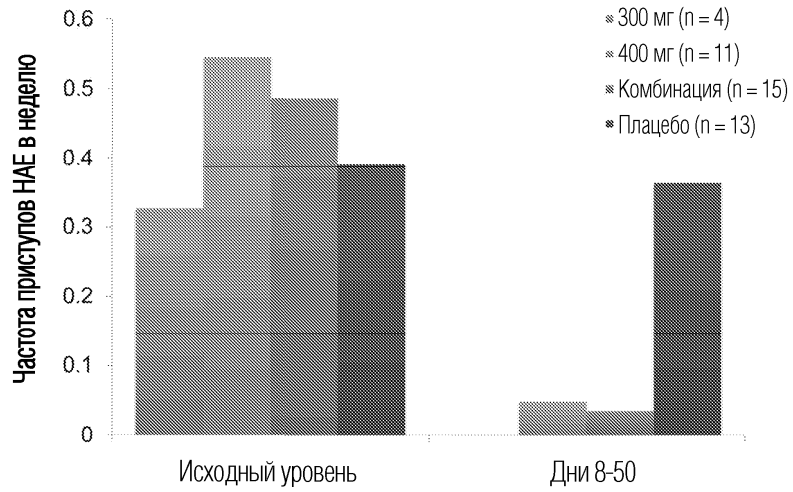
А.



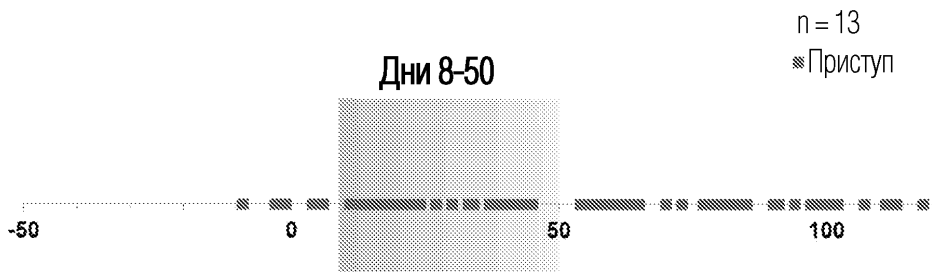
В.



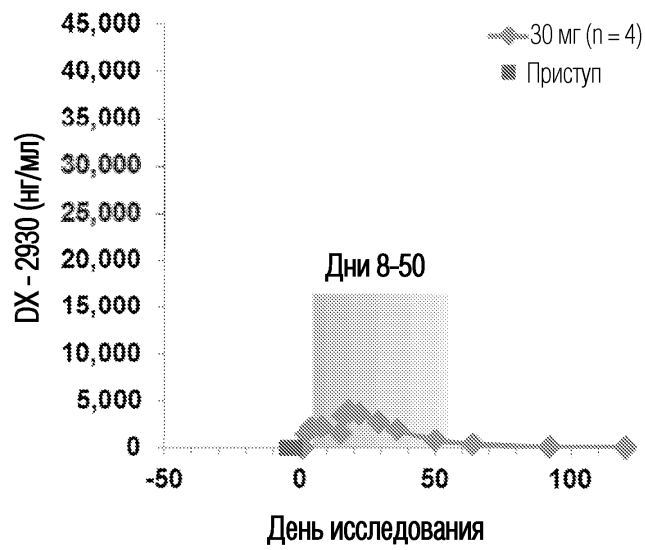
Фиг. 6



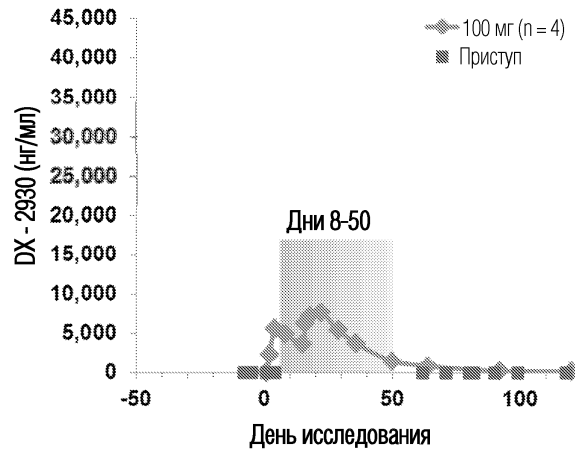
Фиг. 7



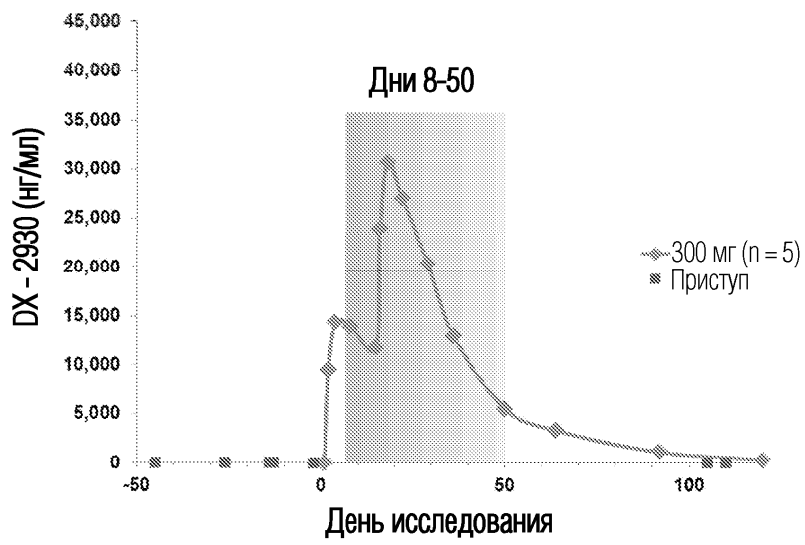
Фиг. 8



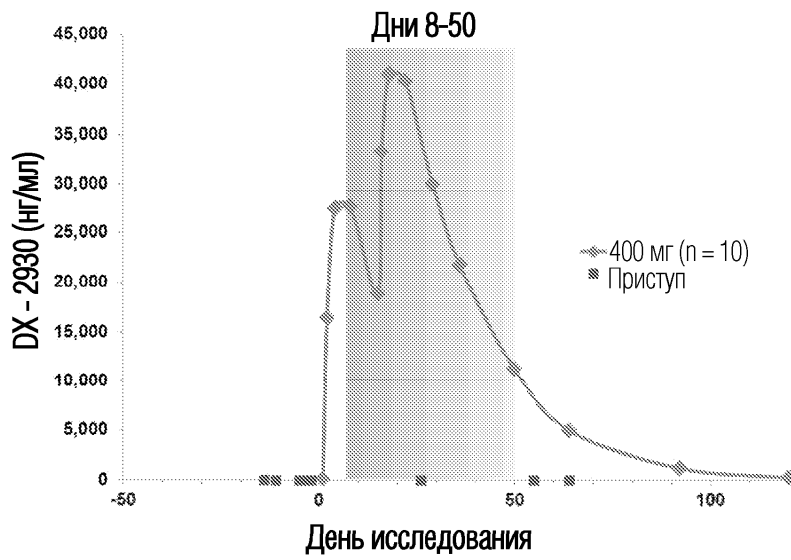
Фиг. 9



Фиг. 10

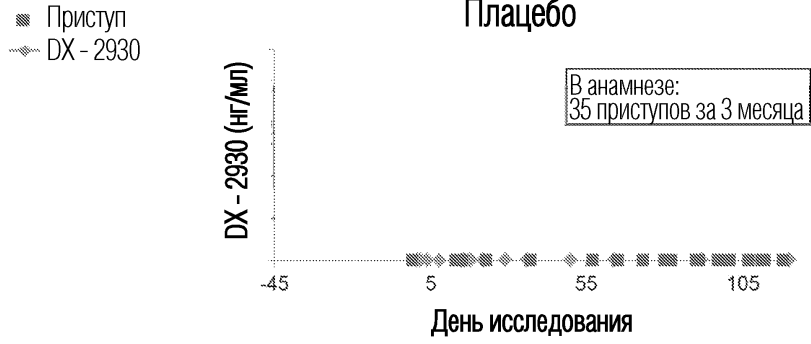


Фиг. 11

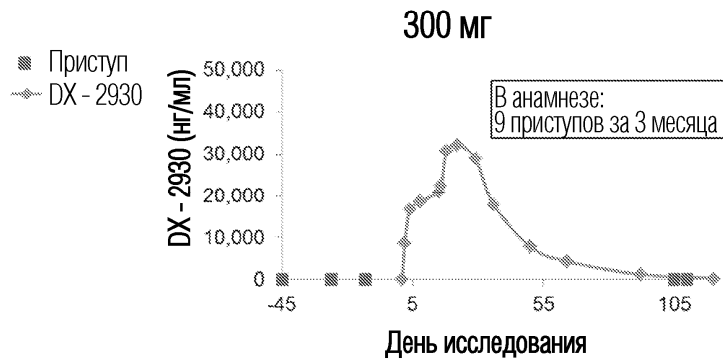


Фиг. 12

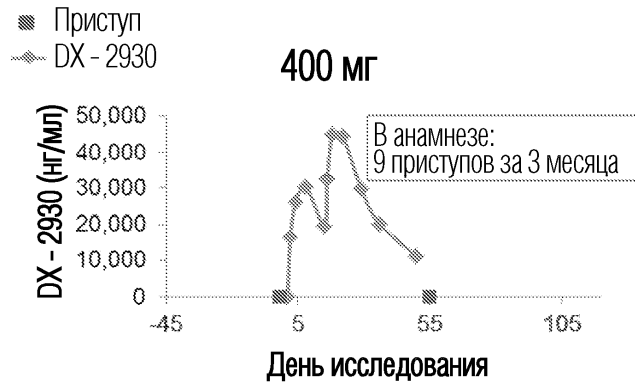
A.



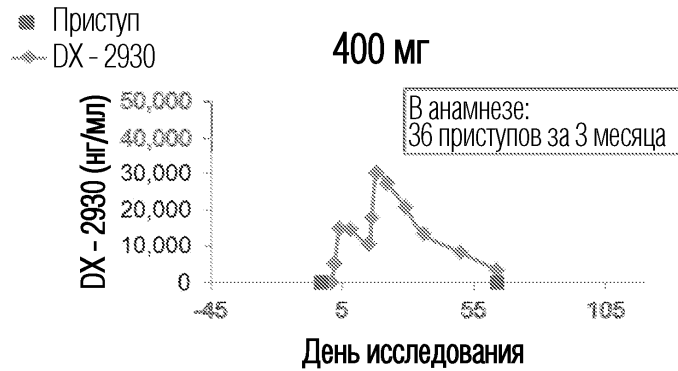
B.



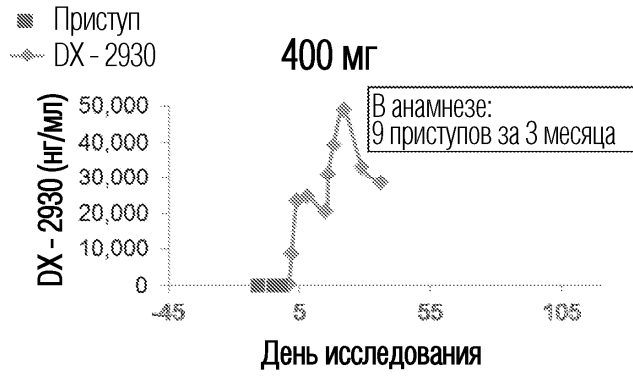
C.



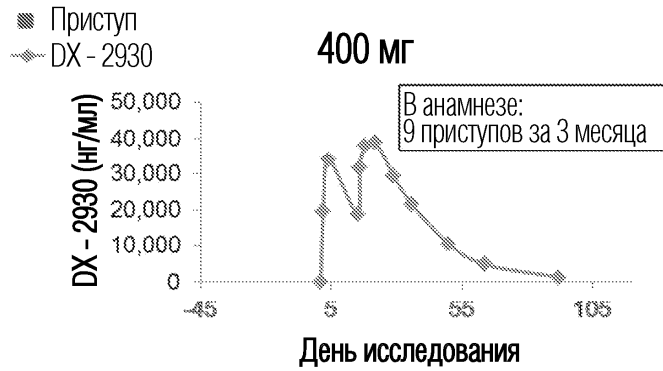
D.



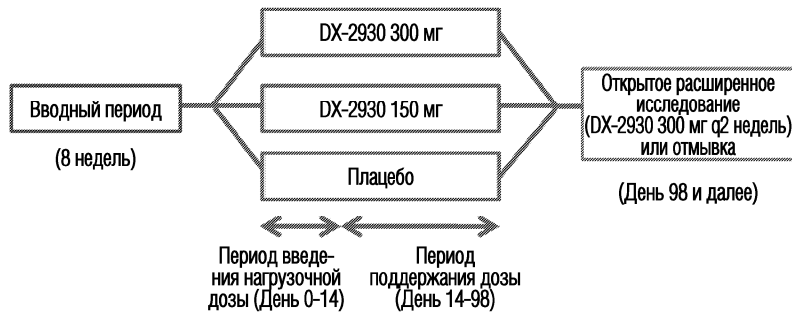
Е.



Ф.



Фиг. 13



Фиг. 14

