

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202191382** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.31

(22) Дата подачи заявки  
2015.01.21

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61P 7/00* (2006.01)  
*A61P 7/10* (2006.01)  
*C07K 16/40* (2006.01)

---

(54) **БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ КАЛЛИКРЕИН ПЛАЗМЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА**

---

(31) 61/929,716; 61/944,361; 62/021,397

(32) 2014.01.21; 2014.02.25; 2014.07.07

(33) US

(62) 201691470; 2015.01.21

(71) Заявитель:  
ДАЙЭКС КОРП. (US)

(72) Изобретатель:

Чиунг Юнг, Секстон Дэниел Дж.,  
Тенхор Кристофер, Кеннистон  
Джон А., Фосетт Райан, Ярробино  
Райан, Биденкапп Джозеф, Эйделман  
Берт (US)

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

---

(57) Настоящее изобретение предлагает белки, связывающие калликреин плазмы, такие как антитела, связывающие активный калликреин плазмы, и способы применения таких белков для лечения наследственного ангионевротического отека.

**A1**

**202191382**

**202191382**

**A1**

**БЕЛКИ, СВЯЗЫВАЮЩИЕ КАЛЛИКРЕИН ПЛАЗМЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ  
ЛЕЧЕНИЯ НАСЛЕДСТВЕННОГО АНГИОНЕВРОТИЧЕСКОГО ОТЕКА**

**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Данная заявка испрашивает приоритет на основании даты подачи предварительной заявки США № 61/929716, поданной 21 января 2014 года, предварительной заявки США № 61/944361, поданной 25 февраля 2014 года, и предварительной заявки США № 62/021397, поданной 7 июля 2014 года. Полное содержание каждой из указанных заявок включено в настоящий документ в качестве ссылки.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Калликреин плазмы является компонентом контактной системы серин-протеазы и потенциальной мишенью для лекарственных средств, направленных против разных воспалительных, сердечно-сосудистых, инфекционных (сепсис) и онкологических заболеваний (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). Контактная система активируется либо фактором XIIa после воздействия на него внешних или отрицательно заряженных поверхностей, либо на поверхностях эндотелиальных клеток пролилкарбокисипептидазами (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). Активация калликреина плазмы повышает внутреннюю коагуляцию посредством активации по принципу обратной связи фактора XII и усиливает воспаление в результате продукции провоспалительного нонапептида брадикинина. Калликреин плазмы, являющийся основной кининогеназой в кровотоке, играет важную роль в образовании брадикинина в сосудистой сети. Генетический дефицит C1-ингибиторного белка (C1-INH), основного природного ингибитора калликреина плазмы, приводит к развитию наследственного ангионевротического отека (НАЕ). Пациенты с НАЕ страдают от острых приступов болезненного отека, часто запускаемых неизвестными механизмами (Zuraw B.L. et al., *N Engl J Med* 359, 1027-1036, 2008).

**СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Настоящее изобретение отчасти основано на неожиданных результатах фармакокинетических исследований и

фармакокинетического моделирования, демонстрирующих, что дозы (например, от 100 мг до 300 мг) антитела, связывающегося с активной формой человеческого плазматического калликреина, которые поддерживают концентрацию антитела в плазме выше 80 нМ, являются достаточными для проявления полезного (например, профилактического) эффекта при лечении наследственного ангионевротического отека. Кроме того, введение DX-2930 в количестве 100 мг каждые 2 недели, или в количестве 300 мг каждые 4 недели обеспечивает стабильную концентрацию лекарственного средства в плазме выше 80 нМ, а введение DX-2930 в количестве 300 мг каждые 2 недели обеспечивает стабильную концентрацию лекарственного средства в плазме выше 200 нМ.

Настоящее изобретение также отчасти основано на неожиданном открытии, заключающемся в том, что антитела, связывающиеся с активной формой человеческого плазматического калликреина, оказывают превосходные терапевтические эффекты при лечении наследственного ангионевротического отека (НАЕ) в разных дозах (0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг) без проявления дозоограничивающей токсичности при однократных дозах до 3,0 мг/кг. Фармакокинетические результаты демонстрируют, что эффекты DX-2930 характеризуются линейной зависимостью от дозы, а средний период полувыведения составляет от 17 до 20 дней во всех группах, получающих лекарственное средство, после однократного введения здоровым индивидуумам. Фармакодинамические результаты двух разных исследовательских анализов с использованием биомаркеров подтверждают ингибирование плазматического калликреина *ex vivo* в дозо- и время-зависимой манере.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения НАЕ (например, типа I, II или III), включающий в себя введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела, способного связываться с активной формой pK<sub>1</sub>, в эффективном количестве (например, от 100 мг до 400 мг, или от 100 до 300 мг), так, чтобы концентрация антитела в плазме индивидуума составляла более чем примерно 80 нМ. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело (например, DX-2930) вводят в дозе 100 мг каждые две недели. В некоторых вариантах

осуществления изобретения антитело (например, DX-2930) вводят в количестве 300 мг каждые 2 недели, или каждые 4 недели.

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения НАЕ (например, типа I, II или III), включающий в себя (a) введение нуждающемуся в этом индивидууму первой дозы антитела (например, полноразмерного антитела или его антиген-связывающего фрагмента), способного связывать активный калликреин плазмы; (b) измерение концентрации антитела в плазме индивидуума; и (c) введение индивидууму второй дозы антитела, если концентрация антитела в плазме ниже, чем примерно 80 нМ. В некоторых вариантах осуществления первая доза, вторая доза, или обе указанные дозы находятся в диапазоне от 100 мг до 400 мг, или от 100 мг до 300 мг (например, 100 мг или 300 мг DX-2930). В некоторых вариантах осуществления вторая доза выше, чем первая доза.

Соответственно, в одном аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения НАЕ (например, типа I, II или III), включающий в себя: введение однократной дозы выделенного антитела индивидууму, нуждающемуся в этом, где антитело (например, полноразмерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент) связывает активный калликреин плазмы (например, не связывает прекалликреин). Необязательно способ дополнительно включает в себя определение уровня креатинфосфокиназы у индивидуума до и после лечения. В некоторых вариантах осуществления однократная доза любого из антител, описанных в настоящем документе, находится в диапазоне 0,1-3 мг/кг (например, она может составлять 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг).

В другом аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения наследственного НАЕ, причем указанный способ включает в себя: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, нескольких доз выделенного антитела (например, полноразмерного антитела или его антиген-связывающего фрагмента), которое связывает активный калликреин плазмы (например, антитело, которое связывает активный человеческий плазматический калликреин, но не человеческий прекалликреин), где каждые две последовательные

дозы вводят с интервалом, составляющим, по меньшей мере, 2 недели (например, 3 недели, 4 недели, 5 недель или 6 недель). В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одна из нескольких доз находится в диапазоне 0,1-3 мг/кг. Например, каждая из нескольких доз составляет 3 мг/кг. В некоторых примерах антитело вводят ежемесячно (например, каждые 28 дней), например, в течение 6 месяцев.

В следующем аспекте настоящее изобретение предлагает способ лечения НАЕ, включающий в себя: (i) введение индивидууму, нуждающемуся в этом, одной или нескольких доз выделенного антитела (например, полноразмерного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента), которое связывает активный калликреин плазмы (например, антитела, которое связывает активный человеческий плазматический калликреин, но не человеческий прекалликреин), (ii) измерение уровня ингибирования калликреина плазмы под действием антитела у индивидуума после введения последней дозы, и (iii) введение индивидууму дополнительной дозы антитела, если уровень ингибирования ниже минимального терапевтического уровня. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько доз находятся в диапазоне 0,1-3 мг/кг (например, каждая из доз может составлять 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг). В одном примере минимальный терапевтический уровень представляет собой концентрацию антитела в сыворотке или плазме, которая составляет менее чем примерно 80 нМ.

В любом из способов, описанных в настоящем документе, антитело против калликреина может представлять собой полноразмерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело связывает активный калликреин плазмы и не связывает прекалликреин.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, антитело связывается с тем же эпитопом, что и DX-2930, или конкурирует с DX-2930 за связывание с активным калликреином плазмы. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит такие же CDR тяжелой цепи, что и DX-2930, такие же CDR легкой цепи, что и DX-2930, или и те, и

другие. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело представляет собой DX-2930, которое является полноразмерным антителом IgG, как описано в данном документе, или его антиген-связывающий фрагмент.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем документе, антитело можно вводить подкожно. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой человека-пациента, страдающего от НАЕ, предрасположенного к НАЕ, или имеющего риск приступа НАЕ. Например, описанный здесь способ можно использовать для профилактики НАЕ.

В некоторых вариантах осуществления любой из описанных здесь способов может дополнительно включать в себя определение уровня креатинфосфокиназы у индивидуума до и после лечения, или на протяжении курса лечения. Если наблюдается повышение уровня креатинфосфокиназы, можно уменьшить дозу антитела (например, DX-2930) или прекратить лечение.

В следующем аспекте настоящее изобретение предлагает способ определения оптимальной дозы (например, оптимальной профилактической дозы) для лечения наследственного ангионевротического отека (НАЕ) у индивидуума, где способ включает в себя (а) введение (например, подкожное) индивидууму, нуждающемуся в этом, любого из антител, описанных в настоящем документе, способного связывать активный калликреин плазмы (например, DX-2930 или его антиген-связывающего фрагмента), в начальной дозе; (b) измерение концентрации антитела в плазме индивидуума; и (с) увеличение дозы антитела, если концентрация антитела в плазме ниже, чем примерно 80 нМ; где дозу, обеспечивающую концентрацию антитела в плазме выше, чем примерно 80 нМ, выбирают в качестве дозы, оптимальной для профилактики индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум представляет собой пациента-человека, у которого отсутствуют симптомы НАЕ во время введения антитела. В некоторых вариантах осуществления начальная доза находится в диапазоне примерно от 100 мг до 400 мг, или от 100 мг до 300 мг (например, она может составлять 100 мг или 300 мг DX-2930).

Описанный выше способ может дополнительно включать в себя определение уровня креатинфосфокиназы у индивидуума до и после лечения, или на протяжении курса лечения. Кроме того, способ может дополнительно включать в себя уменьшение дозы антитела или прекращение лечения, если наблюдается повышение уровня креатинфосфокиназы.

В любом из описанных здесь способов концентрацию антитела в плазме можно измерить с помощью анализа активности калликреина в плазме или иммунного анализа.

Настоящее изобретение также предлагает: (a) фармацевтическую композицию, которую можно использовать для лечения НАЕ или определения оптимальной дозы лекарственного средства для лечения НАЕ, где фармацевтическая композиция содержит одно из описанных здесь антител против калликреина, и фармацевтически приемлемый носитель, и (b) применение фармацевтической композиции в способе промышленного получения лекарственного средства для лечения НАЕ. Применение антител в определенных целях можно осуществлять в описанных здесь условиях дозирования.

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

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ**

На фиг. 1 приведен график, демонстрирующий среднюю концентрацию DX-2930 после подкожного (п.к.) введения здоровым индивидуумам. Графики зависимости концентрации от времени для каждой группы, получающей лекарственное средство, отображаются на логарифмической шкале. Отрезки, отражающие величину ошибки, соответствуют стандартному отклонению. Профили демонстрируют линейную зависимость от дозы. Параллельные фазы выведения во всех группах, получающих лекарственное средство, согласуются с данными, полученными для хорошо изученного антитела с дозо-независимой кинетикой, поскольку для всех доз получают

одинаковые результаты.

На фиг. 2 приведен график, изображающий прогнозируемые концентрации в плазме здоровых индивидуумов после повторного подкожного введения 3 мг/кг DX-2930 через каждые 28 дней.

На фиг. 3 приведен график, изображающий общие принципы применения лекарственного средства для профилактики болезненного состояния.

На фиг. 4 приведен график, изображающий общие принципы применения DX-2930 для профилактики НАЕ.

На фиг. 5 приведен график, иллюстрирующий сравнительную ингибиторную активность DX-2930 и экалантида в отношении pKal *in vitro*.

На фиг. 6 приведен график, иллюстрирующий альтернативные гипотезы, касающиеся требования постоянно поддерживать концентрацию DX-2930 в плазме на уровне 80 нМ или выше для лечения и/или профилактики НАЕ. Альтернативно для лечения и/или профилактики НАЕ может потребоваться концентрация DX-2930 в плазме, величина которой ниже или выше 80 нМ.

На фиг. 7 приведен график, демонстрирующий, что уровень лекарственного средства в плазме, равный или превышающий 80 нМ, достигается после введения разовой дозы 3 мг/кг DX-2930.

На фиг. 8 приведен график, изображающий фармакокинетическое (PK) моделирование периодического подкожного введения здоровым индивидуумам DX-2930 в дозе 3 мг/кг каждые 28 дней.

На фиг. 9 приведен график, изображающий фармакодинамический (PD) эффект DX-2930, вводимого здоровым индивидуумам подкожно в дозе 3 мг/кг каждые 28 дней.

На фиг. 10 приведен график, изображающий результаты фармакодинамического (PD) и фармакокинетического (PK) анализа после введения однократной дозы (3 мг/кг) DX-2930. Результаты PD приводят в виде графика зависимости относительного % ингибирования активности pKal от времени. Результаты PK приводят в виде графика зависимости концентрации (нМ) DX-2930 в плазме от времени. \*: значение  $P < 0,05$  для дозы 3 мг/кг на 5-й день по сравнению с плацебо.

На фиг. 11 приведен график, изображающий результаты



фармакодинамического (PD) анализа активности DX-2930 в отношении природного биологического субстрата (расщепление HMWK измеряют по образованию 2-цепочечного HMWK).

На фиг. 12 приведен график, демонстрирующий устойчивую биоактивность DX-2930 в течение длительного времени после однократного введения 3 мг/кг DX-2930. \*: значение  $P < 0,05$  для 3 мг/кг на 28-й день по сравнению с результатами, полученными до введения дозы.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

### Определения

Для удобства перед нижеследующим описанием настоящего изобретения приводятся определения некоторых терминов, используемых в описании, примерах и прилагаемой формуле изобретения. Определения других терминов приводятся при их упоминании в описании.

Если контекст однозначно не указывает иначе, термины, используемые в единственном числе, включают в себя ссылки на множественное число.

Термин "антитело" относится к белку, который содержит, по меньшей мере, один переменный домен (переменный участок) иммуноглобулина или последовательность переменного домена (переменного участка) иммуноглобулина. Например, антитело может содержать переменный участок тяжелой цепи (H) (сокращенно обозначаемый здесь VH или HV) и переменный участок легкой цепи (L) (сокращенно обозначаемый здесь VL или LV). В другом примере антитело содержит два переменных участка тяжелой цепи (H) и два переменных участка легкой цепи (L). Термин "антитело" охватывает антиген-связывающие фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела, фрагменты Fab и sFab, F(ab')<sub>2</sub>, Fd-фрагменты, Fv-фрагменты, ScFv и фрагменты доменных антител (dAb) (de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39)), а также полноразмерные антитела. Антитело может иметь структурные признаки IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипов). Антитела могут быть получены из любого источника, однако предпочтительными являются антитела приматов (включающих в себя человека и отличных от человека приматов) и

приматизированные антитела.

Домены VH и VL можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности, называемые "участки, определяющие комплементарность" ("CDR"), перемежающиеся более консервативными участками, называемыми "каркасные участки" ("FR"). Границы каркасных участков и CDR установлены (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, and Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917). В настоящем описании используют определения Kabat. Каждый VH и VL, как правило, состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

В настоящем описании термин "последовательность вариабельного домена иммуноглобулина" относится к аминокислотной последовательности, которая может образовывать структуру вариабельного домена иммуноглобулина таким образом, что один или несколько участков CDR располагаются в конформации, обеспечивающей формирование антиген-связывающего участка. Например, последовательность может включать в себя всю аминокислотную последовательность природного вариабельного домена, или ее часть. Например, в последовательности могут отсутствовать одна, две или более N- или C-концевых аминокислот или внутренних аминокислот, последовательность может содержать одну или несколько вставок или дополнительных концевых аминокислот, или последовательность может содержать другие изменения. В одном варианте осуществления полипептид, который включает в себя последовательность вариабельного домена, может быть связан с другой последовательностью вариабельного домена иммуноглобулина, образуя антиген-связывающий участок, например, структуру, которая предпочтительно взаимодействует с калликреином, присутствующим в плазме.

VH- или VL-цепь антитела также может содержать весь константный участок тяжелой или легкой цепи, или его часть, образуя таким образом тяжелую или легкую цепь иммуноглобулина,

соответственно. В одном варианте осуществления изобретения антитело представляет собой тетрамер, состоящий из двух тяжелых цепей иммуноглобулина и двух легких цепей иммуноглобулина, где тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов соединяются посредством, например, дисульфидных связей. Константный участок тяжелой цепи IgG включает в себя три домена иммуноглобулина, CH1, CH2 и CH3. Константный участок легкой цепи включает в себя домен CL. Вариабельный участок тяжелой или легкой цепи содержит связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные участки антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами хозяина, в том числе, с разными клетками иммунной системы (например, с эффекторными клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента. Легкие цепи иммуноглобулинов можно подразделить на типы каппа или лямбда. В одном варианте осуществления антитело является гликозилированным. Антитело может участвовать в антитело-зависимой цитотоксичности и/или комплемент-опосредованной цитотоксичности.

Один или несколько участков антитела могут быть человеческими или фактически человеческими. Например, один или несколько из вариабельных участков могут быть человеческими или фактически человеческими. Например, один или несколько CDR могут быть человеческими, например, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 и/или LC CDR3. Каждый из CDR легкой цепи (LC) и/или тяжелой цепи (HC) может быть человеческим. HC CDR3 может быть человеческим. Один или несколько каркасных участков могут быть человеческими, например, FR1, FR2, FR3 и/или FR4 из HC и/или LC. Например, Fc-участок может быть человеческим. В одном варианте осуществления все каркасные участки являются человеческими, например, они могут быть получены из человеческой соматической клетки, такой как кроветворная клетка, которая продуцирует иммуноглобулины, или не кроветворная клетка. В одном из вариантов осуществления человеческие последовательности представляют собой зародышевые последовательности, например, кодируемые зародышевой нуклеиновой кислотой. В одном из вариантов осуществления каркасные (FR) остатки выбранного Fab

могут быть преобразованы в аминокислотные остатки, соответствующие остаткам, кодируемым наиболее близким геном зародышевой линии приматов, особенно геном зародышевой линии человека. Один или несколько из константных участков могут быть человеческими или фактически человеческими. Например, по меньшей мере, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 или 100% переменного домена, константного участка, константных доменов (СН1, СН2, СН3, и/или СL1) иммуноглобулина, или полноразмерного антитела, могут быть человеческими или фактически человеческими.

Полноразмерное антитело, или его часть, могут кодироваться геном иммуноглобулина, или его сегментом. Примеры генов человеческих иммуноглобулинов включают в себя гены константных участков каппа, лямбда, альфа (IgA1 и IgA2), гамма (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), дельта, эпсилон и мю, а также множество генов переменных участков иммуноглобулинов. "Легкие цепи" полноразмерного иммуноглобулина (примерно 25 кДа, или примерно 214 аминокислот) кодируются геном переменного участка на NH<sub>2</sub>-конце (примерно 110 аминокислот) и геном константного участка каппа или лямбда на COOH-конце. Аналогичным образом "тяжелые цепи" полноразмерного иммуноглобулина (примерно 50 кДа, или примерно 446 аминокислот) кодируются геном переменного участка (примерно 116 аминокислот) и одним из других указанных выше генов константного участка, например, гамма (кодирующим примерно 330 аминокислот). Длина человеческого HC значительно варьирует, поскольку CDR3 HC может содержать примерно от 3 аминокислотных остатков до более 35 аминокислотных остатков.

Термин "антиген-связывающий фрагмент" полноразмерного антитела относится к одному или нескольким фрагментам полноразмерного антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с представляющей интерес мишенью. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антиген-связывающий фрагмент" полноразмерного антитела и сохраняющие функциональные характеристики, включают в себя (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирном

участке; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена VH; и (vi) выделенный участок, определяющей комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются разными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных методов, используя синтетический линкер, который обеспечивает образование одной белковой цепи, в которой участки VL и VH спариваются, образуя одновалентную молекулу, известную 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 антитела можно получить с помощью любого подходящего способа, включающего в себя стандартные методы, известные специалистам в данной области техники. Термин "моноспецифическое антитело" относится к антителу, которое обладает специфичностью и аффинностью связывания в отношении одной конкретной мишени, например, одного эпитопа. Данный термин включает в себя термины "моноклональное антитело" или "композиция моноклонального антитела", которые в настоящем описании относятся к препаратам антител или их фрагментов одного молекулярного состава, независимо от способа получения антитела.

Антитела "делают зародышевыми" путем замены одной или нескольких незародышевых аминокислот в каркасных участках на соответствующие аминокислоты зародышевого антитела, при условии, что связывающие свойства в основном сохраняются.

Константа ингибирования ( $K_i$ ) является показателем ингибиторной активности; она представляет собой концентрацию ингибитора, необходимую для снижения активности фермента в два раза и не зависит от концентрации фермента или субстрата. Кажущуюся  $K_i$  ( $K_{i,app}$ ) определяют при разных концентрациях субстрата путем измерения ингибиторного эффекта, оказываемого разными концентрациями ингибитора (например, ингибиторного связывающего белка) на протекание реакции (например, на активность фермента); путем подгонки изменения константы

скорости псевдо-первого порядка в зависимости от концентрации ингибитора к уравнению Моррисона (уравнение 1) можно определить значение кажущейся  $K_i$ .  $K_i$  соответствует точке пересечения с осью  $y$ , определенной путем линейного регрессионного анализа кривой зависимости  $K_{i,app}$  от концентрации субстрата.

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

Уравнение 1

В данном уравнении  $v$ =измеренная скорость;  $v_o$ =скорость в отсутствии ингибитора;  $K_{i,app}$ =кажущаяся константа ингибирования;  $I$ =общая концентрация ингибитора; и  $E$ =общая концентрация фермента.

В настоящем описании термин "средство связывания" относится к кажущейся константе ассоциации или  $K_A$ .  $K_A$  представляет собой величину, обратную константе диссоциации ( $K_D$ ). Например, средство связывающего антитела к конкретной молекуле-мишени, такой как калликреин плазмы, может составлять, по меньшей мере,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  and  $10^{11}$   $M^{-1}$ . Связывающее антитело обладает более высоким средством к первой мишени, чем ко второй мишени, если связывание антитела с первой мишенью характеризуется более высоким значением  $K_A$  (или меньшим числовым значением  $K_D$ ), чем связывание антитела со второй мишенью. В таких случаях связывающее антитело является специфичным к первой мишени (такой как белок в первой конформации, или его миметик) по сравнению со второй мишенью (такой как тот же самый белок во второй конформации, или его миметик; или второй белок). Различия в средстве связывания (используемые, например, для определения специфичности, или для других сравнений) могут составлять, по меньшей мере, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 или  $10^5$  раз.

Средство связывания можно определить с помощью разных методов, включающих в себя равновесный диализ, равновесное связывание, гель-фильтрацию, ELISA, поверхностный плазмонный резонанс или спектроскопию (например, с использованием

флуоресцентного анализа). Как правило, определение сродства связывания проводят в буфере HBS-P (10 mM HEPES, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,005% (об/об) поверхностно-активного вещества P20). Указанные методы можно использовать для измерения концентрации связанного и свободного связывающего белка как функции от концентрации связывающего белка (или мишени). Зависимость концентрации связанного связывающего белка ([связанный]) от концентрации свободного связывающего белка ([свободный]) и концентрации на мишени участков связывания связывающего белка, где (N) обозначает число участков связывания на молекуле мишени, описывается следующим уравнением:

$$[\text{связанный}] = N \times [\text{свободный}] / (1/K_A + [\text{свободный}]) .$$

Не всегда требуется точное определение  $K_A$ , иногда достаточно провести количественное измерение сродства, например, с помощью такого метода, как ELISA или FACS, которое пропорционально  $K_A$  и, следовательно, может использоваться для сравнения, например, так можно определить, что сродство является, например, в 2 раза выше, или провести качественное определение сродства, или получить данные о сродстве, например, на основании активности, определенной в функциональном анализе, таком как анализ *in vitro* или *in vivo*.

Термин "связывающее антитело" (или "связывающий белок", используемый в настоящем описании как равнозначный термин) относится к антителу, которое может взаимодействовать с молекулой-мишенью. Данный термин используется как синоним термина "лиганд". Термин "антитело, связывающее калликреин плазмы", относится к антителу, способному взаимодействовать с калликреином плазмы (например, связывать калликреин плазмы), и включает в себя, в частности, антитела, которые способны предпочтительно или специфически взаимодействовать с калликреином плазмы, и/или ингибировать калликреин плазмы. Антитело ингибирует калликреин плазмы, если оно вызывает уменьшение активности калликреина плазмы по сравнению с активностью калликреина плазмы в отсутствии антитела в тех же условиях.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток, имеющий подобную боковую цепь. В данной области существует определение семейств аминокислотных остатков, имеющих подобные боковые цепи. Указанные семейства включают в себя аминокислоты, содержащие основные боковые цепи (такие как лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (такие как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (такие как глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (такие как аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (такие как треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (такие как тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин).

Один или несколько из аминокислотных остатков каркасного участка и/или CDR связывающего белка могут быть изменены (например, связывающий белок может содержать одну или несколько мутаций (таких как замены (например, консервативные замены или замены на неэссенциальные аминокислоты), вставки или делеции) по сравнению с описанным здесь связывающим белком. Белок, связывающий калликреин плазмы может содержать мутации (например, замены (такие как консервативные замены или замены на неэссенциальные аминокислоты), инсерции или делеции) (например, он может содержать, по меньшей мере, одну, две, три или четыре мутации, и/или не более, чем 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 или 2 мутации) по сравнению со связывающим белком, описанным в настоящем документе, например, мутации, которые не оказывают существенного влияния на функционирование белка. Указанные мутации могут присутствовать в каркасных участках, CDR и/или константных участках. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в каркасном участке. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в CDR. В некоторых вариантах осуществления мутации присутствуют в константном участке. Является ли конкретная замена допустимой, то есть, не оказывающей неблагоприятного влияния на биологические свойства, такие как связывающая активность, можно предсказать, например,



путем определения, является ли мутация консервативной, или с помощью метода of Bowie, et al. (1990) Science 247:1306-1310.

"Фактически человеческий" варибельный участок иммуноглобулина представляет собой варибельный участок иммуноглобулина, который в достаточном числе положений содержит аминокислоты человеческого каркасного участка, благодаря чему варибельный участок иммуноглобулина не вызывает иммунный ответ у здорового человека. "Фактически человеческое" антитело представляет собой антитело, которое в достаточном числе положений содержит человеческие аминокислоты, благодаря чему антитело не вызывает иммунный ответ у здорового человека.

"Эпитоп" представляет собой участок на соединении-мишени, с которым связывается связывающий белок (например, антитело, такое как Fab или полноразмерное антитело). Если соединение-мишень представляет собой белок, указанный участок может состоять только из аминокислотных компонентов, только из химически модифицированных аминокислот белка (таких как гликозильные фрагменты), или из их сочетаний. Перекрывающиеся эпитопы содержат, по меньшей мере, один общий аминокислотный остаток, одну общую гликозильную группу, фосфатную группу, сульфатную группу, или другой общий фрагмент молекулы.

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, что и второе связывающее антитело, или с участком, который перекрывается (например, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или 100%, например, в случае аминокислотной последовательности или другого фрагмента молекулы (такого как гликозильная группа, фосфатная группа или сульфатная группа)) с участком, с которым связывается второе связывающее антитело.

Первое связывающее антитело "конкурирует за связывание" со вторым связывающим антителом, если при связывании первого связывающего антитела с эпитопом уменьшается (например, на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% или более) количество второго связывающего антитела, связанного с эпитопом. Конкуренция может быть непосредственной (например, если первое и

второе связывающие антитела связываются с одним и тем же эпитопом, или с перекрывающимися эпитопами), или косвенной (например, если связывание первого связывающего антитела с его эпитопом вызывает стерическое изменение соединения-мишени, которое снижает способность второго связывающего антитела связываться с его эпитопом).

Расчеты "гомологии" или "идентичности" двух последовательностей (данные термины используются здесь как взаимозаменяемые) выполняют следующим образом. Последовательности выравнивают с целью оптимального сравнения (например, для оптимального выравнивания можно ввести пробелы в одну или обе из первой и второй аминокислотных или нуклеотидных последовательностей, причем не гомологичные последовательности можно не учитывать при сравнении). Оптимальное выравнивание определяют как наилучший результат, полученный с помощью программы GAP, входящей в пакет программ GCG, при использовании матрицы оценок Blossum 62, где штраф за открытие пробела равен 12, штраф за продолжение пробела равен 4, а штраф за сдвиг рамки пробела равен 5. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных или нуклеотидных положениях. Если определенное положение первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение второй последовательности, то молекулы являются идентичными по данному положению (в соответствии с данным описанием термин "идентичность" аминокислот или нуклеиновых кислот эквивалентен термину "гомология" аминокислот или нуклеиновых кислот). Процент идентичности двух последовательностей является функцией от числа идентичных положений в указанных последовательностях.

В предпочтительном варианте осуществления длина стандартной последовательности, выравниваемой с целью сравнения, составляет, по меньшей мере, 30%, предпочтительно, по меньшей мере, 40%, более предпочтительно, по меньшей мере, 50%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, 60%, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% или 100% от длины стандартной последовательности. Например,

длина стандартной последовательности может быть равна длине последовательности переменного домена иммуноглобулина.

"Гуманизированный" переменный участок иммуноглобулина представляет собой модифицированный переменный участок иммуноглобулина, который содержит достаточное число положений, в которых находятся аминокислотные остатки человеческого каркасного участка, благодаря чему переменный участок иммуноглобулина не вызывает иммунный ответ у здорового человека. Описания "гуманизированных" иммуноглобулинов можно найти, например, в патенте США 6407213 и в патенте США 5693762.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое отделено, по меньшей мере, от 90%, по меньшей мере, одного из компонентов природного образца, из которого может быть получено выделенное антитело. Антитела могут иметь "по меньшей мере" определенную степень чистоты, если чистота образцов, или популяции представляющих интерес образцов, составляет, по меньшей мере, 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 или 99% по массе.

"Пациент", "индивидуум" или "хозяин" (данные термины используются как взаимозаменяемые), подлежащий лечению с помощью описанного здесь способа, может представлять собой человека или отличного от человека животного.

Термины "прекалликреин" и "преплазматический калликреин" используются в настоящем описании как взаимозаменяемые и относятся к зимогенной форме активного плазматического калликреина, который также известен как прекалликреин.

В настоящем описании термин "по существу идентичный" (или "по существу гомологичный") используют для обозначения первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности, содержащей достаточное число аминокислотных остатков или нуклеотидов, идентичных или эквивалентных (например, содержащих подобную боковую цепь, например, аминокислотных остатков, введенных в результате консервативной замены) соответствующим аминокислотным остаткам или нуклеотидам второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, так, что первая и вторая аминокислотные или нуклеотидные последовательности обладают подобными активностями

(или кодируют белки, обладающие подобными активностями), включающими в себя связывающую активность, специфичность связывания или биологическую активность. В случае антител второе антитело имеет такую же специфичность, как и первое антитело, и сродство, составляющее, по меньшей мере, 50%, по меньшей мере, 25%, или, по меньшей мере, 10% от сродства первого антитела в отношении того же антигена.

Последовательности, подобные или гомологичные (например, по меньшей мере, примерно на 85% идентичные) раскрытым здесь последовательностям, также являются частью данной заявки. В некоторых вариантах осуществления идентичность последовательностей может составлять примерно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше. В некоторых вариантах осуществления последовательность антитела, связывающего калликреин плазмы, может быть идентична последовательности антитела, описанного в данном документе, примерно на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления последовательность антитела, связывающего калликреин плазмы, может быть идентична последовательности каркасного участка HC и/или LC (например, FR 1, 2, 3 и/или 4 HC и/или LC) описанного здесь антитела (например, DX-2930) примерно на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления последовательность антитела, связывающего калликреин плазмы, может быть идентична последовательности CDR HC и/или LC (например, CDR 1, 2 и/или 3 HC и/или LC) описанного здесь антитела (например, DX-2930) примерно на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более. В некоторых вариантах осуществления последовательность антитела, связывающего калликреин плазмы, может быть идентична последовательности константного участка (например, CH1, CH2, CH3 и/или CL1) описанного здесь антитела (например, DX-2930) примерно на 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более.

Кроме того, значительная степень идентичности существует, если сегменты нуклеиновых кислот гибридизуются в выбранных

условиях (например, в условиях высокой жесткости) с комплементарной цепью. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или по существу чистой форме.

Статистическую значимость можно определить с помощью любого способа, известного в данной области. Примеры статистических анализов включают в себя: Т-тест Стьюдента, непараметрический U-тест Манна-Уитни и непараметрический статистический тест Уилкоксона. Некоторые статистически значимые зависимости характеризуются значением  $P$  меньше 0,05 или 0,02. Различия в специфичности или связывающей способности отдельных связывающих белков могут являются статистически значимыми (например, значение  $P < 0,05$  или 0,02). Термины "индуцирует", "ингибирует", "потенцирует", "повышает", "увеличивает", "уменьшает" и т.п., например, означающие различные качественные или количественные различия между двумя состояниями, могут относиться к различию, например, к статистически значимому различию между этими двумя состояниями.

"Терапевтически эффективная доза" предпочтительно изменяет измеряемый параметр, например, активность калликрейна плазмы, в статистически значимой степени, или, по меньшей мере, примерно на 20%, более предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 40%, еще более предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 60%, и еще более предпочтительно, по меньшей мере, примерно на 80% по сравнению с индивидуумами, не подвергавшимися лечению. Способность соединения модулировать измеряемый параметр, например, параметр, связанный с заболеванием, можно оценить с помощью системы животной модели, позволяющей прогнозировать эффективность в отношении человеческих расстройств и состояний. Альтернативно данное свойство композиции можно оценить путем анализа способности соединения модулировать параметр *in vitro*.

Термин "лечение", используемый в данном описании, относится к применению или введению композиции, содержащей одно или несколько активных средств, индивидууму, который имеет аллергическое заболевание, симптом аллергического заболевания или предрасположенность к аллергическому заболеванию, с целью

излечения, исцеления, облегчения, ослабления, изменения, восстановления, улучшения, оздоровления, или влияния на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию. Термин "профилактическое лечение", также известный как "превентивное лечение" относится к лечению, которое направлено на защиту человека от заболевания, или на снижение риска заболевания, к которому он или она предрасположен, или может быть предрасположен.

Термин "предотвращение" заболевания у индивидуума относится к фармацевтической обработке индивидуума, например, путем введения лекарственного средства, в результате чего предотвращается появление, по меньшей мере, одного симптома заболевания, то есть, лекарственное средство вводят до клинического проявления нежелательного состояния (например, заболевания или другого нежелательного состояния животного-хозяина) так, чтобы оно защищало хозяина от развития нежелательного состояния. Термин "предотвращение" заболевания также может упоминаться как "профилактика" или "профилактическое лечение".

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

#### **Антитела, связывающие калликреин плазмы**

Антитела, связывающие калликреин плазмы, предназначенные для применения в описанных здесь способах, могут быть полноразмерными (такими как IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (например, IgA1, IgA2), IgD и IgE), или они могут содержать только антиген-связывающий фрагмент (например, фрагмент Fab, F(ab')<sub>2</sub> или ScFv). Связывающее антитело может содержать две тяжелые цепи иммуноглобулинов и две легкие цепи иммуноглобулинов, или оно может представлять собой одноцепочечное антитело. Антитела, связывающие калликреин

плазмы, могут представлять собой рекомбинантные белки, такие как гуманизированные, CDR-привитые, химерные, деиммунизированные, или полученные *in vitro* антитела, и необязательно могут содержать константные участки, полученные из последовательностей человеческих зародышевых иммуноглобулинов. В одном из вариантов осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, представляет собой моноклональное антитело.

В одном аспекте изобретение предлагает антитело (например, выделенное антитело), которое связывается с калликреином плазмы (например, с человеческим калликреином плазмы и/или с мышинным калликреином) и содержит, по меньшей мере, один переменный участок иммуноглобулина. Например, антитело содержит последовательность переменного домена тяжелой цепи (НС) иммуноглобулина и/или последовательность переменного домена легкой цепи (ЛС) иммуноглобулина. В одном варианте осуществления антитело связывается с калликреином плазмы, например, с человеческим плазматическим калликреином и/или мышинным калликреином, и ингибирует его.

Антитело может характеризоваться наличием одного или нескольких из следующих признаков: (а) присутствие человеческого CDR, или человеческого каркасного участка; (b) последовательность переменного домена НС иммуноглобулина содержит один или несколько (например, 1, 2 или 3) CDR, которые, по меньшей мере, на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны CDR описанного здесь переменного домена НС; (с) последовательность переменного домена ЛС иммуноглобулина содержит один или несколько (например, 1, 2 или 3) CDR, которые, по меньшей мере, на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны CDR описанного здесь переменного домена ЛС; (d) последовательность переменного домена ЛС иммуноглобулина, по меньшей мере, на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности описанного здесь переменного домена ЛС (например, полноразмерного или его каркасных участков или CDR); (е) последовательность переменного домена НС иммуноглобулина, по меньшей мере, на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97,

98, 99 или 100% идентична последовательности описанного здесь переменного домена HC (например, полноразмерного или его каркасных участков или CDR); (f) антитело связывает эпитоп, с которым связывается описанное здесь антитело, или конкурирует за связывание с описанным здесь антителом; (g) присутствие CDR приматов или каркасного участка приматов; (h) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина содержит CDR1, отличающийся, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2 или 3 аминокислоты от CDR1 описанного здесь переменного домена HC; (i) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина содержит CDR2, отличающийся, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 аминокислот от CDR2 описанного здесь переменного домена HC; (j) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина содержит CDR3, отличающийся, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот от CDR3 описанного здесь переменного домена HC; (k) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина содержит CDR1, отличающийся, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2, 3, 4 или 5 аминокислот от CDR1 описанного здесь переменного домена LC; (l) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина содержит CDR2, отличающийся, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2, 3 или 4 аминокислоты от CDR2 описанного здесь переменного домена LC; (m) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина содержит CDR3, отличающийся, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2, 3, 4 или 5 аминокислот от CDR3 описанного здесь переменного домена LC; (n) последовательность переменного домена LC иммуноглобулина отличается, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот от описанного здесь переменного домена LC (например, полноразмерного или его каркасных участков или CDR); и (o) последовательность переменного домена HC иммуноглобулина отличается, по меньшей мере, на одну аминокислоту, но не более чем на 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот от описанного



здесь переменного домена HC (например, полноразмерного или его каркасных участков или CDR).

Белок, связывающий калликреин плазмы, может представлять собой выделенное антитело (например, очищенное, по меньшей мере, от 70, 80, 90, 95 или 99% других белков). В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, или его композиция, отделены от фрагментов, образовавшихся в результате расщепления антитела (например, DX-2930), которые являются неактивными или частично активными (например, связывающими калликреина плазмы с Ki, составляющей примерно 5000 нМ или больше) по сравнению с антителом, связывающим калликреин плазмы. Так, например, антитело, связывающее калликреин плазмы, очищено, по меньшей мере, от 70% таких фрагментов, образовавшихся в результате расщепления антитела; в других вариантах осуществления связывающее антитело очищено, по меньшей мере, от 80%, по меньшей мере, 90%, по меньшей мере, 95%, по меньшей мере, 99% или даже 100% фрагментов, образовавшихся в результате расщепления антитела, которые являются неактивными или частично активными.

Антитело, связывающее калликреин плазмы, может дополнительно ингибировать калликреин плазмы, например, человеческий плазматический калликреин.

В некоторых вариантах осуществления антитело, связывающее калликреин плазмы, не связывает прекалликреин (например, человеческий прекалликреин и/или мышинный прекалликреин), но связывает активную форму плазматического калликреина (например, человеческого плазматического калликреина и/или мышинового калликреина).

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с активным участком, или находящимся рядом с ним участком каталитического домена калликреина плазмы, или с его фрагментом, или оно связывается с эпитопом, который перекрывается с активным участком калликреина плазмы.

В некоторых аспектах антитело связывается с тем же эпитопом, что и описанное здесь антитело, или конкурирует с ним за связывание.

Антитело может связываться с калликреином плазмы, например, с человеческим плазматическим калликреином, со сродством, составляющим, 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 человеческим плазматическим калликреином с  $K_{off}$  ниже, чем  $1 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$   $s^{-1}$  или  $1 \times 10^{-4}$   $s^{-1}$ . В одном из вариантов осуществления антитело связывается с человеческим плазматическим калликреином  $K_{on}$ , превышающим  $1 \times 10^2$ ,  $1 \times 10^3$  или  $5 \times 10^3$   $M^{-1}s^{-1}$ . В одном варианте осуществления изобретения антитело связывается с плазматическим калликреином, но не связывается с тканевым калликреином и/или плазматическим прекалликреином (например, антитело связывается с тканевым калликреином и/или плазматическим прекалликреином менее эффективно (например, в 5, 10, 50, 100 или 1000 раз менее эффективно, или вообще не связывается, например, по сравнению с отрицательным контролем), по сравнению с калликреином плазмы).

В одном из вариантов осуществления антитело ингибирует активность человеческого плазматического калликреина, например, с  $K_i$  менее  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  и  $10^{-10}$   $M$ .  $IC_{50}$  антитела может составлять, например, 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, образующегося из фактора XII) и/или брадикинина (например, образующегося из высокомолекулярного кининогена (HMWK)). Антитело может ингибировать активность калликреина плазмы, и/или продукцию фактора XIIa (например, образующегося из фактора XII) и/или брадикинина (например, образующегося из высокомолекулярного кининогена (HMWK)). Сродство антитела к человеческому плазматическому калликреину может характеризоваться  $K_D$  менее 100 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 1 нМ, менее 0,5 нМ. В одном варианте осуществления антитело ингибирует плазматический калликреин, но не ингибирует тканевый калликреин (например, антитело менее эффективно ингибирует тканевый калликреин (например, в 5, 10, 50, 100 или 1000 раз менее эффективно, или вообще не ингибирует, например, по сравнению с отрицательным контролем), по сравнению с калликреином 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.

Последовательности переменных доменов HC и LC антител, связывающих калликреин плазмы, могут входить в состав одного полипептида (например, ScFv), или разных полипептидов (например, IgG или Fab).

В одном варианте осуществления последовательности переменных доменов HC и LC являются компонентами одной полипептидной цепи. В другом варианте осуществления последовательности переменных доменов HC и LC являются компонентами разных полипептидных цепей. Например, антитело представляет собой IgG, такой как IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Антитело может представлять собой растворимый Fab. В других вариантах осуществления антитело включает в себя Fab2', ScFv, минитело, гибрид ScFv::Fc, гибрид Fab::HSA, гибрид HSA::Fab, гибрид Fab::HSA::Fab или другие молекулы, которые содержат антиген-связывающий участок одного из связывающих белков настоящего изобретения. Участки VH и VL указанных Fab могут находиться в виде IgG, Fab, Fab2, Fab2', ScFv, пегилированного Fab, пегилированного ScFv, пегилированного Fab2, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA+VH::CH1, HSA::LC+VH::CH1, или другой подходящей конструкции.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой человеческое или гуманизированное антитело, или является неиммуногенным в организме человека. Например, антитело может содержать один или несколько человеческих каркасных участков антитела, например, все каркасные участки могут быть человеческими, или каркасные участки, по меньшей мере, на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичные человеческим каркасным участкам. В одном варианте осуществления антитело содержит человеческий домен Fc, или домен Fc, который, по меньшей мере, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен человеческому домену Fc.

В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело примата или приматизированное антитело, или является

неиммуногенным в организме человека. Например, антитело содержит один или несколько каркасных участков антитела примата, например, все каркасные участки примата, или каркасные участки, по меньшей мере, на 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% идентичные каркасным участкам примата. В одном варианте осуществления антитело содержит домен Fc примата, или домен Fc, который, по меньшей мере, на 95, 96, 97, 98 или 99% идентичен домену Fc примата. Термин "примат" включает в себя людей (*Homo Sapiens*), шимпанзе (*Pan troglodytes* и *Pan paniscus* (бонобо)), горилл (*Gorilla gorilla*), гиббонов, обезьян, лемурув, айе-айе (*Daubentonia madagascariensis*) и долгопятов.

В некоторых вариантах осуществления сродство антитела примата к человеческому плазматическому калликреину характеризуется значением  $K_D$  менее 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0,5 нМ, например, менее 10 нМ, менее 1 нМ, или менее 0,5 нМ.

В некоторых вариантах осуществления антитело не содержит мышинных или кроличьих последовательностей (например, оно не является мышинным или кроличьим антителом).

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

В одном примере функциональный вариант DX-2930 содержит такие же гипервариабельные участки (CDR), как и DX-2930. В другом примере функциональные варианты DX-2930 могут содержать одну или несколько мутаций (таких как консервативные замены) в FR  $V_H$  или  $V_L$  по сравнению с FR  $V_H$  и  $V_L$  DX-2930. Предпочтительно такие мутации не затрагивают остатки, предположительно взаимодействующие с одним или несколькими CDR, которые можно определить с помощью рутинных методов. В других вариантах осуществления описанные здесь функциональные варианты содержат одну или несколько (например, 1, 2 или 3) мутаций в одном или нескольких участках CDR DX-2930. Предпочтительно такие функциональные варианты сохраняют участки/остатки, отвечающие за

связывание антигена, присутствующие в исходной последовательности. В других вариантах осуществления функциональный вариант DX-2930 может содержать цепь  $V_H$ , аминокислотная последовательность которой, по меньшей мере, на 85% (например, на 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности  $V_H$  DX-2930, и/или цепь  $V_L$ , аминокислотная последовательность которой, по меньшей мере, на 85% (например, на 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентична последовательности  $V_L$  DX-2930. Указанные варианты способны связываться с активной формой калликреина плазмы и предпочтительно не связываются с прекалликреином.

"Процент идентичности" двух аминокислотных последовательностей определяют с помощью алгоритма Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, 1990, модифицированного, как описано в Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм входит в состав программ NBLAST и XBLAST (версия 2.0), Altschul, *et al. J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990. Поиск белков в BLAST можно проводить с помощью программы XBLAST, оценка=50, длина слова=3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам представляющих интерес белков. Если среди двух последовательностей существуют пробелы, можно использовать Gapped BLAST, описанный в Altschul *et al., Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997. При выполнении программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

#### **Получение антител**

Описанные здесь антитела, способные связывать PKa1, можно получить с помощью любого способа, известного в данной области. См., например, Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к целевому антигену (такому как человеческий PKa1 или его каталитический домен), можно получить с помощью традиционного гибридного метода. Полноразмерный целевой антиген, или его фрагмент, необязательно связанный с белком-носителем, таким как

КЛН, можно использовать для иммунизации животного-хозяина с целью получения антител, способных связываться с указанным антигеном. Способ и схема иммунизации животного-хозяина, как правило, соответствуют широко известным и общепринятым методам стимуляции и продукции антител, как описано ниже. Общие способы получения мышинных, гуманизированных и человеческих антител известны в данной области техники и описаны в настоящем документе. Предполагается, что любое млекопитающее, включающее в себя человека, или полученные из него антитело-продуцирующие клетки, можно использовать в качестве основы для получения гибридных клеточных линий млекопитающих, в том числе человеческих. Как правило, животному-хозяину внутрибрюшинно, внутримышечно, перорально, подкожно, интраплантарно и/или внутривожно вводят определенное количество иммуногена, в том числе, как описано в настоящем документе.

Гибридомы можно получить из лимфоцитов и иммортализованных клеток миеломы с помощью общего метода гибридизации соматических клеток, описанного Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497, или его модификации, описанной Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982). Для гибридизации можно использовать имеющиеся в продаже миеломные линии, включающие в себя, без ограничения, Х63-Аg8.653, а также линии, которые можно получить из Института Солка, Центр распределения клеток, Сан-Диего, Калифорния, США. Как правило, указанный метод включает в себя гибридизацию клеток миеломы и лимфоидных клеток с использованием, например, вещества, способствующего слиянию клеток, такого как полиэтиленгликоль, или с использованием электрических средств, хорошо известных специалистам в данной области техники. После слияния клетки отделяют от среды, используемой для гибридизации, и выращивают в среде для селективного роста, такой как среда, содержащая гипоксантин-аминоптерин-тимидин (НАТ), чтобы удалить негибридизированные исходные клетки. Для культивирования гибридом, которые секретируют моноклональные антитела, можно использовать любую из сред, описанных в данном документе, содержащих, или не содержащих сыворотку. В качестве альтернативы методу

гибридизации клеток для получения описанных здесь моноклональных антител против PKa1 можно использовать EBV-иммортиализованные В-клетки. Гибридомы размножают и, если это необходимо, подвергают субклонированию, после чего супернатанты анализируют на активность против иммуногена с помощью традиционных методов иммуноанализа (таких как радиоиммуноанализ, ферментный иммуноанализ или флуоресцентный иммуноанализ).

Гибридомы, которые можно использовать в качестве источника антител, включают в себя все варианты, дочерние клетки исходных гибридом, которые продуцируют моноклональные антитела, способные препятствовать активности PKa1. Гибридомы, которые продуцируют такие антитела, можно выращивать *in vitro* или *in vivo* с помощью известных методов. Моноклональные антитела, если это необходимо, можно выделить из культуральной среды или из жидкостей организма, с помощью обычных методов очистки иммуноглобулинов, таких как осаждение сульфатом аммония, гель-электрофорез, диализ, хроматография и ультрафильтрация. Нежелательную активность, если она присутствует, можно удалить, например, путем пропускания препарата над адсорбентами, содержащими иммуноген, присоединенный к твердой фазе, с последующим элюированием или отделением целевых антител от иммуногена. В результате иммунизации животного-хозяина целевым антигеном, или фрагментом, содержащим целевую аминокислотную последовательность, конъюгированную с белком, который является иммуногенным для видов, подлежащих иммунизации, таким как гемоцианин лимфы улитки, сывороточный альбумин, бычий тироглобулин или ингибитор соевого трипсина, с использованием бифункционального или дериватизирующего средства, такого как сложный эфир малеимидобензоилсульфосукцинимид (присоединение через остатки цистеина), N-гидроксисукцинимид (через остатки лизина), глутаровый альдегид, янтарный ангидрид, SOCl<sub>2</sub> или R<sub>1</sub>N=C=NR, где R и R<sub>1</sub> обозначают разные алкильные группы, получают популяцию антител (например, моноклональных антител).

При необходимости представляющие интерес (например, продуцируемые гибридомой) антитела (моноклональные или поликлональные) можно секвенировать и затем полинуклеотидную

последовательность можно клонировать в векторе, обеспечивающем экспрессию или размножение. Последовательность, кодирующую представляющее интерес антитело, можно сохранить в векторе, введенном в клетку-хозяина, после чего клетку-хозяина можно размножить и заморозить для дальнейшего использования. Альтернативно полинуклеотидную последовательность можно подвергнуть генетическим манипуляциям, чтобы получить "гуманизированное" антитело или улучшить сродство (аффинное созревание) или другие характеристики антитела. Например, можно сконструировать константный участок, более похожий на константный участок человека, чтобы избежать иммунного ответа, если антитело используют для клинических испытаний и лечения людей. Иногда желательно подвергнуть последовательность антитела генетическим манипуляциям, чтобы достичь более высокого сродства к целевому антигену и более высокой эффективности ингибирования активности PKa1. Для специалиста в данной области очевидно, что можно осуществить одно или несколько изменений в полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, и при этом сохранить специфичность антитела в отношении целевого антигена.

В других вариантах осуществления полностью человеческие антитела можно получить с использованием коммерчески доступных рекомбинантных мышей, которые экспрессируют специфические человеческие иммуноглобулиновые белки. Для получения гуманизированных или человеческих антител также можно использовать трансгенных животных, предназначенных для достижения более желательного (например, для продукции полностью человеческих антител) или более интенсивного иммунного ответа. Примеры таких животных включают в себя 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.). В альтернативном варианте антитела можно получить рекомбинантным способом с использованием технологии фаговых дисплеев или дрожжевой технологии. См., например, патенты США № 5565332; 5580717; 5733743; и 6265150; и Winter et al., (1994) Annu. Rev. Immunol. 12:433-455. Альтернативно технологию фаговых дисплеев (McCafferty et al., (1990) Nature



348:552-553) можно использовать для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* с использованием репертуаров генов переменных (V) доменов, полученных от неиммунизированных доноров.

Антиген-связывающие фрагменты интактного антитела (полноразмерного антитела) можно получить с помощью традиционных методов. Например, фрагменты  $F(ab')_2$  можно получить путем расщепления молекулы антитела пепсином, а фрагменты Fab можно получить путем восстановления дисульфидных мостиков фрагментов  $F(ab')_2$ .

Рекомбинантные антитела, такие как гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела и биспецифические антитела, можно получить с помощью, например, обычной рекомбинантной технологии. В одном примере ДНК, кодирующую моноклональные антитела, специфичные к целевому антигену, можно легко выделить и секвенировать с помощью традиционных методов (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи моноклональных антител). В качестве источника такой ДНК предпочтительно используют гибридомные клетки. После выделения ДНК можно поместить в один или несколько векторов экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые изначально не продуцируют иммуноглобулиновые белки, с достижением синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. См., например, публикацию PCT WO 87/04462. Затем ДНК можно модифицировать, например, путем введения последовательности, кодирующей человеческие константные домены тяжелой и легкой цепей, вместо гомологичной мышиной последовательности, Morrison et al., (1984) Proc. Nat. Acad. Sci. 81:6851, или путем ковалентного присоединения к последовательности, кодирующей иммуноглобулин, полноразмерной последовательности, кодирующей отличный от иммуноглобулина полипептид, или ее фрагмента. С помощью такого способа можно получить рекомбинантные антитела, такие как

"химерные" или "гибридные" антитела, способные специфически связываться с целевым антигеном.

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

Способы конструирования гуманизованных антител также хорошо известны в данной области техники. См., например, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10033 (1989). В одном примере переменные участки VH и VL исходного нечеловеческого антитела подвергают анализу путем трехмерного молекулярного моделирования с помощью известных в данной области методов. Затем, используя тот же метод молекулярного моделирования, идентифицируют аминокислотные остатки каркасного участка, которые по теоретическим оценкам играют важную роль в формировании правильных структур CDR. Одновременно в любой базе данных генов антител идентифицируют цепи человеческих VH и VL, аминокислотные последовательности которых гомологичны последовательности исходного нечеловеческого антитела, используя исходные последовательности VH и VL для поисковых запросов. Затем выбирают гены акцепторных человеческих VH и VL.

Участки CDR в выбранных человеческих акцепторных генах можно заменить на участки CDR исходного нечеловеческого антитела, или его функциональных вариантов. При необходимости остатки каркасных участков исходной цепи, по теоретическим оценкам участвующие во взаимодействии с участками CDR (см. выше описание), можно использовать для замены соответствующих остатков в акцепторных человеческих генах.

Одноцепочечное антитело можно получить с помощью рекомбинантных методов путем соединения нуклеотидной последовательности, кодирующей переменный участок тяжелой цепи, с нуклеотидной последовательностью, кодирующей переменный участок легкой цепи. Предпочтительно между двумя переменными участками встраивают гибкий линкер. Альтернативно способы получения одноцепочечных антител (описанные в патентах США №№ 4946778 и 4704692) можно адаптировать для получения

фаговой или дрожжевой библиотеки ScFv и затем с помощью традиционных методов из библиотеки можно выбрать клоны ScFv, специфичные к PKal. Положительные клоны можно подвергнуть дальнейшему скринингу, чтобы идентифицировать клоны, которые ингибируют активность PKal.

Антитела, полученные с помощью способа, известного в данной области и описанного в настоящем документе, можно охарактеризовать с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Например, один из таких методов включает в себя идентификацию эпитопа, с которым связывается антиген, или "эпитопное картирование". В данной области известно много методов картирования и характеристики местоположения эпитопов на белках, включающих в себя определение кристаллической структуры комплекса антитело-антиген, конкурентные анализы, анализы экспрессии фрагментов гена, и анализы с использованием синтетических пептидов, описанные, например, в главе 11 Harlow and Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. В другом примере эпитопное картирование можно использовать для определения последовательности, с которой связывается антитело. Эпитоп может представлять собой линейный эпитоп, т.е., состоящий из одной цепи аминокислот, или конформационный эпитоп, образованный в результате трехмерного взаимодействия аминокислот, которые не обязательно находятся в одной цепи (линейной последовательности первичной структуры). Можно выделить или синтезировать (например, рекомбинантным способом) пептиды разной длины (например, содержащие, по меньшей мере, 4-6 аминокислот в длину) и использовать их для анализов связывания с антителом. В другом примере эпитоп, с которым связывается антитело, можно определить путем систематического скрининга с использованием перекрывающихся пептидов, полученных из последовательности целевого антигена, и определения их связывания с антителом. В анализах экспрессии фрагментов гена открытую рамку считывания, кодирующую целевой антиген, делят на фрагменты либо случайным образом, либо в соответствии с конкретными генными конструкциями, и определяют способность

экспрессированных фрагментов антигена взаимодействовать с тестируемым антителом. Фрагменты гена можно получить, например, методом ПЦР, затем их можно транскрибировать и транслировать в белок *in vitro* в присутствии радиоактивных аминокислот. Затем определяют связывание антитела с радиоактивно мечеными фрагментами антигена, используя методы иммунопреципитации и гель-электрофореза. Некоторые эпитопы также можно идентифицировать с использованием больших библиотек случайных пептидных последовательностей, презентированных на поверхности фаговых частиц (фаговые библиотеки). Альтернативно определенную библиотеку перекрывающихся пептидных фрагментов можно тестировать на связывание с тестируемым антителом с помощью простых анализов связывания. В другом примере идентификацию остатков, требуемых, достаточных и/или необходимых для связывания эпитопа, можно осуществить с использованием мутагенеза антиген-связывающего домена, экспериментов с перестановкой доменов и аланин-сканирующего мутагенеза. Например, эксперименты с перестановкой доменов можно проводить с использованием мутантной формы целевого антигена, в которой разные фрагменты полипептида PKa1 заменены (перестановлены с) последовательностями из близкородственного, но антигенно отличного белка (такого как другой член семейства белков-нейротрофинов). Путем оценки связывания антитела с мутантным PKa1 (например, с мутантами, описанными ниже в примере 2), можно определить значение конкретного фрагмента антигена для связывания антитела.

Альтернативно можно провести конкурентные анализы с использованием других антител, заведомо способных связываться с тем же антигеном, чтобы определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и другие антитела. Конкурентные анализы хорошо известны специалистам в данной области.

Любой из подходящих методов, известных в данной области, таких как методы эпитопного картирования, описанные в настоящем документе, можно использовать для того, чтобы определить, связывается ли антитело против PKa1 с одним или несколькими из описанных здесь конкретных остатков/сегментов PKa1. Кроме того,

способность антитела взаимодействовать с одним или несколькими из указанных определенных остатков PKa1 можно оценить с помощью рутинных методов. Например, с помощью способа, описанного ниже в примере 1, можно определить кристаллическую структуру и, соответственно, расстояния между остатками PKa1 и одним или несколькими остатками антитела. Указанные расстояния могут свидетельствовать о наличии или отсутствии взаимодействия конкретного остатка PKa1 с одним или несколькими остатками антитела. Кроме того, с помощью подходящих способов, таких как конкурентные анализы и направленный мутагенез, можно определить специфичность связывания антитела-кандидата против PKa1 в отношении PKa1 по сравнению с другой мишенью, такой как мутантный PKa1.

Альтернативно антитела против PKa1 можно выделить из библиотеки антител, такой как библиотека дисплеев с помощью способов, известных в данной области.

После идентификации антитела против PKa1 с помощью любого известного в данной области способа и подтверждения того, что данное антитело можно использовать в описанном здесь способе лечения, такое антитело можно продуцировать, используя стандартные рекомбинантные методы.

Обычно нуклеотидную последовательность, кодирующую белок, клонируют в векторе, обеспечивающем экспрессию нуклеиновой кислоты. Само собой разумеется, если белок содержит несколько полипептидных цепей, эти цепи можно клонировать в одном векторе, или в разных векторах, которые могут экспрессироваться в одной клетке, или в разных клетках.

Некоторые антитела, например, Fab, можно продуцировать в бактериальных клетках, таких как клетки *E.coli* (см., например, Nadkarni, A. et al., 2007 *Protein Expr Purif* 52(1):219-29). Например, если Fab кодируется последовательностями, входящими в состав вектора фагового дисплея, который содержит подавляемый стоп-кодон между объектом дисплея и белком бактериофага (или его фрагментом), векторную нуклеиновую кислоту можно трансфицировать в бактериальную клетку, которая не может подавлять стоп-кодон. В данном случае Fab не гибридизуется с белком гена III и

секретируется в периплазму и/или среду.

Антитела также могут продуцироваться в эукариотических клетках. В одном варианте осуществления антитела (например, ScFv-х) экспрессируются в дрожжевой клетке, такой как *Pichia* (см., например, Powers et al., 2001, *J. Immunol. Methods.* 251:123-35; Schoonooghe S. et al., 2009 *BMC Biotechnol.* 9:70; Abdel-Salam, HA. et al., 2001 *Appl Microbiol Biotechnol* 56(1-2):157-64; Takahashi K. et al., 2000 *Biosci Biotechnol Biochem* 64(10):2138-44; Edqvist, J. et al., 1991 *J Biotechnol* 20(3):291-300), *Hansenula* или *Saccharomyces*. Специалист в данной области может оптимизировать продукцию антитела в дрожжах путем оптимизации, например, содержания кислорода (см., например, Baumann K., et al. 2010 *BMC Syst. Biol.* 4:141), осмолярности (см., например, Dragosits, M. et al., 2010 *BMC Genomics* 11:207), температуры (см., например, Dragosits, M. et al., 2009 *J Proteome Res.* 8(3):1380-92), условий ферментации (см., например, Ning, D. et al. 2005 *J. Biochem. and Mol. Biol.* 38(3): 294-299), штамма дрожжей (см., например, Kozyr, AV et al. 2004 *Mol Biol (Mosk)* 38(6):1067-75; Horwitz, AH. et al., 1988 *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(22):8678-82; Bowdish, K. et al. 1991 *J Biol Chem* 266(18):11901-8), избыточной экспрессии белков с целью увеличения продукции антитела (см., например, Gasser, V. 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), концентрации субстратов и/или ионов (см., например, Ко JH. et al., 1996 *Appl Biochem Biotechnol* 60(1):41-8). Кроме того, дрожжевые системы можно использовать для получения антител с более длительным периодом полужизни (см., например, Smith, BJ. et al. 2001 *Bioconjug Chem* 12(5):750-756).

В одном предпочтительном варианте осуществления антитела получают в клетках млекопитающих. Клетки-хозяева млекопитающих, предпочтительно используемые для экспрессии клона антител или их антиген-связывающих фрагментов, включают в себя клетки яичника китайского хомячка (клетки CHO) (в том числе клетки CHO dhfr-, описанные в Urlaub and Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

77:4216-4220, используемые с селектируемым маркером DHFR, например, как описано в Kaufman and Sharp, 1982, Mol. Biol. 159:601-621), лимфоцитарные клеточные линии, например, клетки миеломы NS0 и клетки SP2, клетки COS, клетки HEK293T (J. Immunol. Methods (2004) **289**(1-2):65-80) и клетки трансгенного животного, например, трансгенного млекопитающего. Например, клетка представляет собой клетку эпителия молочной железы.

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

Помимо нуклеотидной последовательности, кодирующей диверсифицированный домен иммуноглобулина, рекомбинантные векторы экспрессии могут содержать другие последовательности, такие как последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, точки начала репликации), и селектируемые маркерные гены. Селектируемый маркерный ген облегчает отбор клеток-хозяев, содержащих вектор (см., например, патенты США №№ 4399216, 4634665 и 5179017). Например, селектируемый маркерный ген, как правило, придает клетке-хозяину, в которую введен вектор, устойчивость к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицину или метотрексату. Предпочтительные селектируемые маркерные гены включают в себя ген дигидрофолатредуктазы (DHFR) (для отбора/амплификации клеток-хозяев *dhfr*<sup>-</sup> в присутствии метотрексата) и ген *neo* (для отбора по G418).

В типичной системе рекомбинантной экспрессии антитела или его антиген-связывающего фрагмента рекомбинантный вектор экспрессии, кодирующий как тяжелую цепь антитела, так и легкую цепь антитела, вводят в клетки CHO *dhfr*<sup>-</sup> путем трансфекции, опосредованной фосфатом кальция. В рекомбинантном векторе экспрессии, каждый из генов тяжелой и легкой цепей антитела функционально связан с энхансерными/промоторными регуляторными элементами (например, полученными из SV40, CMV, аденовируса и т.п., такими как регуляторный элемент энхансер CMV/промотор AdMLP или регуляторный элемент энхансер SV40/промотор AdMLP),

обеспечивающими высокие уровни транскрипции генов. Рекомбинантный вектор экспрессии также несет ген DHFR, который позволяет проводить отбор клеток CHO, трансфицированных вектором, путем отбора/амплификации в присутствии метотрексата. Выбранные трансформированные клетки-хозяева культивируют, обеспечивая экспрессию тяжелой и легкой цепей антитела, после чего из культуральной среды выделяют интактное антитело. Для получения рекомбинантного вектора экспрессии, трансфекции клеток-хозяев, отбора трансформантов, культивирования клеток-хозяев и извлечения антитела из культуральной среды используют стандартные методы молекулярной биологии. Например, некоторые антитела можно выделить методом аффинной хроматографии с использованием носителя, конъюгированного с белком А или белком G.

Если антитела содержат домен Fc, система продукции антитела может вырабатывать антитела, в которых участок Fc является гликозилированным. Например, домен Fc молекул IgG может быть гликозилированным по аспарагину 297 в домене CH2. Этот аспарагин является участком для модификации олигосахаридами двухантенарного типа. Показано, что данное гликозилирование необходимо для осуществления эффекторных функций, опосредованных рецепторами Fcγ и компонентом C1q (Burton and Woof, 1992, *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jefferis et al., 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76). В одном варианте осуществления домен Fc продуцируется в системе экспрессии млекопитающих, которая обеспечивает надлежащее гликозилирование остатка, соответствующего аспарагину 297. Домен Fc также может содержать другие эукариотические пост-трансляционные модификации.

Антитела также могут продуцироваться трансгенным животным. Например, в патенте США № 5849992 описан способ экспрессии антитела в молочной железе трансгенного млекопитающего. Конструируют трансген, который содержит молоко-специфичный промотор и нуклеиновые кислоты, кодирующие представляющее интерес антитело и сигнальную последовательность, обеспечивающую секрецию. Молоко, вырабатываемое самками таких трансгенных млекопитающих, содержит секретлируемое в него представляющее



интерес антитело. Антитело можно выделить из молока, или, в некоторых способах применения, можно использовать непосредственно молоко.

#### **Фармацевтические композиции**

Одно или несколько из описанных здесь антител могут входить в состав композиции, например, фармацевтически приемлемой композиции или фармацевтической композиции. Антитело, связывающее калликреин плазмы, может ввести в состав композиции вместе с фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления композиция, например, фармацевтически приемлемая композиция или фармацевтическая композиция, может содержать от 100 мг до 300 мг описанного здесь антитела (например, DX-2930 в дозе 100 мг или 300 мг), необязательно, вместе с фармацевтически приемлемым носителем.

Фармацевтически приемлемый носитель включает в себя любые и все физиологически совместимые растворители, диспергирующие среды, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства, средства, замедляющие абсорбцию и т.п. Предпочтительно выбирают носитель, подходящий для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинномозгового или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии), хотя можно использовать и носители, подходящие для ингаляции и интраназального введения.

Фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль, которая сохраняет желательную биологическую активность соединения, не оказывая при этом никаких нежелательных токсических эффектов (см., например, Berge, S.M., et al., 1977, J. Pharm. Sci. 66:1-19). Примеры таких солей включают в себя кислотно-аддитивные соли и основно-аддитивные соли. Кислотно-аддитивные соли включают в себя соли, образованные нетоксичными неорганическими кислотами, такими как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромистоводородная, иодистоводородная, фосфористая кислота и т.п., а также нетоксичными органическими кислотами, такими как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенил-замещенные алкановые кислоты, гидроксильные алкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и

ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Основно-аддитивные соли включают в себя соли, образованные щелочноземельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и тому подобное, а также нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Композиции могут находиться в виде разных форм. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Форма может зависеть от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Многие композиции представляют собой растворы для инъекций или инфузий, такие как композиции, подобные используемым для введения антител человеку. Типичным способом введения является парентеральный способ (включающий в себя внутривенное, подкожное, внутрибрюшинное, внутримышечное введение). В одном варианте осуществления белок, связывающий калликреин плазмы, вводят путем внутривенной инфузии или инъекции. В другом предпочтительном варианте осуществления белок, связывающий калликреин плазмы, вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции. В следующем предпочтительном варианте осуществления белок, связывающий калликреин плазмы, вводят путем внутрибрюшинной инъекции.

Фразы "парентеральное введение" и "вводить парентерально", используемые в данном описании для обозначения способов введения, отличных от кишечного и местного введения, как правило, осуществляемых путем инъекции, включают в себя, без ограничения, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, интракапсулярные, интраорбитальные, внутрисердечные, внутрикожные, внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, подэпидермисные, внутрисуставные, подкапсульные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и внутригрудные инъекции и инфузии.

Композиция может находиться в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, которая

может содержать высокую концентрацию лекарственного средства. Стерильные растворы для инъекций можно получить путем введения связывающего белка в требуемом количестве в подходящий растворитель, наряду с одним или несколькими из перечисленных выше ингредиентов, в зависимости от необходимости, с последующей стерилизацией фильтрованием. Дисперсии обычно получают путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную диспергирующую среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. Предпочтительные способы получения стерильных порошков, предназначенных для приготовления стерильных растворов для инъекций, включают в себя вакуумную сушку и сушку из замороженного состояния, которые позволяют получать порошок, содержащий активный ингредиент и любые другие желательные ингредиенты, входящие в состав стерилизованного фильтрацией раствора. Надлежащую текучесть раствора можно достичь, например, путем применения покрытия, такого как лецитин, поддержания нужного размера частиц в дисперсии и использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированную абсорбцию композиций для инъекций можно достичь путем включения в композицию средства, замедляющего абсорбцию, такого как соль моностеарат и желатин.

Антитело, связывающее калликреин плазмы, можно вводить разными способами, включающими в себя внутривенную инъекцию или инфузию. Например, при некоторых терапевтических применениях белок, связывающий калликреин плазмы, можно вводить путем внутривенной инфузии со скоростью менее 30, 20, 10, 5 или 1 мг/мин с достижением дозы примерно от 1 до 100 мг/м<sup>2</sup> или от 7 до 25 мг/м<sup>2</sup>. Способ и/или режим введения варьирует в зависимости от желаемых результатов. В некоторых вариантах осуществления активное соединение можно объединить с носителем, который может защищать соединение от быстрого высвобождения, с получением, например, композиции с контролируемым высвобождением, включающей в себя имплантаты и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота.

Разработано много способов получения таких композиций. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

Фармацевтические композиции можно вводить с помощью медицинских устройств. Например, в одном варианте осуществления описанную здесь фармацевтическую композицию можно вводить с помощью такого устройства, как безыгольное устройство для подкожных инъекций, насос или имплантат.

В некоторых вариантах осуществления, белок, связывающий калликреин плазмы, может входить в состав композиции, обеспечивающей надлежащее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие высоко гидрофильные соединения. Чтобы гарантировать проникновение описанных здесь терапевтических соединений через ГЭБ (если это необходимо), их можно заключить, например, в липосомы. Способы промышленного получения липосом описаны, например, в патентах США №№ 4522811; 5374548; и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, обеспечивающих избирательную транспортировку в конкретные клетки или органы, повышая таким образом направленность доставки лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, 1989, J. Clin. Pharmacol. 29:685).

Схемы приема лекарственных средств можно корректировать с целью достижения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, лекарственное средство можно вводить в виде одного болюса или нескольких разделенных доз в течение длительного времени, или дозу лекарственного средства можно пропорционально уменьшить или увеличить, в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно парентеральные композиции получают в виде единичной дозированной формы, обеспечивающей простоту введения и однородность дозирования. Термин "единичная дозированная форма" в данном описании относится к физически дискретным единицам, которые можно использовать в качестве однократных доз для введения индивидуумам, подлежащим лечению; причем каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для

получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем. Параметры единичных дозированных форм могут обуславливаться и непосредственно зависеть от (а) индивидуальных характеристик активного соединения и конкретного терапевтического эффекта, который нужно достичь, и (b) ограничений, существующих в области получения композиций на основе такого активного соединения, в отношении лечения чувствительности у индивидуумов.

Иллюстративный, не ограничивающий диапазон терапевтически или профилактически эффективного количества описанного здесь антитела составляет 0,1-20 мг/кг, более предпочтительно 1-10 мг/кг. Антитело против калликрейна плазмы можно вводить, например, путем внутривенной инфузии, например, со скоростью менее 30, 20, 10, 5 или 1 мг/мин с достижением дозы примерно от 1 до 100 мг/м<sup>2</sup> или примерно от 5 до 30 мг/м<sup>2</sup>. Величина дозы может варьировать в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего облегчению. Для конкретного индивидуума конкретные режимы дозирования можно корректировать с течением времени в соответствии с индивидуальной потребностью и профессиональной оценкой лица, назначающего введение композиции или наблюдающего за введением композиции.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество описанного здесь антитела (такого как DX-2930) составляет от 30 до 400 мг, от 30 до 300 мг, от 30 до 250 мг, от 30 до 200 мг, от 30 до 150 мг, от 30 до 100 мг, от 30 до 50 мг, от 50 до 400 мг, от 50 до 300 мг, от 50 до 250 мг, от 50 до 200 мг, от 50 до 150 мг, от 50 до 100 мг, от 100 до 400 мг, от 100 до 300 мг, от 100 до 250 мг, от 100 до 200 мг, от 100 до 150 мг, от 150 до 400 мг, от 150 до 300 мг, от 150 до 250 мг, от 150 до 200 мг, от 200 до 400 мг, от 200 до 300 мг, от 200 до 250 мг, от 250 до 400 мг, от 250 до 300 мг, или от 300 до 400 мг, или оно может быть равно любому целому числу, входящему в указанные диапазоны. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от 30 до 300 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или

профилактически эффективное количество составляет 300 мг или более. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 400 мг или более. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет от 100 до 300 мг (100 мг, 150 мг, 200 мг, 250 мг или 300 мг).

В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество описанного здесь антитела (например, DX-2930) составляет 30 мг, 40 мг, 50 мг, 60 мг, 70 мг, 80 мг, 90 мг, 100 мг, 110 мг, 120 мг, 130 мг, 140 мг, 150 мг, 160 мг, 170 мг, 180 мг, 190 мг, 200 мг, 210 мг, 220 мг, 230 мг, 240 мг, 250 мг, 260 мг, 270 мг, 280 мг, 290 мг, 300 мг, 310 мг, 320 мг, 330 мг, 340 мг, 350 мг, 360 мг, 370 мг, 380 мг, 390 мг или 400 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 30 мг, 100 мг или 300 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 100 мг или 300 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 100 мг. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество составляет 300 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 больше. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество вводят ежедневно, через день, каждый третий день, каждый четвертый день, каждый пятый день, каждый шестой день, каждую неделю, каждую вторую неделю, каждые три недели, каждые четыре недели, каждые пять недель, каждые шесть недель, каждые семь недель, каждые восемь недель или больше. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество, которое составляет

100 мг или 300 мг, вводят раз в две недели или раз в четыре недели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела, которое составляет 100 мг, вводят один раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела, которое составляет 300 мг, вводят один раз в две недели, или один раз в четыре недели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела, которое составляет 300 мг, вводят один раз в две недели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество антитела, которое составляет 300 мг, вводят один раз в четыре недели.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически или профилактически эффективное количество представляет собой количество, которое поддерживает концентрацию антитела в плазме или сыворотке выше, чем примерно 80 нМ (например, выше 100 нМ, выше 150 нМ или 200 нМ). В некоторых вариантах осуществления количество антитела является эффективным для поддержания концентрации антитела в плазме или сыворотке в диапазоне примерно 80-300 нМ, например, 80-100 нМ, 80-120 нМ, 80-150 нМ, 100-150 нМ, 100-200 нМ, 150-200 нМ или 200-300 нМ. Концентрацию в плазме или сыворотке можно измерить с помощью подходящего анализа, такого как анализ активности калликреина плазмы, например, описанный в настоящем документе, иммунологический анализ, например, анализ с использованием метода ELISA или вестерн-блоттинга, с помощью которого можно определять расщепленный кининоген, как описано в данном документе, или по масс-спектрометрический анализ.

Описанные здесь фармацевтические композиции могут содержать "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" описанного здесь белка, связывающего калликреин плазмы.

### **Наборы**

Одно или несколько из описанных здесь антител, связывающих калликреин плазмы, могут предоставляться в составе набора,

например, в качестве компонента набора. Например, набор может содержать (а) антитело, связывающее калликреин плазмы, например, композицию (такую как фармацевтическая композиция), которая содержит антитело, связывающее калликреин плазмы, и, необязательно, (б) информационную документацию. Информационная документация может представлять собой описательную, обучающую, маркетинговую или другую документацию, относящуюся к описанному здесь способу и/или к применению антитела, связывающего калликреин плазмы, например, в описанном здесь способе. В некоторых вариантах осуществления набор содержит одну или несколько доз антитела, связывающего калликреин плазмы, например, DX-2930. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько доз составляют 100 мг или 300 мг.

Информационная документация набора не ограничивается по форме. В одном варианте осуществления информационная документация может содержать информацию о получении соединения, молекулярной массе соединения, концентрации, дате истечения срока действия, партии или месте производства, и др. В одном варианте осуществления информационная документация относится к применению антитела для лечения, профилактики или диагностики нарушений и состояний, например, заболевания или состояния, связанного с калликреином плазмы.

В одном варианте осуществления информационная документация может содержать инструкции по введению антитела, связывающего калликреин плазмы, например, могут быть указаны подходящие для осуществления описанных здесь способов дозы, лекарственные формы, способы введения или схемы дозирования (например, дозы, лекарственные формы, схемы дозирования или способы введения, описанные в данном документе). В другом варианте осуществления информационная документация может содержать инструкции по введению антитела, связывающего калликреин плазмы, подходящему индивидууму, например, человеку, например, человеку, страдающему от заболевания или состояния, или имеющему риск заболевания или состояния, связанного с калликреином плазмы. Например, документация может содержать инструкции по введению белка, связывающего калликреин плазмы, пациенту, страдающему от



расстройства или состояния, описанного в данном документе, например, заболевания, связанного с калликреином плазмы, например, в соответствии со схемой дозирования, описанной в настоящем документе. Информационная документация наборов не ограничивается по форме. Во многих случаях информационная документация, например, инструкции, может предоставляться в печатном виде, однако она может находиться и в других форматах, таких как машиночитаемый материал.

Антитело, связывающее калликреин плазмы, может быть получено в виде любой формы, например, в виде жидкой, высушенной или лиофилизированной формы. Предпочтительно антитело, связывающее калликреин плазмы, является практически чистым и/или стерильным. Если антитело, связывающее калликреин плазмы, находится в виде жидкого раствора, жидкий раствор предпочтительно представляет собой водный раствор, более предпочтительно, стерильный водный раствор. Если антитело, связывающее калликреин плазмы, находится в виде высушенной формы, перерастворение, как правило, проводят путем добавления подходящего растворителя. Растворитель, такой как стерильная вода или буфер, может входить в состав набора.

Набор может включать в себя один или несколько контейнеров с композицией, содержащей антитело, связывающее калликреин плазмы. В некоторых вариантах осуществления набор содержит отдельные контейнеры, разделители или отсеки для композиции и информационной документации. Например, композиция может содержаться в бутылке, флаконе или шприце, а информационная документация может быть прикреплена к контейнеру. В других вариантах осуществления отдельные элементы набора содержатся в одном, неразделенном контейнере. Например, композиция содержится в бутылке, флаконе или шприце, а информационная документация прикреплена к нему в виде этикетки. В некоторых вариантах осуществления набор содержит несколько (например, упаковку) отдельных контейнеров, каждый из которых содержит одну или несколько единичных дозированных форм (например, лекарственной формы, описанной в данном документе) антитела, связывающего калликреин плазмы. Например, набор может включать в себя

несколько шприцев, ампул, пакетов из фольги, или блистерных упаковок, каждая из которых содержит однократную дозу антитела, связывающего калликреин плазмы. Контейнеры, входящие в состав набора, могут быть герметичными, водонепроницаемыми (например, непроницаемыми при изменении влажности или испарении), и/или светонепроницаемыми.

Набор необязательно содержит устройство, подходящее для введения композиции, например, шприц или любое подобное устройство для доставки. В одном варианте осуществления устройство представляет собой имплантируемое устройство, которое обеспечивает высвобождение отмеренных доз антитела. Настоящее изобретение также охватывает способ получения набора, например, путем объединения компонентов, описанных в данном документе.

### **Лечение**

В некоторых аспектах изобретение предлагает применение антител, способных связываться с активным калликреином плазмы (например, человеческим активным калликреином плазмы), для лечения НАЕ. Антитела, подходящие для применения в описанном здесь способе лечения, включают в себя DX-2930 или его функциональный вариант, описанный в данном документе, антитело, которое связывается с тем же эпитопом, что и DX-2930, или антитело, которое конкурирует с DX-2930 за связывание с человеческим активным калликреином плазмы.

#### *Наследственный ангионевротический отек*

Наследственный ангионевротический отек (PBB) также известен как "Квинке отек", дефицит ингибитора эстеразы C1, дефицит ингибитора C1 и наследственный острый ограниченный отек (HANE). НАЕ характеризуется рецидивирующими эпизодами тяжелого опухания (ангионевротический отек), которое может поражать, например, конечности, лицо, половые органы, желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути. Симптомы НАЕ включают в себя, например, опухание рук, ног, губ, глаз, языка и/или горла; блокаду дыхательных путей, которая может включать в себя отек горла и внезапную хрипоту; повторяющиеся эпизоды спастической боли в животе без видимой причины; и/или отек кишечника, который может быть тяжелым и может привести к спастическим болям в животе,

рвоте, обезвоживанию, диарее, боли и/или шоку. Примерно у одной трети индивидуумов, страдающих от НАЕ, во время приступа появляется не зудящая сыпь, называемая ревматоидная эритема.

Отек дыхательных путей может быть опасным для жизни и является причиной смерти некоторых пациентов. Процент смертности находится в диапазоне 15-33%. НАЕ является причиной примерно 15000-30000 посещений отделения неотложной помощи в год.

Травма или стресс, обусловленные стоматологическими процедурами, болезнями (например, вирусными заболеваниями, такими как простуда и грипп), менструацией и хирургическим вмешательством, могут инициировать приступ ангионевротического отека. Чтобы предотвратить острые приступы НАЕ, пациенты могут попытаться избежать воздействия конкретных стимулов, которые ранее вызывали приступы. Однако зачастую приступы возникают в отсутствие известных инициирующих факторов. Как правило, симптомы НАЕ впервые появляются в детском возрасте и усиливаются в период полового созревания. В среднем у людей, не принимающих лечение, приступы возникают раз в неделю или в 2 недели, а большинство эпизодов длятся примерно от 3 до 4 дней ([ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema](http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)). Частота и продолжительность приступов сильно варьируют среди людей с наследственным ангионевротическим отеком, даже среди людей, относящихся к одной семье.

Существуют три типа НАЕ, известных как типы I, II и III, причем все указанные типы можно лечить с помощью способов, описанных в настоящем документе. Установлено, что НАЕ поражает 1 из 50000 человек, при этом тип I встречается примерно в 85 процентах случаев, тип II встречается примерно в 15 процентах случаев, а тип III встречается крайне редко. Тип III описан совсем недавно, причем вначале считалось, что он встречается только у женщин, однако были обнаружены семьи, в которых от данного заболевания страдали мужчины.

НАЕ наследуется по аутосомно-доминантному типу, таким образом, что пораженный данным заболеванием индивидуум может наследовать мутацию от одного из пораженных родителей. В гене также могут возникать новые мутации, и, следовательно, НАЕ может

также встречаться у людей, у которых в семье отсутствуют случаи данного заболевания. По оценкам, 20–25% случаев являются результатом новой спонтанной мутации.

Мутации в гене SERPING1 вызывают наследственный ангионевротический отек типа I и типа II. Ген SERPING1 отвечает за продукцию белка-ингибитора C1, который играет важную роль в регуляции воспаления. Ингибитор C1 блокирует активность некоторых белков, которые инициируют воспаление. Мутации, которые вызывают наследственный ангионевротический отек типа I, приводят к снижению уровня ингибитора C1 в крови. И наоборот, мутации, обуславливающие тип II, приводят к продукции аномально функционирующего ингибитора C1. В отсутствии нужных уровней функционального ингибитора C1 образуются избыточные количества брадикинина. Брадикинин инициирует воспаление путем повышения истечения жидкости через стенки кровеносных сосудов в ткани организма. Избыточное накопление жидкостей в тканях организма вызывает случаи опухания у людей с наследственным ангионевротическим отеком типа I и типа II.

Мутации в гене F12 связаны с некоторыми случаями наследственного ангионевротического отека типа III. Ген F12 отвечает за продукцию фактора свертывания крови XII. Помимо того, что он играет ключевую роль в процессе свертывания (коагуляции) крови, фактор XII также является важным стимулятором воспаления и участвует в продукции брадикинина. Некоторые мутации в гене F12 обуславливают продукцию фактора XII, обладающего повышенной активностью. В результате образуется больше брадикинина и стенки кровеносных сосудов становятся более проницаемыми, что приводит к эпизодам опухания. Причины других случаев наследственных ангионевротических отеков типа III остаются неизвестными. В таких случаях за развитие заболевания могут отвечать мутации в одном или нескольких из пока неидентифицированных генов.

НАЕ может проявляться подобно другим формам ангионевротического отека, возникающим в результате аллергии или других заболеваний, но он существенно отличается по причине и способам лечения. Если наследственный ангионевротический отек

ошибочно диагностируют как аллергию, его обычно лечат антигистаминными средствами, стероидами и/или эпинефрином, которые, как правило, неэффективны при НАЕ, хотя эпинефрин можно использовать в случае угрожающих жизни реакций. Кроме того, при ошибочной диагностике иногда проводят ненужное эксплораторное хирургическое вмешательство у пациентов с вздутием живота, а у некоторых пациентов с НАЕ боли в животе неправильно диагностируют как психосоматические.

Способы лечения с использованием ингибитора C1, а также другие способы лечения НАЕ, описаны в Kaplan, A.P., *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(5):918-925.

Экстренное лечение приступов НАЕ проводят, чтобы как можно быстрее остановить развитие отека. Один из способов экстренного лечения включает в себя внутривенное ведение концентрата ингибитора C1, полученного из донорской крови; однако такое лечение не доступно во многих странах. В чрезвычайных ситуациях, если концентрат ингибитора C1 отсутствует, в качестве альтернативы можно использовать свежзамороженную плазму (FFP), так как она также содержит ингибитор C1.

Очищенный ингибитор C1, полученный из человеческой крови, используют в Европе с 1979 года. В настоящее время в США существуют несколько способов лечения с использованием ингибитора C1, а в Канаде доступны два продукта на основе ингибитора C1. *Verinert P* (CSL Behring), который представляет собой пастеризованный препарат, утвержден FDA в 2009 году для применения при острых приступах. *Cinryze* (ViroPharma), который получают путем нанофильтрации, утвержден FDA в 2008 году для профилактики. *Rhucin* (Pharming) представляет собой рекомбинантный ингибитор C1 на стадии разработки, который не несет риска передачи инфекционных заболеваний, обусловленных патогенными микроорганизмами, присутствующими в человеческой крови.

Лечение острого приступа НАЕ также может включать в себя применение лекарств для облегчения боли и/или в.в. введение жидкостей.

Другие способы лечения могут включать в себя стимуляцию

синтеза ингибитора C1 или уменьшение потребления ингибитора C1. Андрогенные препараты, такие как даназол, могут уменьшать частоту и тяжесть приступов, стимулируя продукцию ингибитора C1.

*Helicobacter pylori* может инициировать абдоминальные приступы. Антибиотики, используемые для лечения *h. Pylori*, уменьшают абдоминальные приступы.

Новые способы лечения направлены на контактный каскад. Экаллантид (KALBITOR®, DX-88, Duax), ингибирующий калликреин плазмы, разрешен для применения в США. Икатибант (Firazyr®, Shire), ингибирующий рецептор брадикинина B2, разрешен для применения в Европе и США.

Диагноз НАЕ может быть установлен, например, на основе семейной истории болезни и/или анализов крови. Лабораторные показатели, связанные 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 снижается, как и уровень C4, тогда как уровень C1q остается в норме. При НАЕ типа II уровень ингибитора C1 остается нормальным или увеличивается; однако функционирование ингибитора C1 является аномальным. Уровень C4 уменьшается, а уровень C1q остается в норме. При НАЕ типа III уровни ингибитора C1, C4 и C1q могут быть нормальными.

Симптомы НАЕ можно оценить, например, с помощью опросных листов, таких как опросные листы, которые заполняются пациентами, врачами или членами семьи. Такие опросные листы известны в данной области и включают в себя, например, визуальные аналоговые шкалы. См., например, McMillan, C.V. et al. *Patient*. 2012;5(2):113-26.

#### *Лечение НАЕ антителами против PKa1*

Настоящее изобретение предлагает способы лечения (например, уменьшения интенсивности, стабилизации или устранения одного или нескольких симптомов) наследственного ангионевротического отека (НАЕ) путем введения описанного здесь антитела (например, терапевтически эффективного количества описанного здесь антитела) индивидууму, страдающему от НАЕ, или

предрасположенному к НАЕ, например, в соответствии с описанной здесь схемой дозирования. Изобретение также предлагает способы лечения НАЕ путем введения описанного здесь антитела (например, терапевтически эффективного количества описанного здесь антитела), например, в соответствии с описанной здесь схемой дозирования, или в сочетании со вторым способом лечения, например, с другим лекарственным средством, например, описанным в данном документе. Настоящее изобретение также предлагает способы профилактики НАЕ или его симптома путем введения описанного здесь антитела (например, профилактически эффективного количества описанного здесь антитела) индивидууму, имеющему риск развития НАЕ (например, индивидууму, член семьи которого страдает от НАЕ, или имеет генетическую предрасположенность к нему), например, в соответствии с описанным здесь графиком дозирования. В некоторых примерах индивидуум может представлять собой пациента-человека, у которого отсутствуют симптомы НАЕ во время лечения.

Антитела, которые связываются с калликреином плазмы, например, как описано в настоящем документе, можно использовать в терапевтических или профилактических целях, в частности, в применении к человеку. Указанные антитела можно вводить индивидууму с целью лечения, профилактики и/или диагностики ряда заболеваний и состояний, включающих в себя например, заболевания, связанные с калликреином плазмы, или даже в клетки, находящиеся в культуре, например, *in vitro* или *ex vivo*. Например, указанные связывающие белки можно использовать для модификации эффектов калликреина плазмы, высвобождаемого из клеток, находящихся в культуре (Lilla et al., J. Biol Chem. 284(20):13792-13803 (2009)). Лечение включает в себя введение количества, эффективного для смягчения, облегчения, изменения, излечения, ослабления, улучшения или влияния на заболевание, симптомы заболевания или предрасположенность к заболеванию. Лечение может также отсрочить появление, например, предотвратить появление, или предотвратить ухудшение заболевания или состояния.

Способы введения антител, связывающих калликреин, а также

других средств описаны в разделе "Фармацевтические композиции". Подходящие дозы используемых молекул могут зависеть от возраста и массы индивидуума, а также от конкретного используемого лекарственного средства. Антитело можно использовать в качестве конкурирующего средства для ингибирования, уменьшения нежелательного взаимодействия, например, между калликреином плазмы и его субстратом (таким как фактор XII или HMWK). Доза антитела может представлять собой количество, достаточное для того, чтобы блокировать 90%, 95%, 99% или 99,9% активности калликреина плазмы у пациента, особенно в участке проявления заболевания. Для этого может потребоваться доза 0,1, 1,0, 3,0, 6,0 или 10,0 мг/кг. В случае IgG, имеющего молекулярную массу 150000 г/моль (два участка связывания), указанные дозы соответствуют примерно 18 нМ, 180 нМ, 540 нМ, 1,08 мМ, и 1,8 мМ участков связывания на объем крови 5 л.

В одном варианте осуществления антитела используют для ингибирования активности (например, для ингибирования, по меньшей мере, одной активности калликреина плазмы, например, для уменьшения продукции фактора XIIa и/или брадикинина) калликреина плазмы, например, *in vivo*. Связывающие белки можно использовать сами по себе или в сочетании с другим средством, таким как цитотоксическое средство, фермент цитотоксин или радиоизотоп.

Антитела могут быть использованы непосредственно *in vivo* для устранения антиген-экспрессирующих клеток посредством природной комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). Описанные здесь антитела могут содержать комплемент-связывающий эффекторный домен, такой как фрагмент Fc IgG1, IgG2 или IgG3, или соответствующий фрагмент IgM, который связывает комплемент. В одном варианте осуществления популяцию клеток-мишеней обрабатывают *ex vivo* описанным здесь антителом и соответствующими эффекторными клетками. Лечение можно дополнить добавлением комплемента или сыворотки, содержащей комплемент. Кроме того, фагоцитоз клеток-мишеней, покрытых описанным здесь антителом, можно повысить путем связывания белков комплемента. В



другом варианте осуществления клетки-мишени, покрытые антителом, которое содержит комплемент-связывающий эффекторный домен, лизируют комплементом.

Способы введения антител, связывающих калликреин плазмы, описаны в разделе "Фармацевтические композиции". Подходящие дозы используемых молекул зависят от возраста и массы индивидуума и конкретного используемого лекарственного средства. Антитела можно использовать в качестве конкурирующих средств для ингибирования или уменьшения нежелательного взаимодействия, например, между природным или патологическим агентом и калликреином плазмы.

Терапевтически эффективное количество описанного здесь антитела можно ввести индивидууму, страдающему от НАЕ, предрасположенному к НАЕ, или имеющему риск НАЕ, осуществляя тем самым лечение (например, облегчение или улучшение симптома или признака расстройства, замедляя, стабилизацию и/или прекращение развития заболевания) расстройства.

Описанное здесь антитело можно вводить в терапевтически эффективном количестве. Терапевтически эффективное количество антитела представляет собой количество, которое, после однократного или многократного введения дозы, является эффективным для лечения индивидуума, например, обеспечивает излечение, ослабление, облегчение или улучшение, по меньшей мере, одного симптома заболевания у индивидуума в степени, превышающей ожидаемую в отсутствии такого лечения.

Режимы введения лекарственных средств можно корректировать с целью обеспечения оптимального желаемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, лекарственное средство можно вводить в виде одного болюса или нескольких разделенных доз в течение длительного времени, или дозу лекарственного средства можно пропорционально уменьшить или увеличить, в зависимости от остроты терапевтической ситуации. Особенно предпочтительно парентеральные композиции получают в виде единичной дозированной формы, обеспечивающей простоту введения и однородность дозирования. Термин "единичная дозированная форма" в данном описании относится к физически дискретным единицам, которые

можно использовать в качестве однократных доз для введения индивидуумам, подлежащим лечению; причем каждая единица содержит заданное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта, в сочетании с подходящим фармацевтическим носителем.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело (например, DX-2930) вводят в виде однократной дозы, например, в количестве от 0,1 до 3 мг/кг. В других вариантах осуществления антитело вводят в виде нескольких доз, например, один раз каждые 1-4 недели, например, раз в две недели или раз в месяц (например, каждые 28 дней). Каждая из нескольких доз может находиться в диапазоне от 0,1 до 3 мг/кг. В некоторых случаях пациент может получать несколько доз один раз каждые 1-4 недели, например, один раз в две недели или один раз в месяц, в течение подходящего периода времени, после чего введение осуществляют один раз или два раза в месяц в качестве поддерживающей терапии в той же или более низкой дозе.

В некоторых вариантах осуществления пациент может регистрировать побочные эффекты (такие как повышение уровня креатинфосфатазы) и/или ингибирование уровней pKal антителом (например, концентрацию антитела в сыворотке или плазме, или уровень активности pKal) до и после лечения, или на протяжении курса лечения. Если наблюдается неблагоприятный эффект, можно уменьшить дозу антитела или прекратить лечение. Если уровень ингибирования ниже минимального терапевтического уровня, пациенту можно ввести дополнительные дозы антитела.

В некоторых вариантах осуществления для оценки эффективности в процессе лечения (например, после введения первоначальной дозы) измеряют концентрацию антитела (например, DX-2930) в плазме или сыворотке. Если в плазме или сыворотке концентрация антитела составляет менее чем примерно 80 нМ, может потребоваться введение следующей дозы, которая может быть такой же, как первоначальная доза, или выше ее. Концентрацию антитела в плазме или сыворотке можно измерить путем определения белкового уровня антитела в образце сыворотки или плазмы, полученном от индивидуума, например, с помощью иммунного анализа

или МС анализа. Концентрацию антитела в плазме или сыворотке также можно измерить путем определения ингибиторного уровня рКa1 в образце сыворотки или плазмы, полученном от индивидуума, получающего антитело. Такие анализы могут включать в себя анализ с использованием синтетического субстрата или анализ методом вестерн-блоттинга с целью измерения расщепленного кининогена, как описано в настоящем документе.

В качестве альтернативы, или в дополнение, в процессе лечения можно регистрировать уровень креатинкиназы в плазме или сыворотке. Если обнаружено, что во время лечения уровень креатинкиназы в плазме или сыворотке повышается, можно уменьшить дозу антитела, или можно прекратить лечение.

В некоторых вариантах осуществления оптимальную дозу (например, оптимальную профилактическую дозу или оптимальную терапевтическую дозу) описанного здесь антитела против рКa1 (например, DX-2930 или его антиген-связывающего фрагмента), можно определить следующим образом. Антитело вводят индивидууму, нуждающемуся в лечении, в начальной дозе. Измеряют концентрацию антитела в плазме индивидуума. Если концентрация в плазме ниже 80 нМ, при последующем введении дозу антитела увеличивают. Дозу антитела, поддерживающую концентрацию антитела в плазме выше, чем примерно 80 нМ, можно выбрать в качестве дозы, оптимальной для индивидуума. Уровень креатинфосфокиназы у индивидуума можно регистрировать на протяжении курса лечения и дозу, оптимальную для данного индивидуума, можно также корректировать по уровню креатинфосфокиназы, например, дозу антитела можно уменьшить, если во время лечения наблюдается повышение уровня креатинфосфокиназы.

#### **Сочетанные способы лечения**

Описанное здесь антитело против калликреина плазмы можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими терапевтическими средствами для лечения заболевания или состояния, связанного с активностью калликреина плазмы, например, заболевания или состояния, описанного в настоящем документе. Например, антитело связывающее калликреин плазмы, можно использовать в терапевтических или профилактических целях

в сочетании с хирургическим вмешательством, другим Fab или IgG против калликреина плазмы (например, Fab или IgG, отличным от описанных здесь), другим ингибитором калликреина плазмы, пептидным ингибитором или низкомолекулярным ингибитором. Примеры ингибиторов калликреина плазмы, которые можно использовать в сочетанной терапии вместе с описанными здесь антителами, связывающими калликреин плазмы, включают в себя ингибиторы калликреина плазмы, описанные, например, в WO 95/21601 или WO 2003/103475.

Один или несколько ингибиторов калликреина плазмы можно использовать в сочетании с одним или несколькими из описанных здесь антител, связывающих калликреин плазмы. Например, применение сочетания позволяет снизить дозу требуемого ингибитора и в результате уменьшить побочные эффекты.

Описанное здесь антитело, связывающее плазматический калликреин, можно вводить в сочетании с одним или несколькими терапевтическими средствами, используемыми в настоящее время для лечения НАЕ. Например, антитело DX-2930, или его функциональный вариант, описанный в данном документе, можно использовать вместе 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 "сочетание" относится к применению двух или более средств или способов для лечения одного пациента, где применение или действие средств или способов лечения перекрывается во времени. Терапевтические средства можно вводить одновременно (например, в составе одной композиции, которую вводят пациенту, или в составе двух отдельных композиций, вводимых одновременно) или последовательно в любом порядке. Последовательное введение включает в себя введения, которые осуществляются в разное время. Время между введением одного средства и другого средства может составлять несколько минут, часов, дней или недель. Описанное здесь антитело, связывающее калликреин плазмы, также можно использовать для уменьшения дозы другого терапевтического

средства, например, с целью уменьшения побочных эффектов, связанных с другим вводимым средством. Соответственно, сочетание может включать в себя введение второго средства в дозе, которая, по меньшей мере, на 10, 20, 30 или 50% ниже, чем доза, используемая в отсутствие антитела, связывающего калликреин плазмы.

Сочетанная терапия может включать в себя введение средства, которое уменьшает побочные эффекты других терапевтических средств. Указанное средство может представлять собой средство, которое уменьшает побочные эффекты лечения заболевания, связанного с калликреином плазмы.

Авторы настоящего изобретения полагают, что специалист в данной области может осуществить настоящее изобретение в полном объеме на основании приведенного выше описания, не проводя дополнительные исследования. Следовательно, нижеследующие конкретные варианты осуществления следует рассматривать только как иллюстративные, но не ограничивающие никаким образом остальные части описания. Все цитируемые здесь публикации включены в данный документ в качестве ссылки для разъяснения целей или предметов обсуждения, упомянутых в настоящем описании.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1: Исследование с использованием однократных возрастающих доз DX-2930 на здоровых добровольцах

Исследование с использованием однократных возрастающих доз проводят на здоровых добровольцах, используя следующие дозы DX-2930: 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг и 3 мг/кг. Результаты, полученные для каждого добровольца, анализируют, чтобы определить безопасность каждой дозы. Полноразмерные и переменные последовательности тяжелых и легких цепей DX-2930 приведены ниже, причем сигнальные последовательности выделены курсивом. CDR выделены жирным шрифтом и подчеркиванием.

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

MGWSCILFLVATATGAHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAP  
GKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAYRRIGVPR  
RDEFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT

SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP  
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR  
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE  
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 1)

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

MGWSCILFLVATATGAHSDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPG  
KAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEI  
KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD  
STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

Аминокислотная последовательность переменного домена  
тяжелой цепи DX-2930

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITV  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVSS  
(SEQ ID NO: 3)

Аминокислотная последовательность переменного домена  
легкой цепи DX-2930

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSR  
SRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK (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)

*Фаза 1а схемы исследования*

Данное исследование представляет собой рандомизированное, двойное слепое и плацебо-контролируемое исследование. Однократные и возрастающие дозы DX-2930 вводят подкожно здоровым индивидуумам. Участников исследования случайным образом распределяют в одну из четырех опытных групп, каждая из которых

соответствует определенной однократной дозе (0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг). Каждая группа состоит из шести активных индивидуумов, получающих лекарственное средство, и двух индивидуумов, получающих плацебо. За всеми индивидуумами наблюдают в течение 16 недель после завершения графика введения лекарственного средства.

#### *Результаты исследования безопасности*

DX-2930 хорошо переносится в однократных дозах до 3,0 мг/кг без признаков ограничивающей дозу токсичности. Таким образом, в данном исследовании не обнаружено никаких клинически значимых тревожных сигналов, связанных с DX-2930.

Результаты клинических лабораторных исследований свидетельствуют об отсутствии клинически значимых различий по каким-либо неблагоприятным явлениям среди индивидуумов, получающих DX-2930, и индивидуумов, получающих плацебо. Среди неблагоприятных явлений наиболее часто встречается головная боль (у 25% индивидуумов, получающих DX-2930, и у 25% индивидуумов, получающих плацебо). Тяжелые неблагоприятные явления отсутствуют, а все присутствующие неблагоприятные явления легко устраняются.

Результаты измерения показателей жизненно важных функций, физических обследований и регистрации электрокардиограмм (ЭКГ) демонстрируют наличие инфекции верхних дыхательных путей у одного индивидуума, который получал дозу 0,1 мг/кг, однако исследователь сообщает, что инфекция была легкой и не имела отношения к лечению. У остальных исследуемых индивидуумов изменения в показателях жизненно важных функций, результатах физических обследований и электрокардиограммах (ЭКГ) отсутствуют.

Результаты тестирования антител против лекарственных средств свидетельствуют об отсутствии сероконверсии.

Исследователь, проводящий испытание вслепую, обнаружил признаки тяжелых АЕ, связанных с лечением, только у двух индивидуумов. Повышение уровня креатинфосфокиназы до 902 ед/л [нормальный диапазон: 21-215 ед/л] наблюдалось у одного индивидуума, получавшего 0,1 мг/кг DX-2930 (4,2% от всех

индивидуумов, получавших DX-2930). Повышение уровня креатинфосфокиназы до 1967 ед/л [нормальный диапазон: 32-294 ед/л] наблюдалось у одного индивидуума, получавшего плацебо (12,5% всех пациентов, получавших плацебо). Результаты свидетельствуют об отсутствии в лабораторных анализах изменений, связанных с какими-либо другими АЕ или показателями, которые могут иметь клиническое значение. У всех индивидуумов отсутствуют реакции в участке инъекции.

Таблица 2

## Результаты фазы 1a исследования безопасности

	0,1 мг/кг (n=6)	0,3 мг/кг (n=6)	1,0 мг/кг (n=6)	3,0 мг/кг (n=6)	Все индивидуумы, получающие DX-2930 (n=24)	Плацебо (n=8)
Число индивидуумов с АЕ	5	3	4	4	16 (66,7%)	6 (75,0%)
Число смертей	0	0	0	0	0	0
Число SAE	0	0	0	0	0	0
Прекращение исследования вследствие АЕ	0	0	0	0	0	0
Число индивидуумов с АЕ, связанными с лечением*	2	1	1	2	6 (25,0%)	4 (50,0%)

\* Связанные с лечением АЕ: связь АЕ с исследуемым лекарственным средством оценивается исследователем, проводящим испытание вслепую

Примечание: термин "неблагоприятное явление" (АЕ) в данном описании относят конкретно к неблагоприятному событию, возникающему в результате лечения. Считают, что неблагоприятное явление возникает в результате лечения, если его появление регистрируют в течение 112 дней после окончания введения



исследуемого препарата во время визита последующего наблюдения, или, в случае появления АЕ до введения исследуемого лекарственного средства, если его тяжесть возрастает в течение 112 дней периода наблюдения после завершения введения лекарственного средства.

*Результаты фармакодинамических (PD) и фармакокинетических (PK) исследований*

В таблице 3 приведены значения фармакокинетических параметров для каждой исследуемой группы. Средние значения  $C_{max}$  и  $AUC_{last}$  находятся в строгой линейной зависимости от дозы, как и у антител с известными характеристиками. Препараты с длительным периодом полужизни позволяют использовать схемы с редким введением для достижения стабильных устойчивых уровней в крови. Во всех исследуемых группах DX-2930 демонстрирует наличие постоянного продолжительного периода полужизни, составляющего почти три недели.

Испытуемое терапевтическое средство для профилактики НАЕ должно иметь длительный период полужизни и предсказуемый фармакокинетический профиль, позволяющий осуществлять введение средства с большими интервалами времени и обеспечивающий логическое, техническое обоснование дозирования. DX-2930 имеет соответствующий фармакокинетический профиль, позволяющий использовать режим дозирования, который обеспечивает терапевтически значимое улучшение состояния пациентов с НАЕ.

Таблица 3

Группа, получающая соответствующую дозу лекарственного средства (мг/кг)	$C_{\max}$ (нг/мл)	$T_{\max}$ (дни)	$AUC_{\text{last}}$ (день*нг/мл)	$V_z/F$ (мл/кг)	$CL/F$ (мл/день/кг)	$T_{1/2}$ (дни)
0,1	555±124	7±3,85	15506±5088	154±22	5,5±1,8	20,5±4,4
0,3	1452±664	8,4±3,1	39070±13528	182±70	7,7±3,4	16,7±2,0
1,0	5612±2422	8,5±6,25	167570±55562	170±73	6,5±2,5	18,9±6,3
3,0	14548±5224	6,67±0,82	512746±208384	187±79	6,6±2,7	20,4±4,6

Фармакокинетические (PK) параметры DX-2930 измеряют после введения однократной дозы здоровым индивидуумам. После введения однократной дозы 3 мг/кг достигается концентрация лекарственного средства в плазме, превышающая целевой уровень 80 нМ. Уровень лекарственного средства, примерно равный или превышающий 80 нМ, поддерживаются в течение примерно 10 дней (фигура 7). Уровень лекарственного средства продолжает накапливаться после повторного введения препарата до достижения постоянной величины. Даже после введения только одной дозы DX-2930 достигается уровень лекарственного средства, превышающий целевое значение 80 нМ, который поддерживается в течение длительного периода времени. Результаты данного PK исследования подтверждают целесообразность стратегии дозирования, обеспечивающей достижение концентрации лекарственного средства в плазме выше целевого уровня 80 нМ с последующим постоянным поддержанием достигнутого уровня. Кроме того, уровни лекарственного средства, превышающие 80 нМ, можно использовать при необходимости достижения достаточного уровня ингибирования калликреина плазмы, связанного с профилактикой НАЕ.

Проводят фармакодинамический (PD) анализ DX-2930. Для дополнительной характеристики DX-2930 проводят диагностические анализы с использованием биомаркеров *ex vivo* на образцах плазмы индивидуумов, чтобы оценить фармакодинамический профиль молекулы. Проводят два независимых анализа - анализ активности калликреина плазмы с использованием искусственного флуорогенного субстрата и анализ методом вестерн-блоттинга, с помощью которого измеряют расщепление кининогена, природного субстрата калликреина плазмы, из которого образуется брадикинин.

Указанные анализы являются полуколичественными. Следовательно, экспериментальные точки нужно интерпретировать относительно других экспериментальных точек, определенных в данном эксперименте, и не сравнивать их с результатами, полученными в других анализах или в других аналитических системах. Указанные анализы проводят на плазме нормальных индивидуумов, содержащей нормальный уровень ингибитора C1. Следовательно, у здоровых индивидуумов, участвующих в указанных

анализах с использованием биомаркеров, не развиваются приступы НАЕ. Целью указанных анализов с использованием биомаркеров является подтверждение того, что DX-2930 в плазме индивидуумов, получающих лекарственное средство, обладает ингибиторной активностью в отношении калликреина плазмы. Не менее важной целью данных анализов является определение, действительно ли результаты фармакодинамических исследований подтверждают наблюдаемый PK профиль.

На фигуре 9 изображены фармакодинамические эффекты DX-2930. Плазму, полученную от индивидуумов, получающих исследуемое лекарственное средство, активируют *ex vivo*, чтобы индуцировать путь контактной системы и тем самым стимулировать образование и активность плазматического калликреина. Активность рK<sub>al</sub> измеряют с помощью флюорогенного анализа. Изображены результаты анализов, проведенных в группах, получающих от 1 до 3 мг/кг. Отчетливо видно ингибирование калликреина плазмы, в частности, в группах, получающих дозы 1 и 3 мг/кг. В группах, получающих 0,1 мг/кг или плацебо, заметное ингибирование отсутствует. Наблюдаемое ингибирование зависит как от дозы, так и от времени, и подтверждает ингибиторную активность DX-2930. PD эффект DX-2930 подтверждает PK параметры DX-2930.

#### *Терапевтическое применение DX-2930*

В случае профилактики необходимое условие для достижения эффективности заключается в том, что соответствующая мишень лекарственного средства должна ингибироваться на уровне, превышающем минимальное требуемое количество на постоянной основе. Пробелы в охвате ингибирования должны быть сведены к минимуму или вообще устранены. Если уровень ингибирования снижается ниже минимального требуемого уровня, человек становится биологически чувствительным к активации патологического процесса и может быть отнесен к группе клинического риска в отношении случаев заболевания.

НАЕ не исключает применения широко используемых принципов профилактики.

При НАЕ калликреин плазмы представляет собой проверенную мишень для лекарственного средства, играющую важную роль в

патогенезе приступов ангионевротического отека. Для предотвращения приступов НАЕ нужно, чтобы ингибирование калликреина плазмы непрерывно поддерживалось выше минимального терапевтического уровня. Пробелы в охвате с течением времени должны быть сведены к минимуму, чтобы избежать периодов чувствительности. Данное требование дополнительно усиливается наличием положительной обратной связи, которая предположительно играет важную роль в приступах НАЕ. После инициации данного каскада активация калликреина плазмы приводит к активации фактора XII, который, в свою очередь, увеличивает образование калликреина плазмы.

Ингибирование калликреина плазмы под действием DX-2930 и экаллантида, известного терапевтического средства, принятого в США для неотложного лечения приступов НАЕ, сравнивают с помощью анализа *in vitro*. В данной системе человеческую плазму подвергают воздействию средства, иницирующего контактную систему и превращающего прекалликреин в активный плазматический калликреин.

Максимальная концентрация экаллантида в плазме после введения дозы пациентам, составляющая 80 нМ, вызывает только частичное ингибирование активности калликреина плазмы. Результаты данного анализа демонстрируют, что при концентрации, примерно равной 80 нМ, DX-2930 оказывает эффект, сравнимый с эффектом экаллантида (фигура 5). С учетом того, что уровень калликреина плазмы, необходимый для развития приступов НАЕ, составляет 80 нМ, и что сравнимая активность DX-2930 и экаллантида в отношении ингибирования калликреина плазмы проявляется при концентрации, примерно равной указанному значению, выдвинуто предположение, что непрерывное поддержание концентрации DX-2930 выше концентрации лекарственного средства в плазме 80 нМ позволяет предотвратить приступы НАЕ (фигура 6). На основании имеющихся в настоящее время данных и понимания биологии болезни можно сделать вывод, что лекарственное средство DX-2930 является активным в целевой концентрации в плазме 80 нмоль. Хотя концентрация 80 нМ является исходной целью, для достижения терапевтической дозы могут потребоваться более низкие

или более высокие уровни лекарственного средства DX-2930.

Пример 2: Исследование с использованием нескольких возрастающих доз DX-2930 у пациентов с НАЕ

Пациентам с НАЕ вводят DX-2930 в несколько приемов в следующих дозах: 0,1 мг/кг, 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг. На фигуре 2 приведены ожидаемые концентрации DX-2930 в плазме, которые могут быть достигнуты после повторного введения DX-2930 в дозе 3 мг/кг. Исходный профиль концентрации соответствует профилю, наблюдаемому при однократном введении дозы здоровым индивидуумам. Для прогнозирования фармакодинамических и фармакокинетических характеристик DX-2930 после многократного введения можно использовать PK моделирование. На фиг. 8 приведена гипотетическая схема, в которой DX-2930 вводят в дозе 3 мг/кг каждые 28 дней здоровым индивидуумам. Результаты такого моделирования позволяют предположить, что после достижения стационарного состояния повторные введения непрерывно поддерживают концентрацию лекарственного средства, примерно равную исходному целевому уровню 80 нМ, или превышающую его (обсуждение указанного порогового значения можно найти в примере 2).

Безопасность и эффективность DX-2930 определяют у пациентов с НАЕ после двух введений DX-2930 с интервалом в одну неделю. На основе результатов анализов с применением биомаркеров (наряду с результатами фармакокинетических анализов) определяют, какую дозу (дозы) можно использовать в последующем исследовании для оценки эффективности предотвращения приступов НАЕ под действием DX-2930 (в разных дозах).

Пример 3. Фармакологическое моделирование режима дозирования при исследовании долговременной профилактики наследственного ангионевротического отека

#### **Методы**

Ингибирование  $\alpha_1$  под действием экаллангида и DX-2930 оценивают *in vitro* с помощью анализа, в котором используют синтетический субстрат. Моделирование проводят, используя фармакокинетические (PK) параметры, определенные в исследовании, в котором однократные возрастающие дозы DX-2930 вводят подкожно

здоровым индивидуумам.

### **Результаты**

В анализе pKal, проводимом *in vitro*, DX-2930 и экаллантинид имеют сопоставимые фармакодинамические (PD) характеристики в концентрации 80 нМ. Концентрация ингибитора pKal в плазме ниже 80 нМ может обеспечить лишь частичный профилактический эффект, свидетельствуя о том, что гипотеза средних и высоких доз является более правдоподобной, чем гипотеза низких доз.

Таким образом, непрерывно поддерживая уровень препарата DX-2930 выше 80 нМ, можно достичь уровня ингибирования pKal, предлагаемого гипотезой средних доз. PK моделирование свидетельствует о том, что многократное введение DX-2930 обеспечивает устойчивые концентрации лекарственного средства в плазме выше 80 нМ при использовании дозы 100 мг каждые 2 недели (или 300 мг каждые 4 недели), и выше 200 нМ при использовании дозы 300 мг каждые 2 недели.

### **ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Все признаки, раскрытые в данном описании, можно объединять в любом сочетании. Каждый признак, раскрытый в данном описании, может быть заменен альтернативным признаком, который служит для такой же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если не указано иное, каждый раскрытый признак является только примером общего ряда эквивалентных или аналогичных признаков.

Из приведенного выше описания специалист в данной области может легко определить основные характеристики настоящего изобретения и, не отступая от сущности и объема изобретения, может осуществить разные изменения и модификации изобретения, чтобы приспособить его к разным способам применения и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также входят в объем формулы изобретения.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ лечения наследственного ангионевротического отека (НАЕ), включающий: введение индивидууму, нуждающемуся в этом, антитела в таком эффективном количестве, чтобы концентрация антитела в плазме у индивидуума была выше приблизительно 80 нМ, где антитело связывает активный калликреин плазмы и содержит область, определяющую комплементарность тяжелой цепи (CDR) 1 с SEQ ID NO: 5, CDR2 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 6, CDR3 тяжелой цепи с SEQ ID NO: 7, CDR1 легкой цепи с SEQ ID NO: 8, CDR2 легкой цепи с SEQ ID NO: 9 и CDR3 легкой цепи с SEQ ID NO: 10.

2. Способ по п.1, где эффективное количество антитела составляет приблизительно от 100 мг до 400 мг.

3. Способ по п. 1 или 2, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3 и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 4.

4. Способ по любому из п.п. 1-3, где антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 1 и легкую цепь с SEQ ID NO: 2.

5. Способ по любому одному из п.п. 1-4, где антитело представляет собой полноразмерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

6. Способ по любому одному из п.п. 1-5, где антитело вводят:

(i) в дозе 100 мг каждые две недели;

(ii) по 300 мг каждые две недели; или

(iii) по 300 мг каждые четыре недели.

7. Способ по любому из п.п. 1-6, где антитело вводят подкожно.

8. Способ по любому из п.п. 1-7, где индивидуум представляет собой пациента-человека, страдающего от НАЕ, предрасположенного к НАЕ, или имеющего риск приступа НАЕ.

9. Способ по любому из п.п. 1-8, где антитело вводят для профилактического лечения.

10. Способ по любому одному из п.п. 1-9, дополнительно включающий определение уровня креатинфосфокиназы у индивидуума до и после лечения, или на протяжении курса лечения.



11. Способ по п. 10, дополнительно включающий уменьшение дозы антитела или прекращение лечения при повышении уровня креатинфосфокиназы.

12. Способ лечения наследственного ангионевротического отека (НАЕ), включающий:

введение индивидууму, нуждающемуся в этом, одной дозы или множества доз выделенного антитела, которое связывает активный калликреин плазмы,

где каждая из двух последовательных доз во множестве доз вводится с интервалом, составляющим, по меньшей мере 2 недели и,

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

13. Способ по п. 12, где антитело представляет собой антитело, которое не связывает прекалликреин.

14. Способ по п. 12 или 13, где антитело содержит переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3 и переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 4.

15. Способ по любому из п.п. 12-14, где антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 1 и легкую цепь с SEQ ID NO: 2.

16. Способ по любому из п.п. 12-15, где антитело представляет собой полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

17. Способ по любому из п.п. 12-16, где разовая доза или по меньшей мере одна доза из множества доз составляет 0,1-3 мг/кг.

18. Способ по любому из п.п. 12-17, где каждая доза из множества доз составляет 3 мг/кг.

19. Способ по любому из п.п. 12-18, где антитело вводят ежемесячно.

20. Способ по любому из п.п. 12-19, дополнительно включающий определение уровня креатинфосфокиназы у индивидуума до и после лечения или на протяжении курса лечения.

21. Способ по п.20, дополнительно включающий уменьшение дозы антитела или прекращение лечения при повышении уровня креатинфосфокиназы.

22. Способ лечения наследственного ангионевротического отека (НАЕ), включающий:

введение индивидууму, нуждающемуся в этом, антитела, связывающего активный калликреин плазмы, в первой дозе;

измерение концентрации антитела в плазме у индивидуума; и

введение индивидууму антитела во второй дозе, если концентрация антитела в плазме ниже, чем приблизительно 80 нМ,

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

23. Способ по п. 22, где антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 4.

24. Способ по п.22 или 23, где антитело содержит тяжелую цепь с SEQ ID NO: 1 и легкую цепь с SEQ ID NO: 2.

25. Способ по любому одному из п.п. 22-24, где антитело представляет собой полноразмерное антитело или его антиген-связывающий фрагмент.

26. Способ по любому одному из п.п. 22-25, где первая доза, вторая доза, или обе, составляют приблизительно от 100 мг до 400 мг.

27. Способ по п. 26, где первая доза, вторая доза, или обе, составляют приблизительно от 100 мг до 300 мг.

28. Способ по любому одному из п.п. 22-27, где вторая доза выше, чем в первая доза.

29. Способ по любому одному из п.п. 22-28, дополнительно включающий определение уровня креатинфосфокиназы у индивидуума до и после лечения, или на протяжении курса лечения.

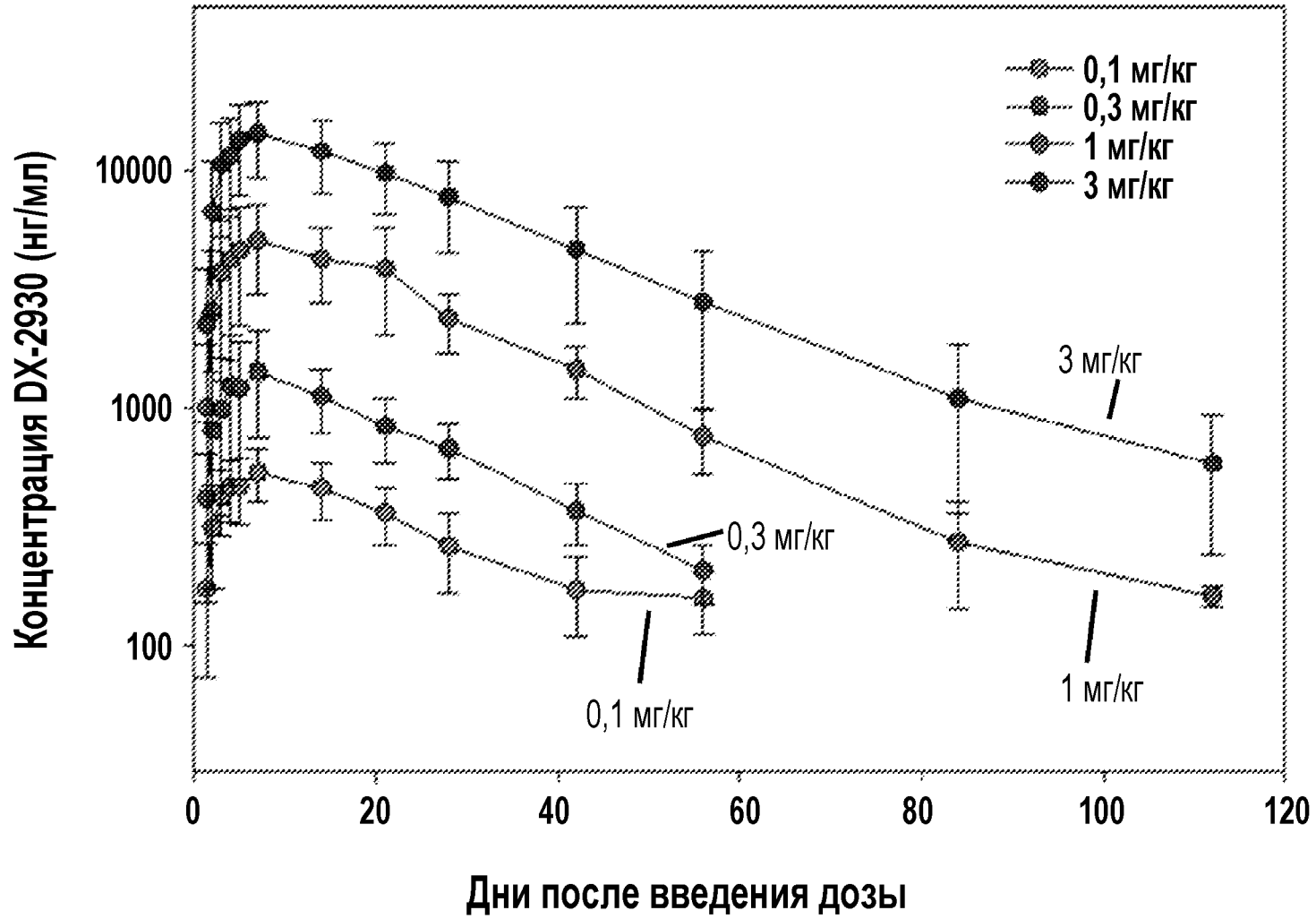
30. Способ по п. 29, дополнительно включающий уменьшение дозы антитела или прекращение лечения, при повышении уровня креатинфосфокиназы.

31. Способ по любому из п.п. 22-30, где введение представляет собой подкожное введение.

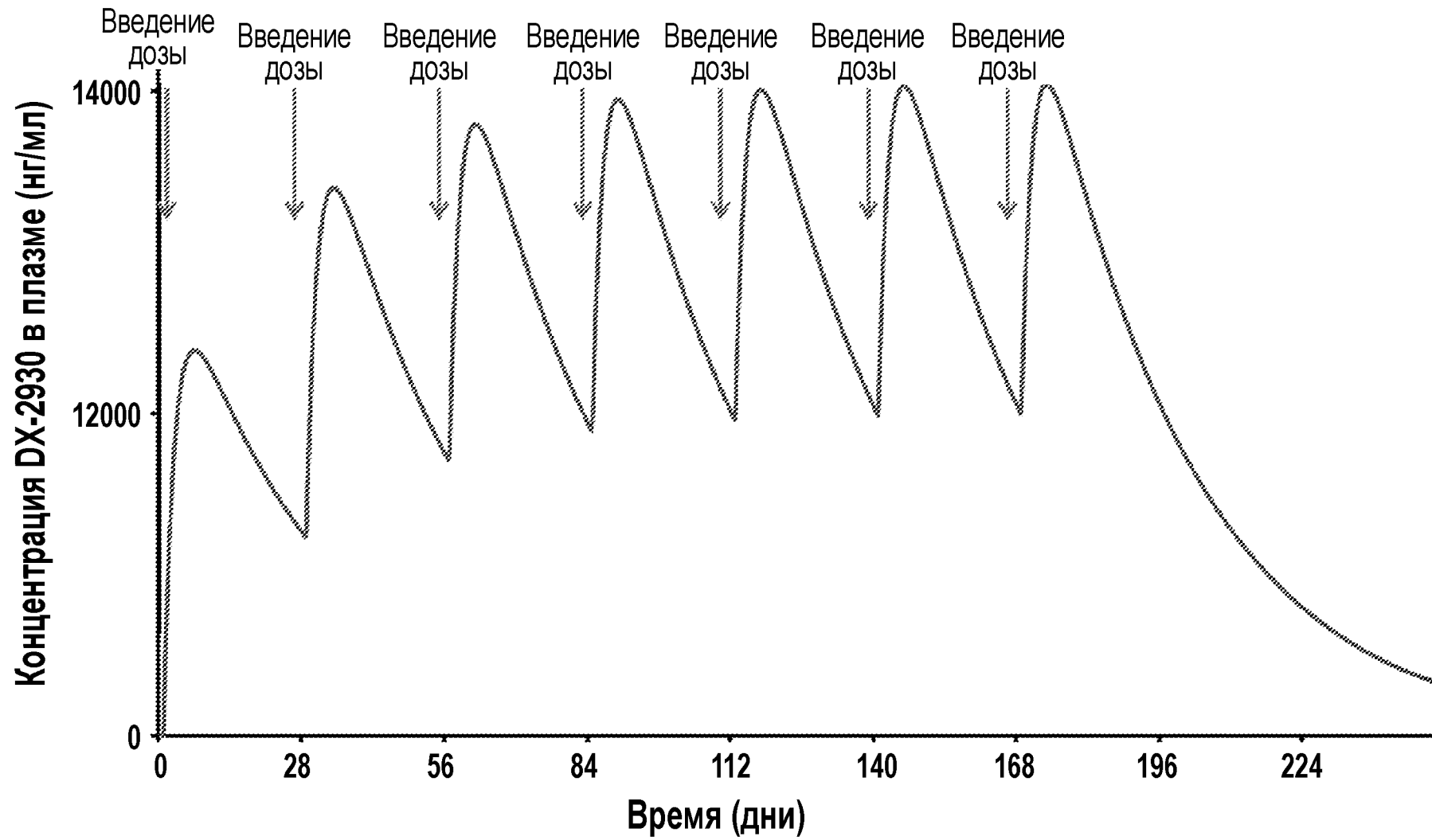
32. Способ по любому из п.п. 22-31, где индивидуумом представляет собой пациента-человека, страдающего от НАЕ, предрасположенного к НАЕ, или имеющего риск приступа НАЕ.

По доверенности

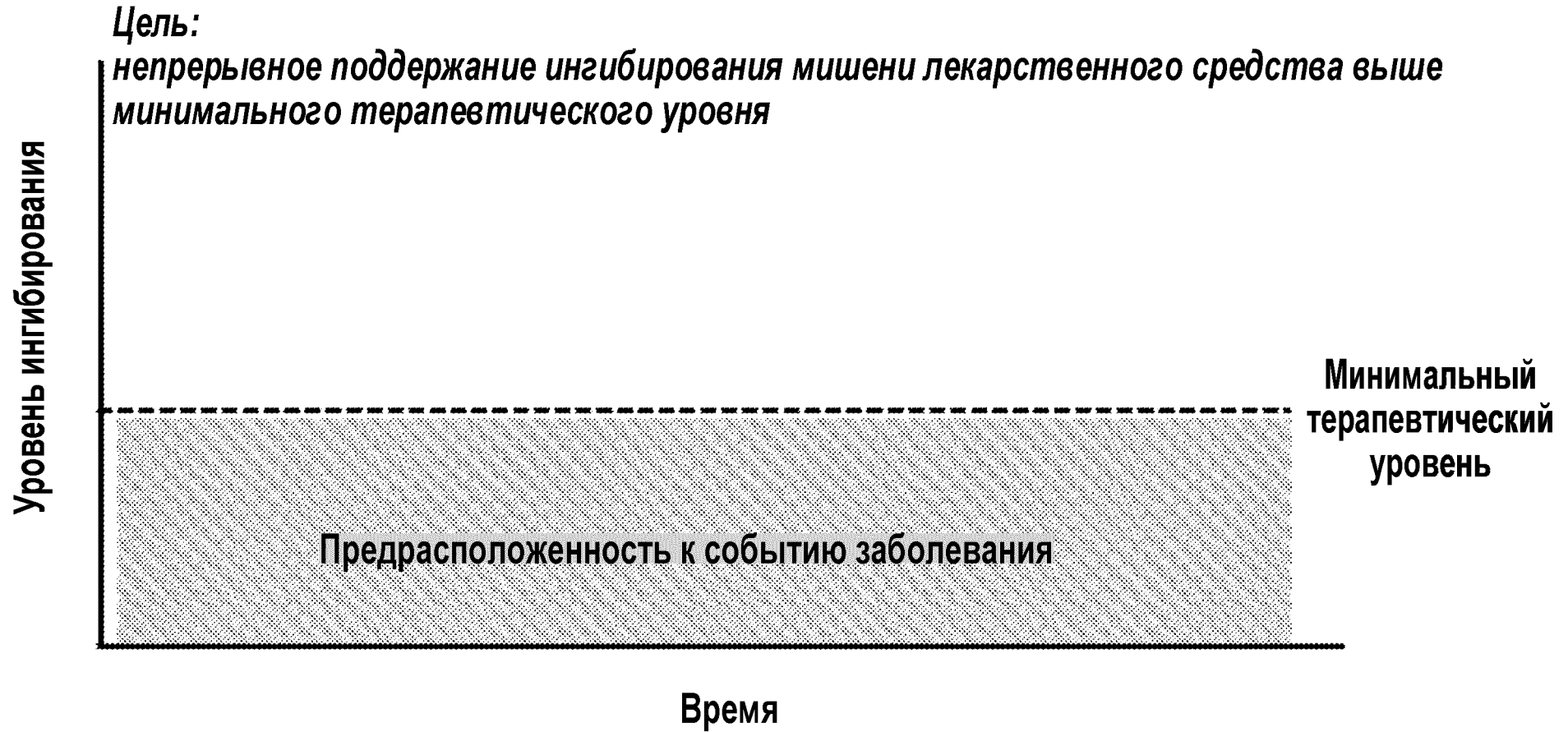
ФИГ.1



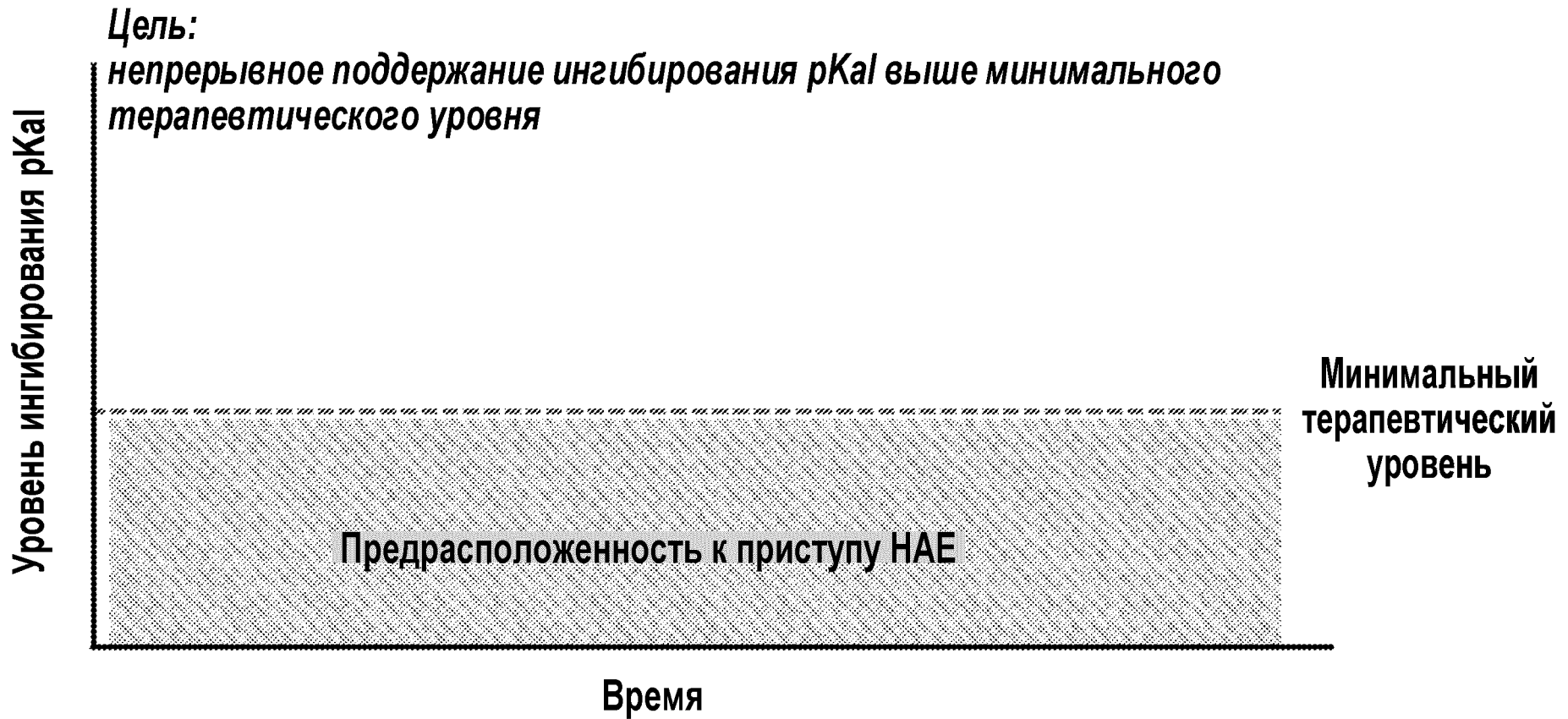
ФИГ.2



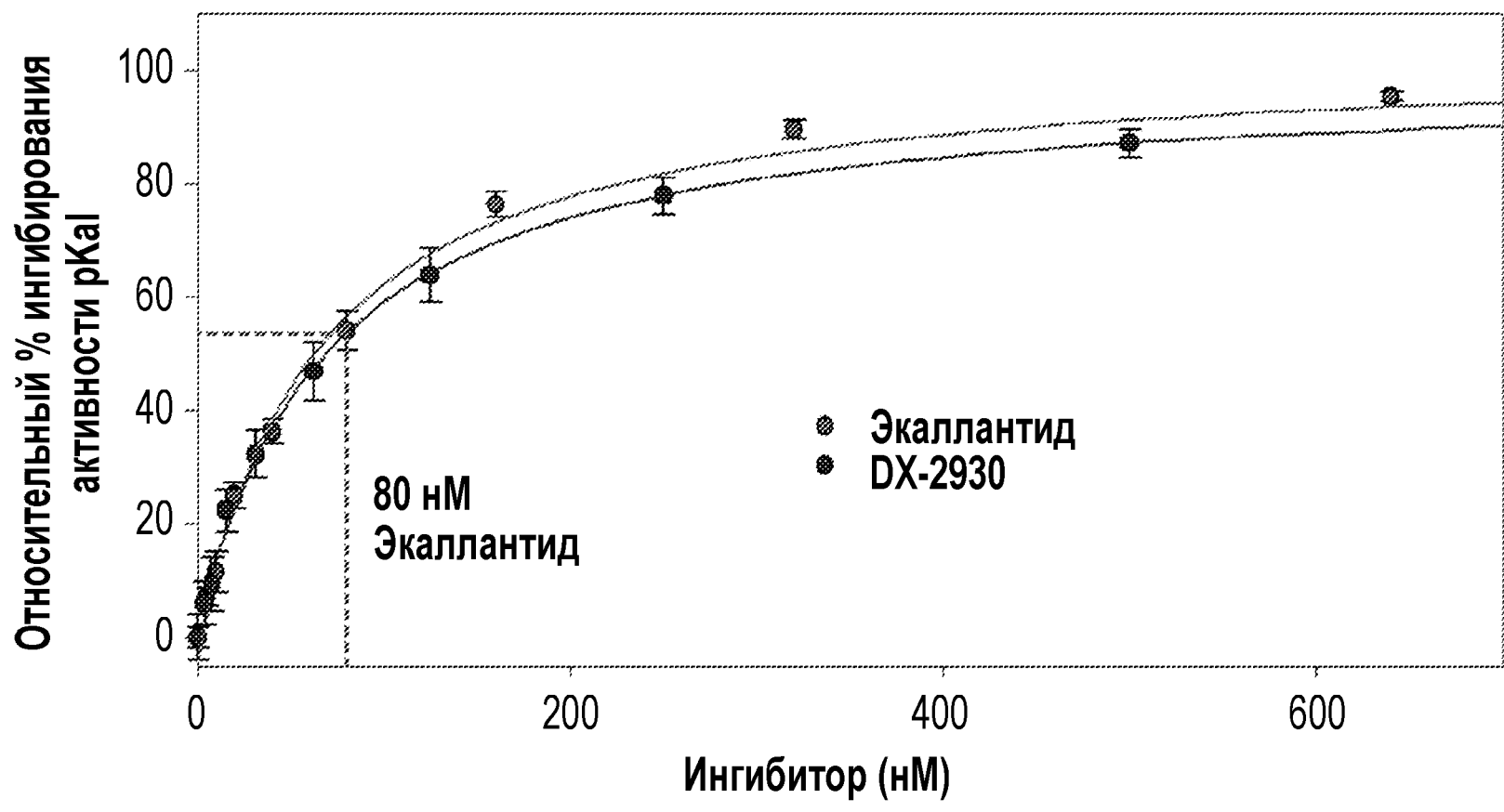
ФИГ.3



ФИГ.4

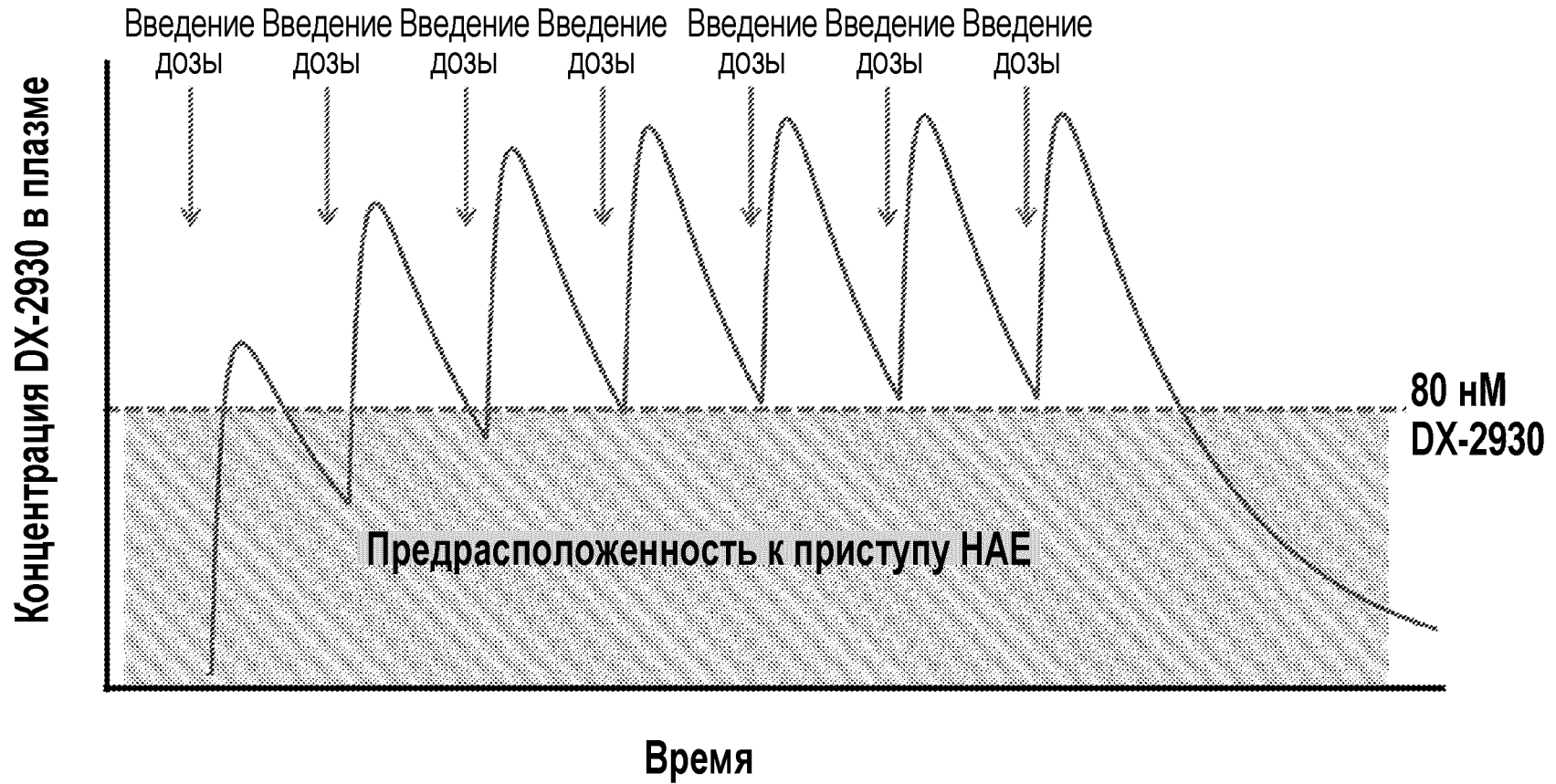


ФИГ.5

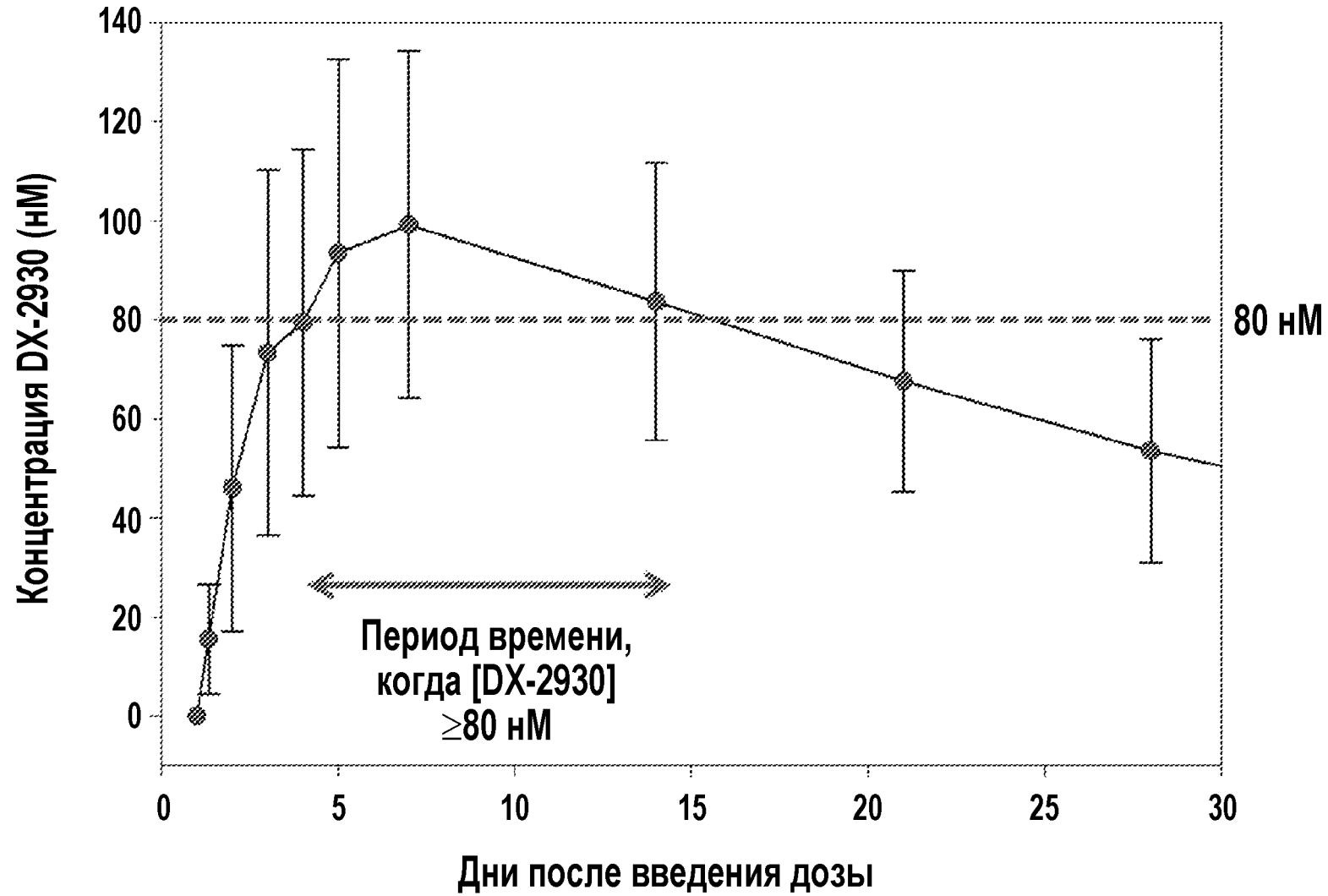




ФИГ.6

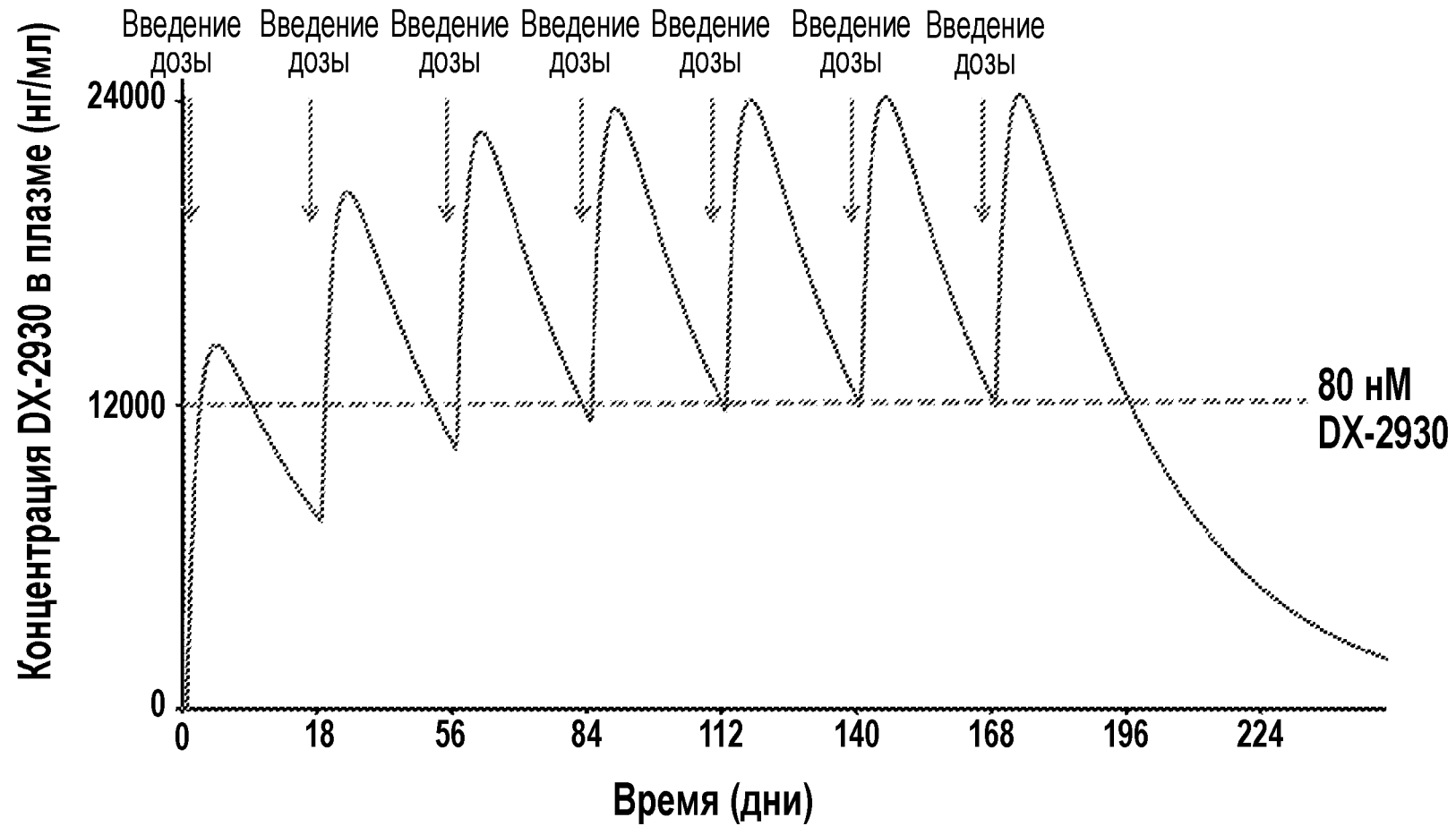


ФИГ.7

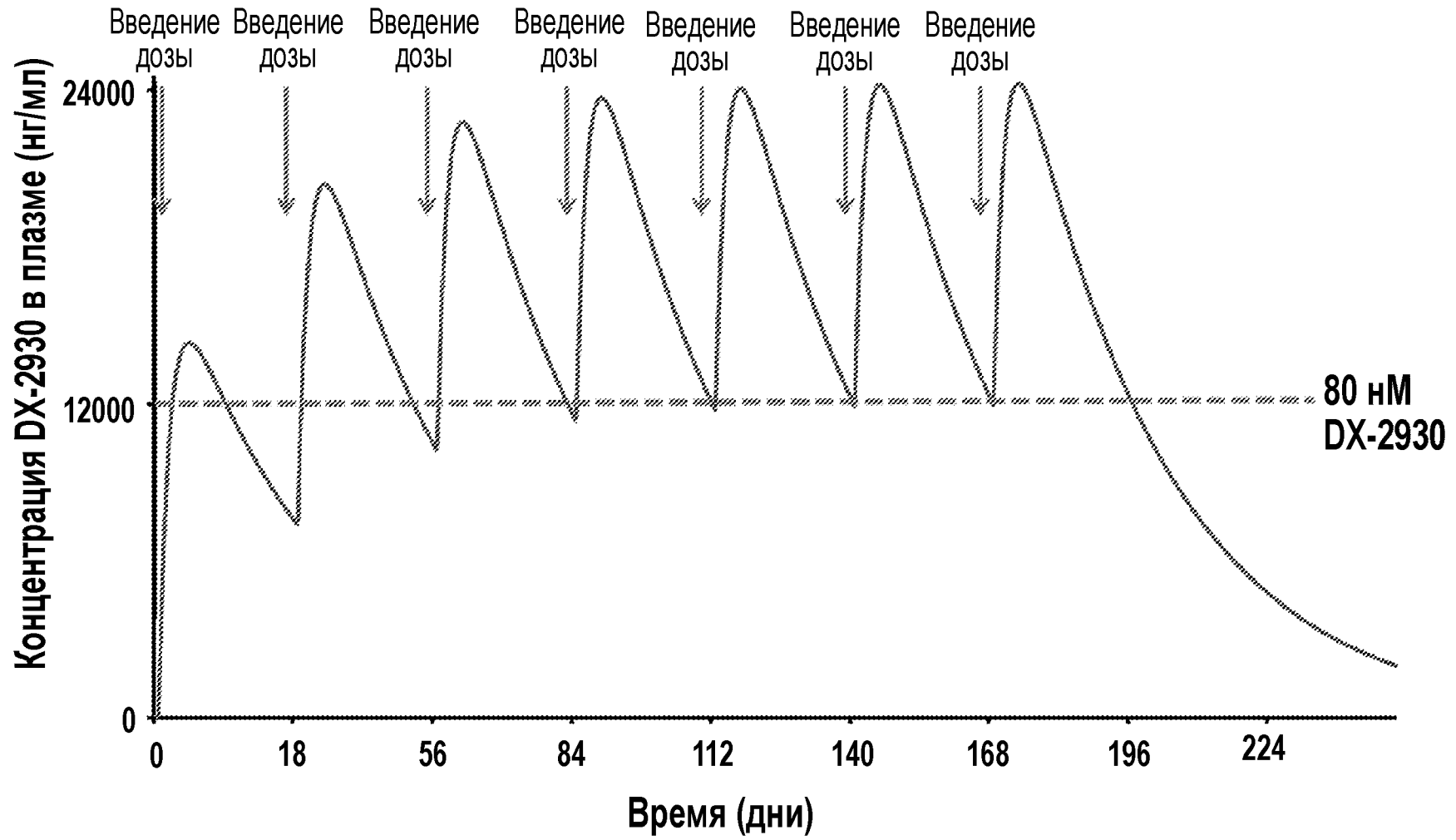


**ФИГ.8**

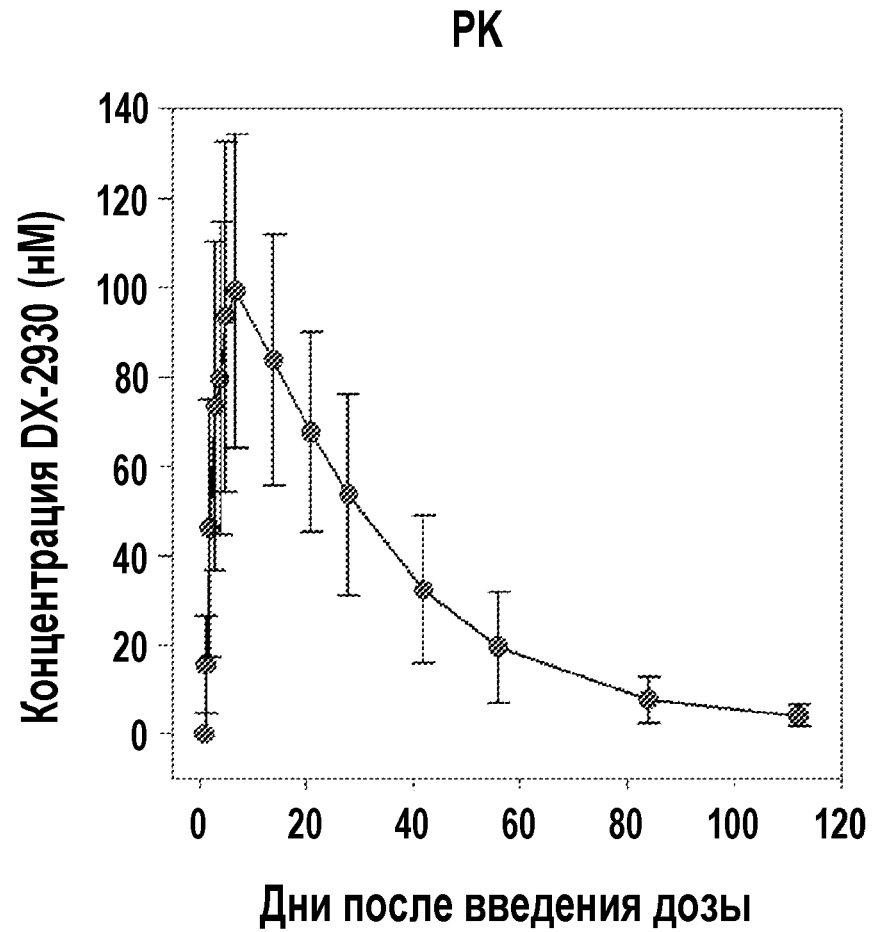
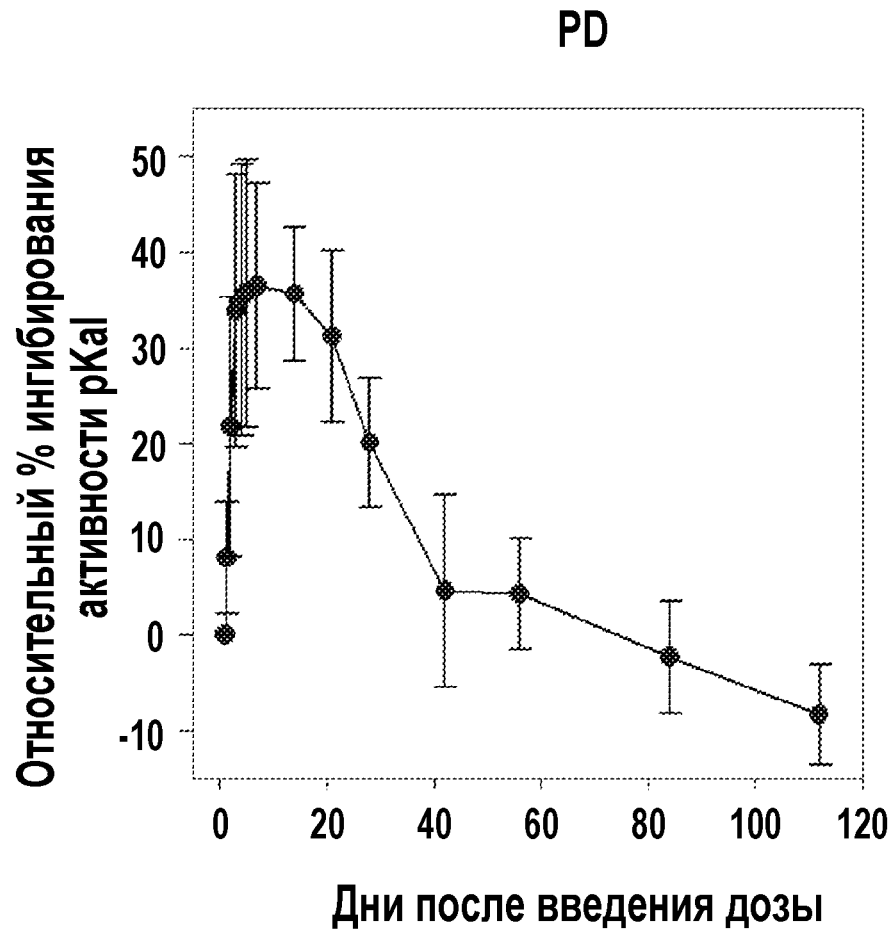
**Прогнозируемые концентрации DX-2930 после введения здоровым индивидуумам  
3 мг/кг п.к. каждые 28 дней**



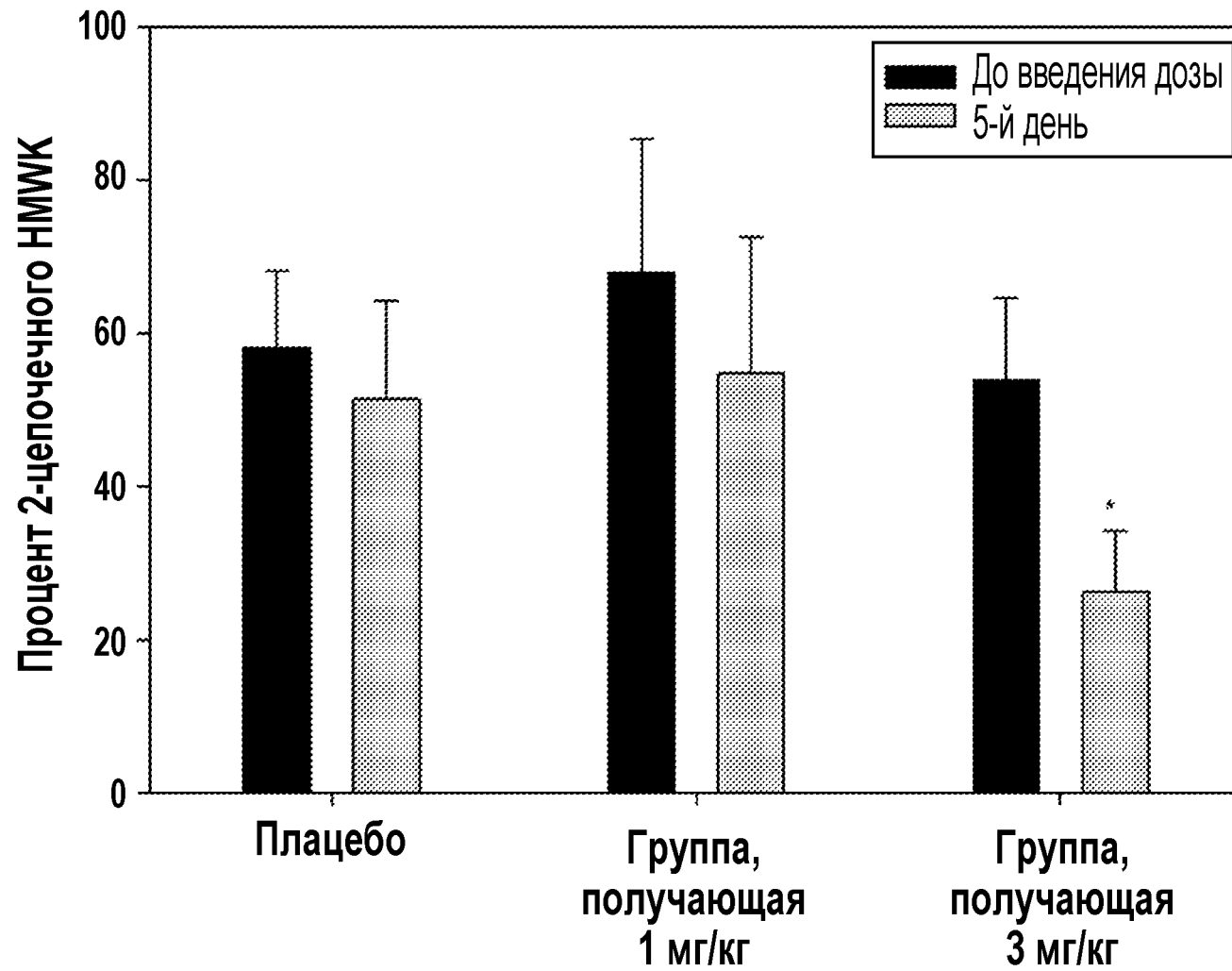
ФИГ.9



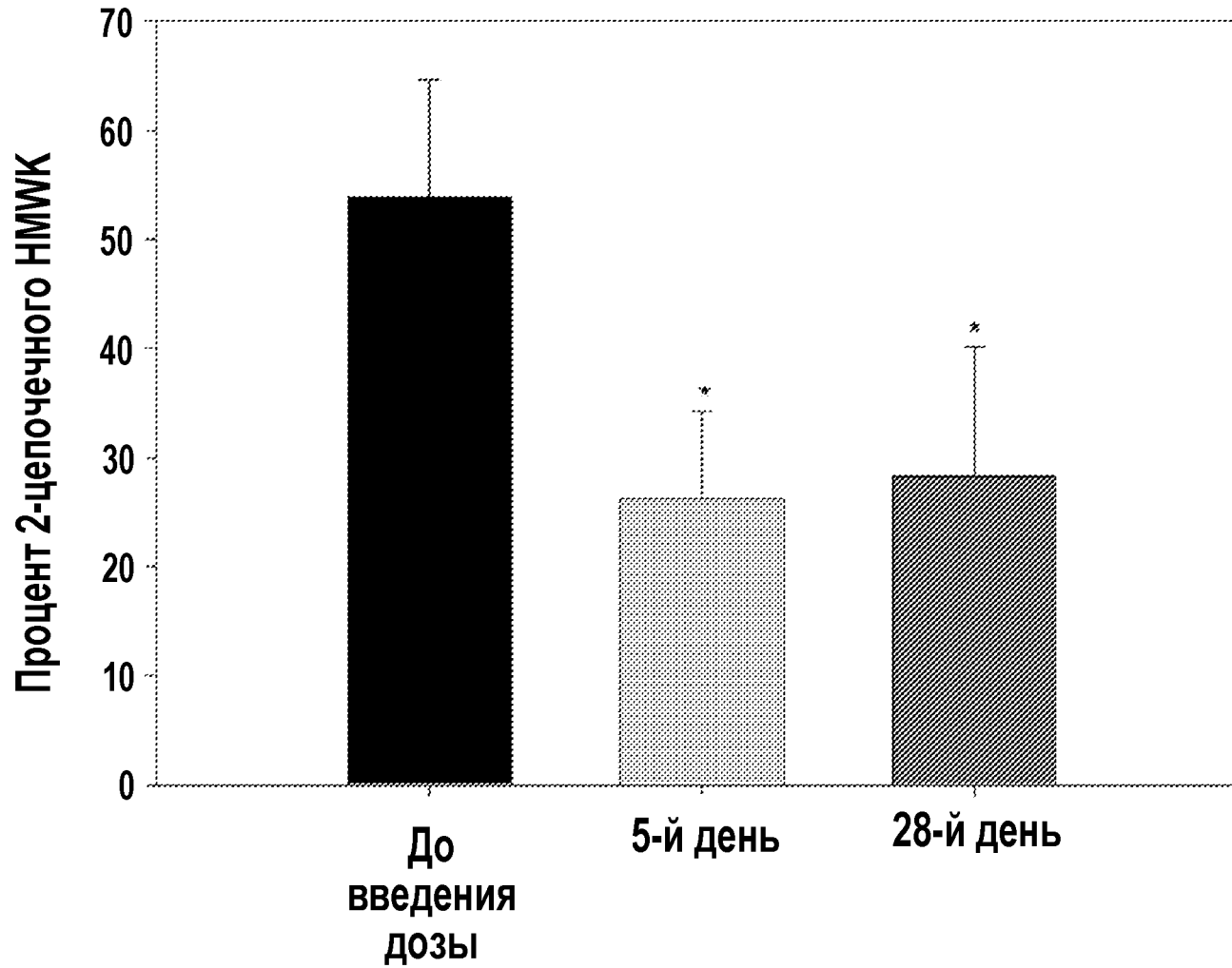
ФИГ.10



ФИГ.11



ФИГ.12



**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**  
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202191382**

**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

*A61K 39/395 (2006.01)*  
*A61P 7/00 (2006.01)*  
*A61P 7/10 (2006.01)*  
*C07K 16/40 (2006.01)*

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

**Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)  
A61K 39/395, A61P 7/00, A61P 7/10, C07K 16/40

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)  
ЕАПАТИС, Espacenet, Patentscope, PubMed, NCBI

**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	US 20120201756 A1, - (DYAX CORP.) 2012-08-09 Описание стр. 1-3, 44-46, Фигура 18 Формула изобретения пункты 1-8	1-32
Y	WO 2011085103 A2, - (DYAX CORP.) 2011-07-14 Описание стр. 110-115	1-32
Y	DANIEL J SEXTON et al Comparison Of Plasma Kallikrein Inhibition By The Endogenous C1-Inhibitor Versus DX-2930, a Monoclonal Antibody Inhibitor, BLOOD (2013) 122 (21): 1066. <a href="https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.1066.1066">https://doi.org/10.1182/blood.V122.21.1066.1066</a>	1-32

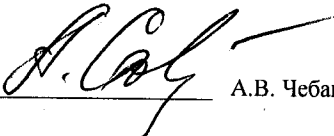
последующие документы указаны в продолжении

\* Особые категории ссылочных документов:  
«А» - документ, определяющий общий уровень техники  
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке  
«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее  
«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.  
"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения  
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности  
«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории  
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом  
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **19/11/2021**

Уполномоченное лицо:  
Заместитель начальника Управления экспертизы  
Начальник отдела химии и медицины

  
А.В. Чебан