

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040036**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.04.12**

(51) Int. Cl. *A61B 5/154* (2006.01)  
*A61B 5/15* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201890478**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.08.12**

---

(54) **ВАКУУМНЫЕ ПРОБИРКИ ДЛЯ СБОРА КРОВИ, СОДЕРЖАЩИЕ ИНГИБИТОРЫ  
ПРОТЕАЗЫ, ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВАЦИИ КОНТАКТНОЙ СИСТЕМЫ**

---

(31) **62/204,644; 62/214,308**

(56) WO-A2-03097237  
US-A1-2005124965  
WO-A1-2007140963  
WO-A1-2013116702

(32) **2015.08.13; 2015.09.04**

(33) **US**

(43) **2018.07.31**

(86) **PCT/US2016/046681**

(87) **WO 2017/027771 2017.02.16**

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

(72) Изобретатель:  
**Секстон Дэниел Дж., Фосетт Райан  
(US)**

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

---

(57) В изобретении предложена вакуумная пробирка для забора крови, содержащая коктейль ингибиторов протеазы в жидкой форме, и ее применение для оценки признаков, связанных с контактной системой у индивида, включая эндогенный уровень активации контактной системы, эндогенный уровень лекарственного средства, которое нацелено на компонент контактной системы во время лечения, и/или иммуногенность такого лекарственного средства.

**040036**

**B1**

**040036**  
**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по дате подачи заявки США № 62/204644, поданной 13 августа 2015 года, и предварительной заявки США № 62/214308, поданной 4 сентября 2015 года. Полное содержание каждой из этих ссылочных заявок включено в настоящий документ в качестве ссылки.

### Уровень техники

Точное измерение уровня активации контактной системы *in vivo* с использованием плазмы пациента осложнено свойством активации *ex vivo* во время сбора крови. Кровь пациентов с некоторыми заболеваниями, связанными с контактной системой, например с наследственным ангионевротическим отеком, особенно подвержена активации контактной системы *ex vivo*, поскольку в ней отсутствует ингибитор C1, природный ингибитор этого пути. Следовательно, измерение специфических биомаркеров пути (например, 2-цепочечного высокомолекулярного кининогена) может завесить степень активации контактной системы, которая имеется у пациента, если кровь не будет осторожно собрана и обработана.

### Краткое описание изобретения

Настоящее описание основано, по меньшей мере отчасти, на разработке не стеклянных вакуумных пробирок для сбора крови, содержащих смеси (коктейли) ингибиторов протеазы в жидком составе, который предотвращает активацию контактной системы *ex vivo* во время сбора крови. Таким образом, раскрытые в настоящем описании вакуумные пробирки для сбора крови позволяют точно измерить эндогенный уровень активации контактной системы у пациентов, особенно у пациентов с недостатком природного ингибитора (например, ингибитора C1) этого пути.

Соответственно, в одном из аспектов описание относится к вакуумной пробирке для сбора крови, содержащей жидкий состав, который содержит смесь ингибиторов протеазы, в котором практически нет ингибиторов протеазы, которые нестабильны в водном растворе. Пробирка может быть не стеклянной пробиркой. В некоторых вариантах осуществления пробирка является пластиковой. В некоторых вариантах осуществления вакуумная пробирка для сбора крови содержит 0,5 мл любого жидкого состава, описанного в настоящем документе, который может быть разведен в 10 раз при использовании.

В некоторых вариантах осуществления смесь ингибиторов протеазы в вакуумной пробирке для сбора крови, описанной в настоящем документе, содержит по меньшей мере один ингибитор сериновой протеазы (например, ингибитор калликреина плазмы) и по меньшей мере один ингибитор цистеиновой протеазы. В одном из примеров смесь ингибиторов протеазы включает EPI-KAL2, который может быть биотинилирован, и лейпептин. Количество EPI-KAL2 в содержащем его жидком составе может изменяться от 5 до 15 мкМ. Альтернативно или дополнительно, количество лейпептина в жидком составе может изменяться от 200 до 300 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления смесь ингибиторов протеазы, описанных в настоящем документе, может содержать по меньшей мере два ингибитора сериновой протеазы, по меньшей мере один из которых представляет собой ингибитор трипсина, например ингибитор трипсина сои. В некоторых примерах смесь ингибиторов протеазы включает бензамидин, ингибитор трипсина сои, лейпептин и AEBSF. В некоторых примерах жидкий состав в вакуумной пробирке для сбора крови может содержать 80-120 мМ бензамидина, 1-3 мг/мл ингибитора трипсина сои, 200-300 мкМ лейпептина и/или 10-30 мМ AEBSF.

Жидкий состав в любой вакуумной пробирке для сбора крови, описанной в настоящем документе, может дополнительно содержать полибрен и ЭДТА. В некоторых вариантах осуществления любой жидкий состав, описанный в настоящем документе, может иметь pH 4-6 (например, 4,5).

В другом аспекте, настоящее описание представляет способ оценки эндогенного уровня активации контактной системы у индивида. Способ включает: (i) сбор крови у индивида в любую вакуумную пробирку для сбора крови, описанную в настоящем описании; (ii) обработку крови с получением образца плазмы; и (iii) измерение уровня активации контактной системы в образце плазмы. В некоторых вариантах осуществления стадию измерения (стадия (iii)) можно осуществить путем измерения уровня одного или нескольких биомаркеров, указывающих на активацию контактной системы. Такие биомаркеры могут включать прекалликреин, активный калликреин плазмы (pKal),  $\alpha$ 2M-pKal, активный фактор XII, активный фактор XI, высокомолекулярный кининоген (HMWK) и/или метаболит брадикинина. В одном из примеров один или несколько биомаркеров включают расщепленный HMWK и/или интактный HMWK.

В еще одном аспекте, настоящее описание представляет способ оценки уровня лекарственного средства с направленным действием на контактную систему у индивида. Способ включает: (i) сбор крови у индивида в вакуумную пробирку для сбора крови, описанную в настоящем описании, причем индивид получает лекарственное средство с направленным действием на компонент контактной системы; (ii) обработку крови с получением образца плазмы; и (iii) измерение уровня лекарственного средства в плазме индивида.

Кроме того, в настоящем описании представлен способ оценки иммуногенности лекарственного средства с направленным действием на контактную систему, где способ включает: (i) сбор крови у индивида в вакуумную пробирку для сбора крови, как описано в настоящем описании, причем индивид получает лекарственное средство с направленным действием на компонент контактной системы; (ii) обработку крови с получением образца плазмы; и (iii) измерение уровня антител, которые связываются с лекарственным средством, в образце плазмы. Такой способ может дополнительно включать перед стадией (iii)

выделение антител, которые связываются с лекарственным средством, из образца плазмы. В некоторых примерах антитела против лекарственных средств (ADA) могут быть выделены методом твердофазной экстракции и кислотной диссоциации (SPEAD).

В любом из способов, описанных в настоящем описании, индивидом может быть больной человек, который в некоторых случаях может получать лечение лекарственным средством с направленным действием на компонент (например, на калликреин плазмы) контактной системы, например, лекарственное средство (например, антителом), специфически направленным на калликреин плазмы (например, на активную форму калликреина плазмы). В некоторых примерах кровь взята у больного с заболеванием, связанным с контактной системой, например с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ) или идиопатическим ангионевротическим отеком. В некоторых случаях больной страдает НАЕ с нормальным уровнем С1-ингибитора (С1-INH).

В любом из способов, описанных в настоящем документе, вакуумная пробирка для забора крови может быть не первой пробиркой, заполненной кровью индивида. Альтернативно или дополнительно, стадия способа [стадия (ii)] может быть осуществлена в течение одного часа после стадии сбора крови [стадия (i)].

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

### Краткое описание чертежей

Нижеприведенные чертежи являются частью настоящего описания и включены для дополнительно раскрытия некоторых аспектов настоящего описания, которое может быть лучше понято со ссылкой на один или несколько этих чертежей в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в настоящем документе.

На фиг. 1 показана фотография, демонстрирующая, что пробирки SCAT169 и SCAT153 предотвратили активацию контактной системы, как измерено в 2-цепочечном Вестерн-блот-анализе. Когда в плазму добавляют 10% эллаговую кислоту, то контактная система активируется, что приводит к превращению 1-цепочечного НМWK в 2-цепочечный НМWK (см. плазма с цитратом натрия). Напротив, в плазме SCAT169 и SCAT153 содержится такое же количество 1-цепочечного НМWK перед и после добавления эллаговой кислоты;

на фиг. 2 представлен график, показывающий изменение расщепления кининогена (в процентах 2-НМWK/сНМWK) на основании способов сбора образцов плазмы у здоровых индивидов. Указан клинический центр сбора, а также тип пробирок, использованных для сбора, включая К<sub>2</sub>ЭДТА (ЭДТА), натрия цитрат, SCAT169 или P100. Группировка измерительных точек соответствует, слева направо: центр 1: ЭДТА, центр 2: цитрат; центр 3: цитрат, центр 4: цитрат, центр 1: SCAT169, центр 2: SCAT169, центр 4: SCAT169, центр 5: SCAT169 и центр 4: P100;

на фиг. 3 показан график, демонстрирующий расщепление кининогена (процент 2-НМWK/сНМWK) в плазме, собранной в пробирки SCAT169, здоровых индивидов из разных клинических центров. Группировка измерительных точек соответствует, слева направо: центр 1: коммерческий продавец, центр 4, центр 5 и центры 4 и 5;

на фиг. 4 - график, демонстрирующий расщепление кининогена (процент 2-НМWK/сНМWK) у здоровых пациентов по сравнению с пациентами с НАЕ I или II типа, НАЕ nC1-INH и идиопатическим ангионевротическим отеком (АЕ). Группировка измерительных точек соответствует, слева направо: здоровые индивиды, базальный НАЕ I/II, атака НАЕ I/II, базальный НАЕ (nC1-INH), атака НАЕ (nC1-INH), базальный (уровень) идиопатического АЕ и атака идиопатического АЕ;

на фиг. 5 представлен график, показывающий уровни 2-цепочечного НМWK в плазме здоровых индивидов и больных НАЕ. А: показывает уровни 2-цепочечных НМWK в процентах в плазме здоровых индивидов. Как показано на графике, в клиническом центре С не применялось удаление первичной пробирки перед сбором плазмы SCAT169. В: показывает уровень 2-цепочечного НМWK в процентах в плазме больных НАЕ.

### Подробное описание изобретения

Настоящее описание основано, по меньшей мере отчасти, на разработке вакуумных пробирок для сбора крови, содержащих коктейли ингибиторов протеазы, которые предотвращают активацию контактной системы. Чтобы точно оценить эндогенный уровень активации контактной системы у пациента или здорового добровольца, важно, чтобы кровь была осторожно собрана и обработана. Можно принять одну или несколько следующих мер предосторожностей, чтобы получить точную оценку характеристик, связанных с контактной системой, как описано в настоящем документе:

(i) предпочтительно, чтобы вакуумные пробирки для сбора крови, которые были описаны в настоящем документе, не были первичной пробиркой, заполненной кровью, в которой можно наблюдать повышенную активацию контактной системы из-за местной травмы после прокола сосуда иглой;

(ii) кровь не должна соприкасаться со стеклом (используйте пластиковые пробирки или катетеры);

(iii) кровь должна быть обработана с получением плазмы в течение короткого периода времени (на-

пример, приблизительно 1 ч) после сбора; и/или

(iv) применение ингибиторов протеазы в пробирке для сбора должно стабилизировать плазму против активации контактной системы *ex vivo*, которая препятствует точному определению эндогенного состояния пациента.

Преимущества описанных в настоящем документе вакуумных пробирок для сбора крови включают по меньшей мере: (1) использование вакуумных не стеклянных (например, пластиковых) пробирок для стандартизованного и упрощенного сбора крови; (2) использование жидкого состава, содержащего коктейли ингибиторов протеазы для максимального уменьшения гидролиза; (3) необязательное отсутствие ингибиторов протеазы, которые нестабильны в водных растворах (например, РРАСК II, также известен H-D-Phe-Phe-Arg-хлорметилкетон); и (4) введение, в некоторых вариантах осуществления, ингибитора калликреина плазмы, такого как EPI-KAL2 (может быть биотинилирован), что позволяет пробиркам содержать реагент, который обеспечивает обнаружение активированного калликреина плазмы, используя иммуноанализ. См., например, WO 95/21601, соответствующие описания которого включены в настоящий документ в качестве ссылки.

Неожиданным наблюдением в этом исследовании был тот факт, что использование коктейля ингибиторов протеазы в жидкой форме предотвращало или уменьшало гемолиз. Если кровь собирали в вакуумные пробирки, содержащие лиофилизированный препарат ингибиторов протеазы, то она в значительной степени гемолизировалась, что может влиять на измерения некоторых анализов. Однако, если кровь собирали в вакуумную пробирку, содержащую раствор смеси тех же ингибиторов протеазы, то она не гемолизировалась.

Следовательно, измерения, направленные на оценку степени активации контактной системы в образцах плазмы, полученных при обработке образцов крови, собранных в вакуумные пробирки, описанные в настоящем документе, давали более точные уровни оценки пациентов с различными заболеваниями. Получение точной оценки активации контактной системы может позволить идентифицировать заболевания или подгруппы пациентов с различными заболеваниями, которые возможно опосредованы этим путем и, следовательно, можно лечить ингибитором контактной системы.

Кроме того, использование вакуумных пробирок для сбора крови, описанных в настоящем документе, может способствовать точному определению уровней лекарственного средства и/или оценке иммуногенности терапевтической молекулы, направленной против активированных форм белков в контактной системе (например, плазменный калликреин, FXIIa и 2-цепочечный кининоген). Пробирки могут дать аналогичное преимущество для терапевтических молекул, нацеленных на активированные белки в последующем пути активации контактной системы, для которых не требуется кальций для получения активированной мишени (например, FXIa и FIXa). Преимущество этих пробирок в основном применимо к биологическим терапевтическим молекулам, поскольку используемые анализы ПК и анализы иммуногенности обычно являются иммуноанализами, в которых распознается сайт связывания (например, идиотип, в случае терапевтического антитела). Если терапевтическая цель активирована *ex vivo*, то она может связаться с биологическим агентом плазмы и тем самым препятствовать обнаружению в иммуноанализах ПК и иммуногенности. Ингибиторы протеаз в пробирке могут предотвратить активацию цели. Применение жидкого состава предотвращает гемолиз, который может оказывать влияние в некоторых лабораторных анализах.

Вакуумные пробирки для забора крови, содержащие коктейль ингибиторов протеазы в жидком составе.

Вакуумные пробирки для сбора крови обычно используют в медицинской практике для сбор образцов крови для различных применений. Пробирки, описанные в настоящем документе, могут быть не стеклянными пробирками, содержащими жидкий состав, который содержит смесь ингибиторов протеазы (коктейль ингибиторов протеазы). В некоторых вариантах осуществления коктейль ингибиторов протеазы может включать по меньшей мере один ингибитор сериновой протеазы и по меньшей мере один ингибитор цистеиновой протеазы. По меньшей мере один ингибитор сериновой протеазы может быть ингибитором калликреина плазмы. Такие коктейли ингибиторов протеазы могут содержать многочисленные (например, 2, 3, 4 или 5) ингибиторы сериновой протеазы, по меньшей мере один из которых может быть ингибитором трипсина или плазмина человека. Предпочтительно, описанные в настоящем документе коктейли ингибиторов протеазы по существу свободны от ингибитора протеазы, который нестабилен в водном растворе, то есть активность ингибитора протеазы, который нестабилен в водном растворе, является несущественной по сравнению с общей ингибирующей активностью протеазного коктейля. В некоторых случаях количество ингибитора протеазы, который нестабилен в водном растворе, может быть меньше 5% (мас./мас.) от общего количества ингибиторов протеазы в коктейле, например, менее 2%, менее 1% или менее 0,5%. В некоторых случаях коктейль ингибиторов протеазы полностью свободен от ингибитора протеазы, который нестабилен в водном растворе (например, в водном растворе с pH 4-6). Одним из примеров ингибитора протеазы, который нестабилен в водном растворе, является РРАСК II, также известный как H-D-Phe-Phe-Arg-хлорметилкетон.

В табл. 1 ниже приведены примеры ингибиторов сериновой протеазы, ингибиторов цистеиновой протеазы и ингибиторов трипсиновой протеазы, которые можно использовать для получения описанных

## в настоящем документе коктейлей ингибиторов протеазы

Категории	Примеры ингибиторов
Ингибиторы сериновых протеаз	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Бензамидин</li> <li>* 4- (2-аминоэтил) бензолсульфонил фторид гидрохлорид (АЕBSF) ;</li> <li>** Химостатин;</li> <li>* N альфа-Тозил-Lys Хлорметил Кетон (TLCK) ;</li> <li>* Tos-Phe-CH<sub>2</sub>Cl; N-p-Тозил-L-фенилаланин хлорметил кетон (TPCK)</li> <li>* 1- ( (6R, 7S) -3- [ (ацетилокси) метил] -7-метокси-5, 5-диоксидо-8-оксо-5-тиа-1-азабицикло [4.2.0] окт-2-ен-2-ил) карбонил) -L-пролин</li> <li>* Патамостат мезилат;</li> <li>* Габексат мезилат;</li> <li>* Msaарvck (Meosuc-aарv-смk; MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-СМК)</li> <li>* Нафамостат мезилат;</li> <li>* Росмариновая кислота;</li> <li>* Пурпурогаллин;</li> <li>* 2- (4- ( (1-Ацетимидоил-3-пирролидинил) окси) фенил) -3- (7-амидино-2-нафтил) пропионовой кислоты гидрохлорид пентагидрат</li> <li>* 4- (4-Бромфенилсульфонилкарбомаил) бензоил-L-валил-L-пролин-1 (RS) - (1-трифторацетил-2-метилпролил) амид</li> <li>* L-658758; CHEMBL446371; L 658758</li> <li>* Сивелестат;</li> <li>* Патамостат;</li> <li>* Холестерин сульфат;</li> <li>* Ингибитор эластазы III;</li> <li>* Габексат;</li> <li>* 4', 6-Диамидино-2-фенилиндол;</li> <li>* 4-аминобензамидин;</li> <li>* 3, 4-дихлоризокумарин;</li> <li>* Бивалирудина Трихлорацетат</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Прадакса;</li> <li>* ГИРУДИН;</li> <li>* Ксимелагатран;</li> <li>* Лепирудин; Рефлудан; Нbw 023</li> <li>* Бивалирудин;</li> <li>* Летаксабан;</li> <li>* Эрибаксабан;</li> <li>* Дабигатран этексилат мезилат;</li> <li>* Апиксабан;</li> <li>* Танексабан;</li> <li>* Ривароксабан; Ксарелто; 366789-02-8</li> <li>* Ингибиторы калликреина плазмы, такие как EPL-KAL2, DX-88, DX-2930 и тому подобное</li> <li>Следующие примеры представляют собой ингибиторы трипсина и/или плазмينا человека:</li> <li>* Ингибитор трипсина сои</li> <li>* 4- (2-аминоэтил) бензолсульфонилфторид</li> <li>* 4-аминобензамидин</li> <li>* альфа 1-Антитрипсин</li> <li>* Апротинин</li> <li>* Камостат</li> <li>* Эко-белок (E coli)</li> <li>* интер-альфа-ингибитор</li> <li>* Нафамостат</li> <li>* NCO 650</li> <li>* Овомуцин</li> <li>* Соматомедин В</li> <li>* Ингибитор трипсина (Bowman-Birk, соя)</li> <li>* Ингибитор трипсина (Kunitz, соя)</li> <li>* Уринастатин</li> </ul>
Ингибитор цистеиново й протеазы	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Гельданамицин; 30562-34-6; AKOS022185390</li> <li>* Кальпастатин;</li> <li>* L-пролин, N- [[ (2S, 3S) -3- [ (пропиламино) карбонил] -2-оксиранил] карбонил] -L-изолейцил-;</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Ингибитор протеазы I;</li> <li>* (L-3-транс- (Пропилкарбамоил) оксиран-2-карбонил) -L-изолейцил-L-пролин;</li> <li>* Ингибитор кальпаина III;</li> <li>* [L-3-транс- (Пропилкарбамоил) оксиран-2-карбонил] -L-изолейцил-L-пролин;</li> <li>* Омуралид;</li> <li>* (S) -MG132;</li> <li>* Лактацистин;</li> <li>* Z-Phe-ala-диазометан;</li> <li>* Лейпептин;</li> <li>* 4-Гидроксиноненал;</li> <li>* транс-Эпоксисукцинил-L-лейциламида (4-гуанидино) бутан;</li> <li>* Локсистатин;</li> <li>* Класто-лактацистинбета-лактон;</li> <li>* L-Пролин,</li> <li>* Z-FA-FMK;</li> <li>* N-ацетиллейцил-лейцил-метионинал; (?)</li> <li>* нитроаспирин;</li> <li>* Аллнал;</li> <li>* Алоксистатин;</li> <li>* этил 3- ( (4-метил-1- [ (3-метилбутил) амино] -1-оксопентан-2-ил) карбамоил) оксиран-2-карбоксилат;</li> <li>* (+/-) 4-ГИДРОКСИНОН-2-ЕНАЛ;</li> </ul>
--	---

В некоторых примерах коктейль ингибиторов протеазы для использования в получении вакуумной пробирки для забора крови содержит по меньшей мере один ингибитор сериновой протеазы (например, 1, 2 или 3), который может включать по меньшей мере один ингибитор трипсина/плазмина (например, 1, 2 или 3) и по меньшей мере один ингибитор цистеиновой протеазы (например, 1, 2 или 3). Такой коктейль ингибиторов протеазы может включать три ингибитора сериновой протеазы (например, бензамидин, AEBSF и ингибитор трипсина/плазмина, такой как ингибитор трипсина сои) и один ингибитор цистеиновой протеазы (например, лейпептин).

В других примерах коктейль ингибиторов протеазы может содержать по меньшей мере один ингибитор сериновой протеазы (например, ингибитор калликреина плазмы) и по меньшей мере один ингибитор цистеиновой протеазы (например, лейпептин).

Ингибитором калликреина плазмы может быть EPI-KAL2 (Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp; SEQ ID NO: 1), который представляет собой специфический калликреин плазмы, рекомбинантный ингибитор протеазы, благодаря которому пробирки могут содержать реагент, который позволяет обнаруживать активированный калликреин плазмы, используя, например, иммуноанализы.

Любой из коктейлей ингибиторов протеазы может быть растворен в подходящем растворе с образованием жидкого состава. Подходящим раствором может быть раствор кислота-цитрат-декстроза, который может содержать цитрат тринатрия, лимонную кислоту и декстрозу. Раствор может иметь pH, равный приблизительно 4-6, 4-5, 4,5-5,0 или 4,2-4,7, например 4,5. В некоторых вариантах осуществления раствор имеет значение pH, равное приблизительно 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9 или 6,0. В некоторых вариантах осуществления раствор имеет значение pH, равное приблизительно 4,5. Жидкий состав может дополнительно содержать катионный полимер, такой как молекула гексаметил бромид (полибрен®), который может уменьшать активацию контактной системы путем взаимодействия с отрицательно заряженными поверхностями, и хелатирующий агент (например, ЭДТА), который может ингибировать металлопротеазы.

Концентрация каждого ингибитора протеазы в коктейле может быть в 5× или 10× раз больше конечной концентрации такого ингибитора для использования в ингибировании соответствующей протеазы в зависимости от кратности разведения на практике. Конечная концентрация специфического ком-

мерческого ингибитора протеазы известна в данной области и может быть получена по протоколу изготовителя. В некоторых примерах концентрация EPI-KAL2 может изменяться от 5-15 мкМ (например, 5-10, 7-12 мкМ или 10-15 мкМ). В некоторых вариантах осуществления концентрация EPI-KAL2 составляет приблизительно 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или около 15 мкМ. В некоторых примерах концентрация лейпептина может составлять от 200 до 300 мкМ (например, 200-250, 240-270 или 250-300 мкМ). В некоторых вариантах осуществления концентрация лейпептина составляет около 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или около 300 мкМ. В некоторых примерах концентрация трипсинового ингибитора сои может изменяться от 1 до 3 мг/мл (например, 1-2 или 2-3 мг/мл). В некоторых вариантах осуществления концентрация трипсинового ингибитора сои составляет около 1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или около 3,0 мг/мл. В некоторых примерах концентрация бензамидина может изменяться от 80 до 120 мМ (например, 80-100 или 100-120 мМ). В некоторых вариантах осуществления концентрация бензамидина составляет около 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 или около 120 мМ. В некоторых примерах концентрация AEBSF может составлять от 10 до 30 мМ (например, 10-20 или 20-30 мМ). В некоторых вариантах осуществления концентрация AEBSF составляет приблизительно 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, или около 30 мМ.

Если используется пептидный ингибитор протеазы (например, EPI-KAL2), то он может быть биотинилирован в соответствии с обычной методикой. Например, пептидный ингибитор может быть биотинилирован следующим образом. Кратко, пептидный ингибитор можно растворить в подходящем растворе, таком как забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS). Свежеприготовленный Sulfo-NHS-LC-Биотин может быть добавлен к раствору пептидного ингибитора и инкубирован на льду в течение подходящего периода времени. Избыток непрореагировавшего и гидролизованного биотина можно удалить, используя колонку для обессоливания белковых растворов. Мечение пептидного ингибитора может быть подтверждено с помощью ELISA, а концентрация белка может быть определена, например, анализом Брэдфорда.

Любые жидкие составы, описанные в документе, могут быть получены обычными способами, например растворением соответствующих компонентов в подходящем растворе и помещением в вакуумные пробирки для забора крови, которые предпочтительно не являются стеклянными. Пробирки можно хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$  и можно оттаивать на льду или при температуре охлаждения (например, приблизительно  $4^{\circ}\text{C}$ ), например в холодильнике, в течение подходящего периода времени перед использованием.

Применение вакуумных пробирок для забора крови, содержащих коктейли ингибиторов протеазы в жидкой форме.

Любая вакуумная пробирка для забора крови, описанная в настоящем документе, может быть использована для сбора образцов крови у индивидов для использования в анализе эндогенных признаков, связанных с контактной системой, включая, но не ограничиваясь ими, уровень активации контактной системы, уровень лекарственного средства, которое нацелено на компонент контактной системы, в сыроворотке и/или иммуногенность такого лекарственного средства. Для уменьшения активации контактной системы *ex vivo* (например, при местной травме после прокола сосуда иглой), вакуумная пробирка для забора крови, описанная в настоящем описании, может быть не первичной пробиркой, заполненной кровью, при взятии крови у индивида. Например, первая порция крови индивида может быть собрана в первичную пробирку, которую можно удалить, а затем для сбора последующих образцов крови, которые могут быть использованы для анализа, используют вакуумные пробирки для забора крови. Первичной пробиркой может быть обычная пробирка для сбора крови, используемая в обычной практике.

После сбора крови образцы крови могут быть обработаны с получением образцов плазмы в течение подходящего периода времени (например, не более часа). Образцы плазмы можно в дальнейшем анализировать для оценки признаков, связанных с контактной системой индивида, у которого был взят первичный образец крови.

Образцы крови могут быть собраны у индивида, при необходимости анализе, как описано в настоящем документе. В некоторых случаях индивидом является пациент, у которого может быть заболевание, связанное с контактной системой, у которого подозревают или у которого есть риск развития этого заболевания. Например, у пациента ранее могли иметься случаи НАЕ или у него может быть риск развития НАЕ. У пациента может быть НАЕ типа I или типа II, либо с дефицитом C1-INH или с продукцией атипичного C1-INH. Альтернативно, у пациента может быть НАЕ типа III, который не связан с дефицитом C1-INH. В других примерах у пациента ранее имелись случаи идиопатического ангионевротического отека, или он может быть подвержен риску возникновения идиопатического ангионевротического отека. Такой пациент мог ранее получать лечение или теперь получает лечение препаратом, который нацелен на компонент контактной системы (например, рKaI или FXIIa или высокомолекулярный кининоген).

i. Оценка эндогенного уровня активации контактной системы.

В одном из аспектов образцы плазмы, указанные в настоящем описании, могут быть проанализированы на эндогенный уровень активации контактной системы индивида, которым может быть пациент, страдающий заболеванием, связанным с контактной системой (например, с НАЕ или идиопатическим невротическим отеком), у которого подозревают или имеется риск развития этого заболевания. У такого пациента может проводиться лечение заболевания, например лечение с применением ингибитора

pKал (например, анти-pKал антитела). В других случаях такой пациент может не получать такого лечения. Альтернативно, пациент может быть здоровым индивидом, не имеющим таких заболеваний.

Уровень активации контактной системы в образце плазмы можно определить путем измерения одного или нескольких биомаркеров, указывающих на активацию контактной системы.

Калликреин плазмы (pKал) является основным продуцирующим брадикинин ферментом в кровотоке. Активация pKал может происходить через контактную систему или через фактор XIIa, оба связаны с патологией, связанной с наследственным ангионевротическим отеком (НАЕ). Калликреин плазмы циркулирует как неактивный зимоген, называемый прекалликреин, который в основном связывается со своим субстратом, высокомолекулярным кининогеном (HMWK). В ответ на раздражение прекалликреин расщепляется с образованием активного калликреина плазмы. Такая активация калликреина может быть опосредована, например, фактором XIIa после активации FXII до FXIIa или эффектором контактного каскада. Примерно 75-90% циркулирующего прекалликреина связано с HMWK посредством взаимодействия с неактивным сайтом с доменом 6 HMWK, который гидролизует дополнительные молекулы HMWK с образованием расщепленного HMWK и брадикинина. Активный калликреин плазмы расщепляет HMWK на двух сайтах, что приводит к высвобождению брадикинина, ключевого медиатора боли, воспаления, отека и ангиогенеза. Другие продукты расщепления, расщепленный кининоген, содержит аминокислотные цепи, связанные вместе посредством дисульфидного мостика. Cugno et al., Blood (1997) 89:3213-3218.

Примеры биомаркеров, которые можно использовать для оценки уровня активации контактной системы в образце крови пациента (таким образом определяя, имеется ли у пациента повышенный уровень и/или активность контактной системы, например, повышенный уровень pKал), представлены в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Контактная система биомаркеров

Биомаркер	Анализ	Базовый уровень у пациента с НАЕ относительно нормального	Δ указание или при остром отеке
Прекалликреин	ELISA или анализ ферментативной активности	Не изменен (~500 нМ) или немного понижен	Дальнейшее снижение
Активный pKал	ELISA или ферментативной активности	Не изменен или немного повышен	Повышен
комплекс α2M-pKал	ELISA	Повышен, если приступ был недавно	Повышен
Комплекс C1INH-pKал	ELISA	Повышен, если приступ был недавно	Повышен
FXIIa	ELISA или ферментативной активности	Неизменен или немного повышен	Повышен
FXIa	ELISA или ферментативной активности	Не изменен или немного повышен	Повышен
Интактный HMWK	ELISA	Не изменен или немного понижен	Понижен
Расщепленный HMWK	ELISA	Не изменен или немного повышен	Повышен
Метаболит брадикинина	ELISA или LC-MS	Не изменен или немного повышен	Повышен

Один или несколько биомаркеров, указывающих на активацию контактной системы, могут быть проанализированы с использованием стандартных методов. Одним особенно подходящим типом анализа для обнаружения, качественно, полуколичественно или количественно, является иммуноанализ. Имму-

ноанализ представляет собой любой анализ, при котором молекула-мишень (например, молекула биомаркера, связанная с активацией контактной системы) обнаруживается и/или количественно определяется с помощью связывающего агента, как описано в настоящем документе, который специфически связывается с молекулой-мишенью. Связывающим агентом может быть антитело, которое может быть полно-размерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. Иммуноанализ может быть конкурентным или неконкурентным иммуноанализом и может быть гомогенным или гетерогенным иммуноанализом. Например, иммуноанализом для обнаружения биомаркера контактной системы может быть иммуноферментный анализ (EIA), радиоиммуноанализ (RIA), фтороиммунологический анализ (FIA), хемилюминесцентный иммуноанализ (CLIA), иммуноанализ с подсчетом частиц (CIA), количественный иммуноферментный анализ (IEMA), ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA), иммуноанализ с боковым потоком, сэндвич-иммуноанализ, иммуно-ПЦР-анализ, метод близкого лигирования, анализ вестерн-блоттинга или иммунопреципитационный анализ. Дополнительные подходящие иммуноанализы для обнаружения биомаркера, представленные в настоящем документе, будут очевидны специалистам в данной области. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что настоящее описание, тем не менее, не ограничивается иммунологическими анализами и что анализы обнаружения, которые не основаны на антителе или фрагменте антигенсвязывающего антитела, такие как масс-спектрометрия, также эффективны для обнаружения и/или количественного определения биомаркеров контактной системы, как предлагается в настоящем документе.

Тип анализа обнаружения, используемый для обнаружения и/или количественного определения биомаркера контактной системы, такого как предложено в настоящем документе, будет зависеть от конкретной ситуации, в которой должен быть использован анализ (например, клиническое или исследовательское использование), и от вида и количества обнаруживаемых биомаркеров, а также типа и количества проб пациентов, проводимых параллельно, чтобы обозначить несколько параметров. Например, повышенные уровни расщепленного кининогена (2-цепочечного кининогена) можно обнаружить в образцах плазмы, собранных у пациентов с НАЕ или у здоровых индивидов во время острого НАЕ, используя Вестерн-блот-анализ. Несмотря на то что Вестерн-блот-анализы позволяют проводить одновременный анализ биомаркеров контактной системы во множестве образцов, они ограничены количеством биомаркеров, которые могут быть оценены параллельно. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления, если в одном образце или в нескольких образцах анализируют множество биомаркеров контактной системы, приведенных в настоящем документе, то предпочтительными являются анализы, подходящие для такого множественного анализа. Примеры таких анализов включают, без ограничения, пептидные микрочипы и лабораторные анализы на основе чипов, которые были разработаны для получения высокой пропускной способности, мультиплексные альтернативы для менее масштабных иммуноанализов, например, Вестерн-блоты.

В некоторых примерах образец плазмы можно помещать в мультилуночный микропланшет в присутствии или в отсутствие ингибитора pK<sub>1</sub> и/или активатора контактной системы. Смесь можно инкубировать на льду в присутствии меченого пептидного субстрата pK<sub>1</sub> в течение подходящего периода времени (например, 2 мин), и для остановки реакции активации в смесь можно добавить ингибитор трипсина кукурузы (СТП). Смесь можно развести, если необходимо, и протеолитическая активность можно определить путем измерения уровня флуоресцентного пептидного субстрата. Полученные результаты такого анализа могут быть основаны на определении эндогенного уровня активации контактной системы индивида, у которого взят образец плазмы. Их также можно использовать для определения ингибирующей активности ингибитора pK<sub>1</sub>, если его используют.

ii. Оценка эндогенных уровней лекарственных средств, нацеленных на контактную систему.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению вакуумной пробирки для забора крови, описанной в настоящем документе, для определения уровней лекарственного средства, нацеленного на компонент контактной системы. Уровни лекарственных средств необходимы для оценки фармакокинетических параметров. Например, если контактная система активирована *ex vivo* в образцах плазмы, собранных для определения количества ингибитора калликреина плазмы (например, DX-2930) в плазме, тогда избыточный активированный калликреин плазмы может связываться с лекарственным средством и тем самым защищать его обнаружение в анализе. Любая из вакуумных пробирок для забора крови, описанных в настоящем документе, может использоваться для более точной оценки уровней лекарственного средства, например в образце, собранном у индивида.

Для осуществления этого способа на практике образцы плазмы, полученные у индивида (например, человека), получающего лекарственное средство, которое направлено на компонент контактной системы (например, pK<sub>1</sub>), могут быть получены из образцов крови, собранных в вакуумные пробирки для забора крови, описанные в настоящем документе, следуя описанным в настоящем документе способам. Уровень лекарственного средства в образце плазмы можно измерить в соответствии с обычной практикой. В некоторых случаях уровень лекарственного средства можно измерить с помощью иммуноанализа, например, описанных в настоящем документе.

iii. Оценка иммуногенности лекарственного средства, нацеленного на контактную систему.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к применению вакуумной

пробирки для забора крови для определения иммуногенности биологического ингибитора против компонента контактной системы (например, рКaI). Например, обычная практика заключается в разработке анализов иммуногенности, которые способны измерять антитела против лекарственного средства ("ADA") в присутствии избыточного лекарственного средства в плазме кровотока. Такая необходимость в анализе иммуногенности, который может измерять ADA, конечно относится к терапевтическим моноклональным антителам, у которых могут быть многонедельные периоды полувыведения и высокие уровни лекарственного средства в кровотоке. Чтобы преодолеть влияние избыточного лекарственного средства в образце, применяют способы отделения антител против лекарственных средств от лекарственного средства. Такие антитела против лекарственного препарата могут быть выделены путем твердофазной экстракции и кислотной диссоциации (SPEAD), которая включает инкубацию биотинилированной формы лекарственного средства с образцом плазмы в течение длительного периода времени (обычно в течение ночи) с последующим выделением биотинилированного лекарственного средства, которое может быть связано антителами против лекарственного средства, используя планшет, покрытый стрептавидином. Планшет затем обрабатывают кислотой для высвобождения антитела против лекарственного средства. Высвобожденные антитела можно нанести непосредственно на другой аналитический планшет для обнаружения. В отсутствие ингибиторов протеазы в пробирках для сбора контактная система может активироваться *ex vivo*, что приводит к продукции активного калликреина плазмы. После указанных выше стадий кислотного высвобождения и повторного нанесения, и активный рКaI и антитела против лекарственного средства будут связываться с поверхностью планшета. Антитело против лекарственного средства обычно обнаруживают с помощью меченого лекарственного средства, которое также может связываться с активным рКaI, если он присутствует, что приводит к ложноположительному сигналу в анализе ADA.

Использование вакуумных пробирок для забора крови, которые содержат описанные в настоящем документе коктейли ингибиторов протеазы, может предотвратить этот ложноположительный сигнал.

Общие методики.

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

Не вдаваясь в подробности, полагают, что специалист в данной области может на основе вышеприведенного описания применить настоящее изобретение в полной мере. Следовательно, следующие конкретные варианты осуществления должны быть истолкованы как просто иллюстративные, а не ограничивающие оставшуюся часть описания каким-либо образом. Все публикации, цитируемые в настоящем документе, включены в качестве ссылок для целей или предмета, указанных в настоящем документе.

Пример 1. Получение коктейлей ингибиторов протеазы, которые предотвращают активацию контактной системы.

Коктейли ингибиторов протеазы, которые препятствуют активации контактной системы.

Вакуумные пластиковые пробирки использовали для стандартизированного и упрощенного сбора крови.

Следующие два коктейля ингибиторов протеазы использовали в жидком составе для предотвращения гидролиза:

1) 10× коктейль ингибиторов протеазы А: SCAT169.

Вакуумные пластиковые пробирки, общим объемом 5 мл, содержащие (0,5 мл): 100 мМ бензамидина, 400 мкг/мл полибрена, 2 мкг/мл ингибитора трипсина сои, 20 мМ ЭДТА, 263 мкМ лейпептина и 20 мМ АЕBSF (4-(2-аминоэтил)бензолсульфонил фторид гидрохлорид), растворенных в смеси кислота-цитрат-декстроза (100 мМ цитрат тринатрия, 67 мМ лимонная кислота и 2% декстроза, pH 4,5).

2) 10× коктейль ингибиторов протеазы В: SCAT153.

Вакуумные пластиковые пробирки, общим объемом 5 мл, содержащие (0,5 мл): 10 мкМ биотинированного EPI-KAL2, 400 мкг/мл полибрена, 20 мМ ЭДТА и 2 63 мкМ лейпептина, растворенные в смеси

кислота-цитрат-декстроза (100 мМ цитрат тринатрия, 67 мМ лимонная кислота и 2% декстроза, рН 4,5).

В коктейль ингибиторов протеазы В (SCAT153) вводили биотинилированный EPI-KAL2. SCAT169 (специализированные пробирки для исследования коагуляции, состав 169) и SCAT153 (специализированные пробирки для исследования коагуляции, состав 153) хранили при температуре 2-8°C.

Пример 2. Пробирки SCAT169 и SCAT153 предотвращают активацию контактной системы, как показано в 2-цепочечном Вестерн-блот-анализе.

Плазма, собранная в пробирки SCAT169 или SCAT153, блокировала активацию контактной системы *ex vivo*, вызванную добавлением эллаговой кислоты (фиг. 1), известного активатора контактной системы, как измерено по превращению 1-цепочечного в 2-цепочечный НМВК с помощью Вестерн-блот-анализа.

Наблюдаемую активацию контактной системы, вызванной эллаговой кислотой, сравнивали в образцах плазмы, собранных в 3 разных пробирках для сбора крови: пробирки с цитратом натрия (стандартные пробирки, используемые в лабораториях клинической химии для измерения коагуляции), пробирки SCAT169 и пробирки SCAT153.

1-цепочечный НМВК по существу полностью преобразовывался в образцах, активированных эллаговой кислотой в пробирках с цитратом натрия, и обнаруживали появление 2-цепочечного НМВК.

Напротив, 1-цепочечный НМВК сохранялся в плазме, активированной эллаговой кислотой, в пробирках SCAT169 и SCAT153.

Эти результаты свидетельствуют о том, что пробирки SCAT169 и SCAT153 эффективны для предотвращения активации контактной системы *ex vivo*, которая может возникать во время сбора и обработки образцов плазмы.

Пример 3. Коктейли ингибиторов протеазы SCAT169 и SCAT153 повышали время свертывания в плазме.

Время свертывания в плазме измеряли в образцах, обработанных в 3 разных пробирках для сбора крови: пробирки с цитратом натрия, пробирки SCAT169 и пробирки SCAT153, для трех отдельных образцов доноров (табл. 1).

Как показано на протромбиновом и активированном частичном тромбопластиновом времени, время свертывания повышалось в образцах с SCAT159 и SCAT153 по сравнению с цитратом натрия. Результаты приведены в табл. 3 ниже.

Таблица 3. Эффект ингибиторов протеазы на время свертывания в плазме

Номер донора:	Протромбиновое время (с)			Активированное частичное тромбопластиновое время (с)		
	Цитрат	SCAT169	SCAT 153	Цитрат	SCAT169	SCAT 153
1	12,4	214,55	55,3	42,8	> 240	> 240
2	12,8	159,6	27,85	37,6	> 240	> 240
3	11,4	>300	87,1	34,6	> 240	> 240

Пример 4. Использование вакуумных пробирок для сбора крови для эндогенных уровней активации контактной системы у индивидов.

Изучение биомаркеров активации контактной системы в плазме затруднено непреднамеренной активацией во время сбора и обработки крови. В этом исследовании применение специализированных пробирок для сбора крови (SCAT159 и SCAT153) для оценки уровней расщепленного высокомолекулярного кининогена (сНМВК) в плазме у здоровых индивидов и пациентов с наследственным ангионевротическим отеком I/II типа (НАЕ), идиопатического ангионевротического отека или НАЕ с нормальным C1-INH (НАЕсC1, также называемым nC1-INH) анализировали следующим образом.

Чтобы избежать искусственной активации контактного пути во время взятия образцов крови, в исследовании применяли стандартизированные методы сбора крови и обычно используемые пробирки, содержащие ингибиторы протеазы. Образцы крови собирали у здоровых индивидов и индивидов с заболеванием, как указано выше (во время периода затухания и вспышки заболевания) для оценки процента сНМВК, используя Вестерн-блот-анализ. Образцы крови помещали в пробирки SCAT159 или SCAT153 (общий объем 5 мл, 0,5 мл 10× коктейля ингибиторов протеазы), используя катетер с игольчатой системой типа бабочки. Затем образцы крови обрабатывали с получением образцов плазмы в течение 1 ч после сбора крови.

Образцы плазмы в пробирке SCAT анализировали с помощью Simple Western (SBHD) и Вестерн-блоттинга (TGA) для определения уровня расщепленного кининогена (2-цепочечного кининогена) в образцах плазмы, следуя способам, описанным, например, в публикации WO 2015/061183.

Плазму собирали у здоровых индивидов в клинических центрах 1-5 в пластиковые пробирки для сбора, содержащие различные антикоагулянты, ингибиторы протеазы или стабилизаторы белка перед их обработкой в плазму. В частности, пробирки были типа K<sub>2</sub>ЭДТА, цитрата натрия, SCAT169 или P100

(BD Biosciences). Как показано на фиг. 2, пробирки, которые, как было обнаружено, предельно снижают активацию контактной системы *ex vivo*, содержали ингибиторы протеазы и были либо пробирками P100, либо пробирками SCAT169, которые представляли собой вакуумные пластиковые пробирки для сбора крови, объемом 5 мл, содержащие 0,5 мл 10× концентрированной смеси 100 мМ бензамидина, 400 мкг/мл полибрена, 2 мг/мл ингибитора трипсина сои, 20 мМ ЭДТА, 263 мкМ лейпептина и 20 мМ АЕBSF, растворенные в смеси кислота-цитрат-декстроза (100 мМ цитрат тринатрия, 67 мМ лимонная кислота и 2% декстроза, pH 4,5). Способы сбора с использованием пробирок, содержащих коктейли ингибиторов протеазы, предотвращающие повышение сНМWK, при анализе плазмы здоровых доноров.

Результаты, полученные в этом исследовании, показали, что у здоровых индивидов уровни сНМWK были стабильными (<5%) при комнатной температуре (RT) в течение по меньшей мере 24 ч после сбора крови в обычно используемые пробирки, но уровни сНМWK были повышены (12%) в образцах плазмы, полученных от коммерческого поставщика, что свидетельствует о важности оптимизации методик сбора крови при исследовании активации контактного пути.

Также оценивали эффекты расщепления кининогена в плазме, собранной в пробирки SCAT169 у здоровых индивидов в двух разных клинических центрах (центры 4 и 5) и у коммерческого поставщика (центр 1) (фиг. 3). Коммерческий поставщик собирал образцы крови непосредственно в пробирки SCAT169, не удаляя первую пробирку.

Расщепление кининогена также оценивали в образцах крови, собранных в пробирки SCAT169 у индивидов с типом ангионевротического отека (тип I/II НАЕ, nC1-INH НАЕ и идиопатическим АЕ). Плазму собирали у здоровых индивидов или индивидов с различными типами ангионевротического отека как в состоянии покоя (базовое), так и во время атаки (атака) для измерения количества сНМWK при различных заболеваниях. Процентное соотношение сНМWK было явно повышено на базовом уровне у пациентов с НАЕ (n=21) по сравнению с контролями со здоровыми индивидами (n=26), но не в плазме у пациентов с идиопатическим ангионевротическим отеком (n=4) или НАЕnC1 (n=5) (фиг. 4), что указывает на ограниченную активность калликреина в плазме, хотя и не исключает роли активации контактного пути во время острых приступов при этих заболеваниях.

Плазма, оцениваемая для обнаружения сНМWK, чувствительная к активации контактной системы, стимулируемой способами сбора и пробирками. В целом, это исследование обеспечивает улучшенный способ сбора образцов плазмы для оценки активации контактной системы, что предотвращает расщепление НМWK *ex vivo*.

Пример 5. Использование вакуумных пробирок для сбора крови для эндогенных уровней активации контактной системы у индивидов.

Специализированные трубки для сбора крови (SCAT159 и SCAT153) оценивали на эффективность для оценки уровней расщепленного высокомолекулярного кининогена (сНМWK) в плазме у здоровых индивидов и пациентов с наследственным ангионевротическим отеком типа I/II типа (НАЕ).

Коротко, образцы крови собирали у здоровых индивидов и у пациентов с НАЕ, во время периодов затухания (базальный) и вспышки (атаки) заболевания. Процент 2-цепочечного НМWK в плазме обнаруживали с помощью Вестерн-блот-анализа. Образцы плазмы собирали в двойном слепом исследовании фазы 1b на рандомизированных пациентах с НАЕ типа I/II из разных центров, которые получали 2 подкожные дозы анти-rKal-антитела (DX-2930) в 0-й и 15-й дни в близких группах 30, 100, 300 или 400 мг или плацебо. Образцы крови получали до и после введения анти-rKal-антитела (DX-2930) в 1-, 8-, 22-, 64-, 92- и 120-й дни.

Как показано на фиг. 5A, процент уровней 2-цепочечного НМWK в плазме в образцах здоровых индивидов, собранных в трех разных клинических центрах (А, В и С), изменялся в зависимости от способа сбора и типа используемой пробирки. Образцы с использованием пробирок из натрия цитрата имели более высокие уровни 2-цепочечного НМWK по сравнению с образцами в пробирках SCAT169. Примечательно, что образцы, собранные в клиническом центре С, которые были собраны непосредственно в пробирки SCAT169 без удаления пробирки перед пробиркой, содержащей коктейль ингибиторов протеазы, имели более высокие уровни 2-цепочечного НМWK по сравнению с образцами с удалением пробирки.

Аналогично, как показано на фиг. 5B, процент уровней 2-цепочечного НМWK в плазме в образцах НАЕ был выше в пробирках с цитратом натрия по сравнению с плазмой, собранной в пробирки SCAT169, что, вероятно, связано с экзогенной активацией контактной системы, связанной со сборкой плазмы и обработкой.

Это исследование указывает на преимущества использования пробирок для сбора крови, содержащих коктейли ингибиторов протеазы, как описано в настоящем документе, и предлагает усовершенствованный способ сбора образцов плазмы для оценки активации контактной системы, что предотвращает активацию аномальной контактной системы (например, расщепление НМWK) *ex vivo*.

Пример 6. Использование вакуумных пробирок для сбора крови для оценки уровней лекарственного средства в плазме.

Кровь брали у пациентов с НАЕ, получавших DX-2930, и у здоровых индивидов в качестве контроля обычным методом и помещали в пробирки для сбора. После помещения образцов первой порции крови в одну или несколько пробирок для сбора 5 мл образца последующей порции крови помещали в про-

бирки SCAT159 или SCAT153. Затем образцы крови обрабатывали с получением образцов плазмы в течение 1 ч после сбора крови.

Количество DX-2930 в образцах плазмы SCAT измеряли стандартными иммуноанализами, например, ELISA. Коротко, в течение ночи на поверхность 96-луночного планшета наносили Fab-вариант анти-идиотипического моноклонального антитела против DX-2930, а несвязанные антиидиотипические Fab-молекулы удаляли путем многократной промывки планшета. Затем в планшет добавляли образцы плазмы SCAT и инкубировали при комнатной температуре в течение 2-3 ч. Планшет промывали несколько раз и в планшет добавляли биотинилированный вариант IgG антиидиотипического моноклонального антитела против DX-2930, а затем проводили стадию инкубирования и стадию промывки. Затем в планшет добавляли стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена. Через 30 мин инкубирования снова промывали и анализировали на сигнал, высвобождаемый красителем. Интенсивность сигнала соответствует количеству DX-2930 в образце плазмы.

Пример 7. Использование вакуумных приборок для сбора крови для оценки иммуногенности лекарственного средства.

Образцы плазмы пациентов с НАЕ, получавших DX-2930, получали из образцов крови, собранных в пробирки SCAT159 или SCAT153, как описано выше. Анти-DX-2930 антитела в образце плазмы выделяли путем твердофазной и кислотной диссоциации (SPEAD).

Коротко, образцы плазмы инкубировали с биотинилированным DX-2930 и инкубировали в течение ночи. Затем смесь помещали в планшет, покрытый стрептавидином, для захвата биотинилированного DX-2930, который связывается с антителами против DX-2930 в образце плазмы, если таковые имеются. Затем анти-DX-2930 антитела высвобождались при обработке кислотой и образовывали слой на планшете Meso Scale Discovery (MSD). В планшет MSD добавляли DX-2930, меченный рутением, и измеряли электрохемилюминесцентный сигнал для обнаружения наличия анти-DX-2930 антител.

#### **Другие варианты осуществления изобретения**

Все признаки, раскрытые в этом описании, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в этом описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если непосредственно не указано другого, то каждый раскрытый признак является лишь примером общей серии эквивалентных или аналогичных признаков.

Из вышеприведенного описания специалист в данной области может легко определить основные характеристики настоящего изобретения и не отходя от его сущности и объема, может внести различные изменения и модификации изобретения, чтобы адаптировать его к различным вариантам и условиям применения. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в пределах формулы изобретения.

Эквиваленты и область.

Специалистам в данной области будет понятно или они смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего описания, раскрытого в настоящем документе. Объем настоящего раскрытия не ограничивается приведенным выше описанием, а скорее изложен в прилагаемой формуле изобретения.

В формуле изобретения единственное число означает один или более одного, если не указано иное или не очевидно из контекста. Формула изобретения и описание, которые включают "или" между одним или несколькими членами группы, считаются выполненными, если один, более одного или все члены группы присутствуют, используются или имеют отношение к определенному продукту или способу, если не указано обратного или не очевидно из контекста. Настоящее описание включает в себя варианты осуществления, в которых используется, применяется или другим образом относится к данному продукту или способу только один член этой группы. Настоящее описание включает в себя варианты осуществления, в которых используется, применяется или другим образом относится к данному продукту или способу более одного члена или все члены группы.

Кроме того, настоящее описание охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или несколько ограничений, элементов, предложений и описательных терминов из одного или более перечисленных пунктов формулы вводят в другой пункт. Например, любой пункт, который зависит от другого пункта, может быть изменен и включать одно или несколько ограничений, обнаруживаемых в любом другом пункте, который зависит от того же основного пункта. Если элементы представлены в виде списка, например в формате группы Маркуша, то также раскрывается каждая подгруппа элементов, а любой элемент(ы) может быть удален из группы. Следует понимать, что в общем случае, если настоящее раскрытие или аспекты настоящего раскрытия указываются как содержащие конкретные элементы и/или признаки, то некоторые варианты осуществления настоящего раскрытия или аспекты настоящего раскрытия состоят или по существу состоят из таких элементов и/или признаков. Для простоты эти варианты не были хаес verba конкретно изложены в настоящем описании. Также следует отметить, что термины "содержащий" и "включающий" предназначены для того, чтобы быть открытыми и допускают включение дополнительных элементов или стадий. Когда указан диапазон, то включены конечные значения. Кроме того, если не указано иного или не очевидно из контекста и для понимания специалистом в

данной области, то значения, которые выражены в диапазонах, могут принимать любое конкретное значение или поддиапазон в указанных диапазонах в различных вариантах осуществления настоящего раскрытия, десятая часть единицы нижнего предела диапазона, если контекст явно не указывает другого.

Эта заявка относится к различным выданным патентам, опубликованным патентным заявкам, журнальным статьям и другим публикациям, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки. Если возникает конфликт между любыми включенными ссылками и первоначальным описанием, то за образец надо брать описание. Кроме того, любое конкретный вариант осуществления настоящего описания, который падает в рамки предшествующего уровня техники, может быть просто исключен из одного или нескольких пунктов. Так как такие варианты осуществления считают известными среднему специалисту в данной области, то они могут быть исключены, даже если исключение не явным образом не указано в настоящем документе. Любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения может быть исключен из любого пункта по любой причине, независимо от того, связано ли это с его наличием в уровне техники.

Специалистам в данной области будет понятно, или они смогут установить, используя не более чем рутинное экспериментирование, многочисленные эквиваленты конкретных вариантов осуществления настоящего описания, раскрытые в настоящем документе. Объем настоящих вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, скорее ограничен тем, что изложено в прилагаемой формуле изобретения, чем предназначен для ограничения вышеприведенным описанием. Специалистам в данной области будет понятно, что могут быть сделаны различные изменения и модификации этого описания, не отклоняясь от сущности или не выходя за рамки изобретения, как определено в нижеследующей формуле изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Вакуумная пробирка для забора крови, содержащая жидкий состав, который содержит смесь ингибиторов протеазы, полибрена и ЭДТА, где смесь ингибиторов протеазы состоит из 80-120 мкМ бензамидина, 1-3 мг/мл ингибитора трипсина сои, 200-300 мкМ лейпептина и 10-30 мкМ 4-(2-аминоэтил) бензолсульфонилфторида гидрохлорида (АЕBSF).

2. Вакуумная пробирка для забора крови по п.1, где пробирка является не стеклянной пробиркой.

3. Вакуумная пробирка для забора крови по п.2, где пробирка является пластиковой пробиркой.

4. Вакуумная пробирка для забора крови по любому из пп.1-3, где смесь ингибиторов протеазы состоит из 100 мМ бензамидина, 2 мг/мл ингибитора трипсина сои, 263 мкМ лейпептина и 20 мМ АЕBSF.

5. Вакуумная пробирка для забора крови по любому из пп.1-4, где жидкая композиция дополнительно содержит цитрат тринатрия, лимонную кислоту и декстрозу.

6. Вакуумная пробирка для сбора крови по п.5, где жидкий состав содержит 100 мМ цитрат тринатрия, 67 мМ лимонной кислоты и 2% декстрозы.

7. Вакуумная пробирка для сбора крови по любому из пп.1-6, где:

а) жидкий состав содержит 400 мкг/мл полибрена и 20 мМ ЭДТА;

б) жидкий состав имеет рН 4-6;

с) пробирка содержит 0,5 мл жидкой композиции; и/или

д) смесь ингибиторов протеазы практически не содержит ингибиторов протеазы, которые нестабильны в водном растворе.

8. Вакуумная пробирка для сбора крови по п.7, где жидкий состав имеет рН со значением 4,5.

9. Способ оценки эндогенного уровня активации контактной системы в образце крови у индивида, где способ включает:

(i) сбор крови у индивида в вакуумную пробирку для сбора крови по любому из пп.1-8;

(ii) обработку крови с получением образца плазмы; и

(iii) измерение уровня активации контактной системы в образце плазмы.

10. Способ по п.9, в котором на стадии (i) вакуумная пробирка для сбора крови является не первичной пробиркой, заполненной кровью индивида,

причем стадию (ii) осуществляют в течение одного часа после стадии (i); и/или

где стадию (iii) осуществляют путем измерения уровня одного или нескольких биомаркеров, указывающих на активацию контактной системы.

11. Способ по любому из пп.9 или 10, в котором индивидом является человек.

12. Способ по п.11, в котором человек является больным с заболеванием, связанным с контактной системой.

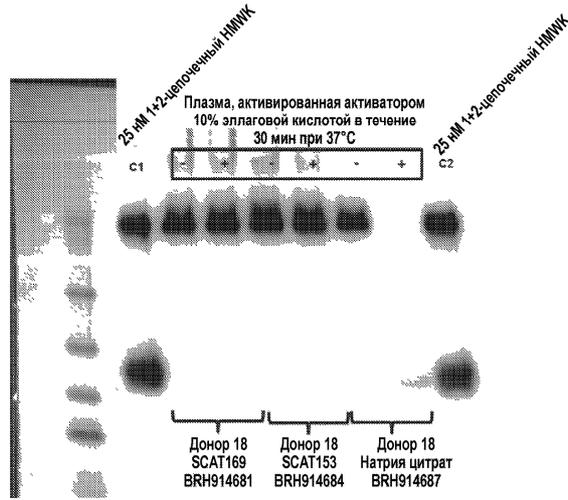
13. Способ по п.12, в котором заболевание представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАЕ) или идиопатический ангионевротический отек.

14. Способ по п.13, где больной страдает НАЕ с нормальным C1-INH.

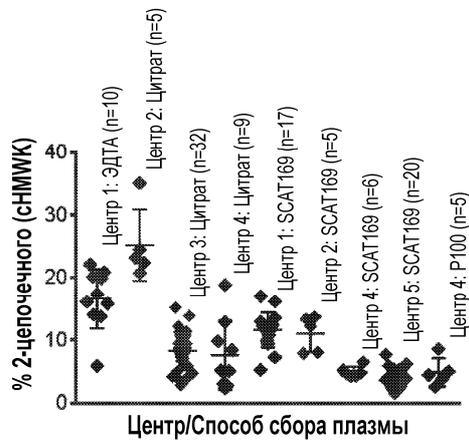
15. Способ по любому из пп.9-14, в котором человек получает лечение лекарственным средством, направленным на компонент контактной системы.

16. Способ по п.15, в котором компонентом контактной системы является калликреин плазмы.

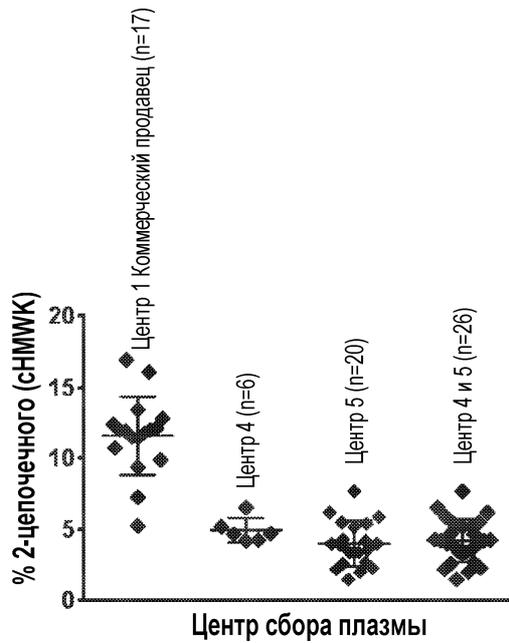
17. Способ по п.15 или 16, в котором лекарственное средство ингибирует активный калликреин плазмы.
18. Способ по любому из пп.15-17, где лекарственное средство представляет собой антитело, которое связывается с активным калликреином плазмы.
19. Способ по любому из пп.10-18, в котором один или несколько биомаркеров выбраны из группы, состоящей из прекалликреина, активного калликреина плазмы (pKal),  $\alpha$ 2M-pKal, активного фактора XII, активного фактора XI, высокомолекулярного кининогена (HMWK) и метаболита брадикинина.
20. Способ по п.19, в котором один или несколько биомаркеров включают расщепленный HMWK и/или интактный HMWK.
21. Способ изменения уровня лекарственного средства, нацеленного на контактную систему у индивида, где способ включает:
- (i) сбор крови у индивида в вакуумную пробирку для сбора крови по любому из пп.1-8, где индивид получает лекарственное средство, которое нацелено на компонент контактной системы;
  - (ii) обработку крови с получением образца плазмы; и
  - (iii) измерение уровня лекарственного препарата в образце плазмы.
22. Способ по п.21, в котором на стадии (i) вакуумная пробирка для сбора крови является не первичной пробиркой, заполненной кровью индивида; и/или в котором стадию (ii) осуществляют в течение одного часа после стадии (i).
23. Способ по любому из пп.21 или 22, в котором индивидом является человек.
24. Способ по п.23, в котором человек является больным, страдающим заболеванием, связанным с контактной системой.
25. Способ по п.24, в котором заболевание представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАЕ).
26. Способ по любому из пп.21-25, где лекарственное средство ингибирует активный калликреин плазмы.
27. Способ по п.26, в котором лекарственное средство представляет собой антитело, которое связывается с активным калликреином плазмы.
28. Способ оценки иммуногенности лекарственного средства, нацеленного на контактную, где способ включает:
- (i) сбор крови у индивида в вакуумную пробирку для сбора крови по любому из пп.1-8, где индивид получает лекарственное средство, которое нацелено на компонент контактной системы;
  - (ii) обработку крови с получением образца плазмы; и
  - (iii) измерение уровня антител, которые связываются с лекарственным средством в образце плазмы.
29. Способ по п.28, в котором на стадии (i) вакуумная пробирка для сбора крови является не первичной пробиркой, заполненной кровью индивида; и/или в котором стадию (ii) осуществляют в течение одного часа после стадии (i).
30. Способ по любому из пп.28 или 29, в котором индивидом является человек.
31. Способ по п.30, в котором человек является больным, страдающим заболеванием, связанным с контактной системой.
32. Способ по п.31, в котором заболевание представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАЕ).
33. Способ по любому из пп.28-32, где лекарственное средство ингибирует активный калликреин плазмы.
34. Способ по любому из пп.28-33, в котором лекарственное средство представляет собой антитело, которое связывается с активным калликреином плазмы.
35. Способ по любому из пп.28-34, в котором способ дополнительно включает перед стадией (iii) выделение антител, которые связываются с лекарственным средством, из образца плазмы.



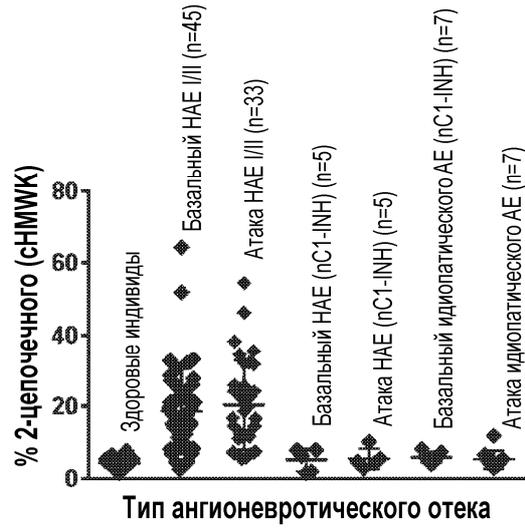
Фиг. 1



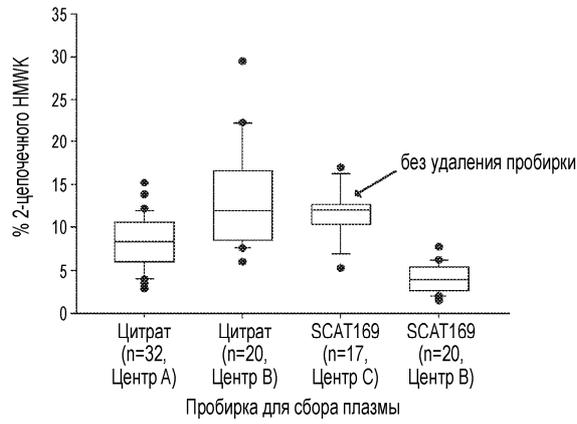
Фиг. 2



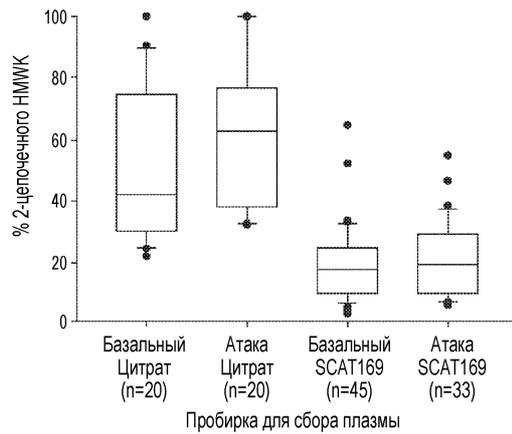
Фиг. 3



**A**



**B**



Фиг. 5

