(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116333144 A
(43)申请公布日 2023.06.27

(21)申请号 202211273734.8
(22)申请日 2016.07.21
(30)优先权数据
62/194,957 2015.07.21 US
62/273,657 2015.12.31 US
62/316,310 2016.03.31 US
(62)分案原申请数据
201680046558.0 2016.07.21
(71)申请人 武田药品工业株式会社
地址 日本大阪市
(72)发明人 S·梅森 J·A·肯尼斯顿
A·尼克森 D·J·塞克斯顿
S·R·科莫 B·阿德尔曼
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 吕艳英
(51)Int.Cl.
C07K 16/36(2006.01)
C12N 15/13(2006.01)
C12P 21/08(2006.01)
A61P 27/02(2006.01)
A61P 7/10(2006.01)
A61P 7/02(2006.01)

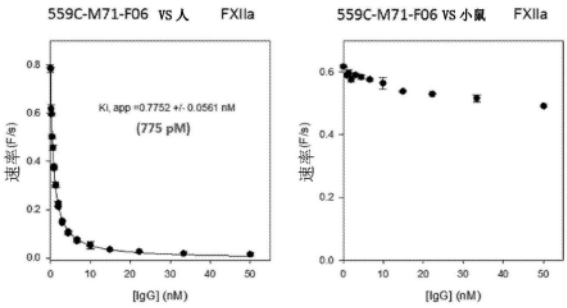
权利要求书4页 说明书41页
序列表（电子公布） 附图33页

(54)发明名称

一种因子XIIA的单克隆抗体抑制剂

(57)摘要

本申请的名称是一种因子XIIA的单克隆抗体抑制剂。本文公开的是抗-因子XIIa抗体和使用抗-因子XIIa抗体治疗与因子XII有关的疾病的方法，所述与因子XII有关的疾病包括与接触系统激活、血浆前激肽释放酶信号传导有关的疾病(例如，遗传性血管性水肿)和眼病。



CN 116333144 A

1.一种单克隆抗体,其与因子XIIa(FXIIa)结合并且不与因子XII(FXII)结合,其中所述抗体包含含有重链可变区的重链和含有轻链可变区的轻链,所述重链可变区包含重链互补决定区1(HC CDR1)、重链互补决定区2(HC CDR2)和重链互补决定区3(HC CDR3),所述轻链可变区包含轻链CDR1(LC CDR1)、轻链CDR2(LC CDR2)和轻链CDR3(LC CDR3),其中:

(i)HC CDR1包含WYSMH(SEQ ID NO:41),HC CDR2包含VIYPSGGKTRYADSVKG(SEQ ID NO:74),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(ii)HC CDR1包含QYVMH(SEQ ID NO:42),HC CDR2包含SIWPSGGHTRYADSVKG(SEQ ID NO:75),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(iii)HC CDR1包含WYVMH(SEQ ID NO:43),HC CDR2包含GIWPSGGRTKYADSVKG(SEQ ID NO:76),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(iv)HC CDR1包含NYVMH(SEQ ID NO:44),HC CDR2包含SIWPSGGKTKYADSVKG(SEQ ID NO:77),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDA(SEQ ID NO:112);

(v)HC CDR1包含MYTMN(SEQ ID NO:45),HC CDR2包含RIYPSGGKTLYADSVKG(SEQ ID NO:78),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(vi)HC CDR1包含QYVMS(SEQ ID NO:46),HC CDR2包含RIYPSGGVTKYADSVKG(SEQ ID NO:79),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(vii)HC CDR1包含WYNMH(SEQ ID NO:47),HC CDR2包含YISPSGGKTKYTDSVKG(SEQ ID NO:80),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(viii)HC CDR1包含RYIMH(SEQ ID NO:48),HC CDR2包含SIYPSGGVTKYADSVKG(SEQ ID NO:81),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(ix)HC CDR1包含RYIMG(SEQ ID NO:49),HC CDR2包含SIYPSGGVTRYADSVKG(SEQ ID NO:82),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(x)HC CDR1包含QYNMV(SEQ ID NO:50),HC CDR2包含RIWPSGGKTTYADSVKG(SEQ ID NO:83),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xi)HC CDR1包含RYVMV(SEQ ID NO:51),HC CDR2包含RIYPSGGMTQYADSVKG(SEQ ID NO:84),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xii)HC CDR1包含WYNMA(SEQ ID NO:52),HC CDR2包含RIYPSGGMTQYADSVKG(SEQ ID NO:84),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xiii)HC CDR1包含QYIMH(SEQ ID NO:53),HC CDR2包含SIYPSGGNTKYADSVKG(SEQ ID NO:85),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xiv)HC CDR1包含HYVMH(SEQ ID NO:54),HC CDR2包含SIYPSGGLTKYADSVKG(SEQ ID NO:86),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xv)HC CDR1包含WYTMH(SEQ ID NO:55),HC CDR2包含SIYPSGGFTRYADSVKG(SEQ ID NO:87),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xvi)HC CDR1包含FYHMH(SEQ ID NO:56),HC CDR2包含RIVPSGGMTRYADSVKG(SEQ ID NO:88),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xvii)HC CDR1包含FYSMH(SEQ ID NO:57),HC CDR2包含RIYPSGGVTKYADSVKG(SEQ ID NO:89),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xviii)HC CDR1包含QYVMH(SEQ ID NO:58),HC CDR2包含SIWPSGGKTTYADSVKG(SEQ ID

NO:90),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xix)HC CDR1包含QYVMH(SEQ ID NO:58),HC CDR2包含SIWPSGGFTKYADSVKG(SEQ ID NO:91),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xx)HC CDR1包含FYNMH(SEQ ID NO:59),HC CDR2包含SIYPSGGVTRYADSVKG(SEQ ID NO:92),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxi)HC CDR1包含WYVMH(SEQ ID NO:43),HC CDR2包含SIYPSGGKTSYADSVKG(SEQ ID NO:93),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxii)HC CDR1包含PYIMH(SEQ ID NO:60),HC CDR2包含VIYPSGSKTNYADSVKG(SEQ ID NO:94),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxiii)HC CDR1包含RYTMR(SEQ ID NO:61),HC CDR2包含SIWPSGGMTRYADSVKG(SEQ ID NO:95),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxiv)HC CDR1包含QYVMH(SEQ ID NO:58),HC CDR2包含SIYPSGGLTRYADSVKG(SEQ ID NO:96),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxv)HC CDR1包含WYIMG(SEQ ID NO:62),HC CDR2包含YIYPSGGNTRYADSVKG(SEQ ID NO:97),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxvi)HC CDR1包含RYVMH(SEQ ID NO:63),HC CDR2包含SIWPSGGMTKYADSVKG(SEQ ID NO:98),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxvii)HC CDR1包含FYIMG(SEQ ID NO:64),HC CDR2包含RIYPSGGATQYADSVKG(SEQ ID NO:99),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxviii)HC CDR1包含FYVMG(SEQ ID NO:65),HC CDR2包含RIYPSGGLTQYADSVKG(SEQ ID NO:100),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxix)HC CDR1包含FYSMH(SEQ ID NO:66),HC CDR2包含RIYPSGGITSYADSVKG(SEQ ID NO:101),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxx)HC CDR1包含MYIMH(SEQ ID NO:67),HC CDR2包含SIYPSGGMTKYADSVKG(SEQ ID NO:102),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxxi)HC CDR1包含MYVMH(SEQ ID NO:68),HC CDR2包含SIYPSGGLTKYADSVKG(SEQ ID NO:103),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxxii)HC CDR1包含QYVMH(SEQ ID NO:58),HC CDR2包含RIYPSGGLTNYADSVKG(SEQ ID NO:104),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxxiii)HC CDR1包含WYVMQ(SEQ ID NO:69),HC CDR2包含SIYPSGGMTKYADSVKG(SEQ ID NO:102),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxxiv)HC CDR1包含WYIMG(SEQ ID NO:62),HC CDR2包含RIYPSGGSTHYADSVKG(SEQ ID NO:105),和HC CDR3包含QRYRGPRYYYYIDA(SEQ ID NO:113);

(xxxv)HC CDR1包含QYTMV(SEQ ID NO:70),HC CDR2包含RIYPSGGVTQYADSVKG(SEQ ID NO:106),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxxvi)HC CDR1包含WYVMY(SEQ ID NO:71),HC CDR2包含RIYPSGGITHYADSVKG(SEQ ID NO:107),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxxvii)HC CDR1包含FYVML(SEQ ID NO:72),HC CDR2包含SIWPSGGVTKYADSVKG(SEQ ID NO:108),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);

(xxxviii)HC CDR1包含WYVMQ(SEQ ID NO:69),HC CDR2包含YIYPSGGHTKYADSVKG(SEQ ID NO:109),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);或

(xxxix)HC CDR1包含RYSMN(SEQ ID NO:73),HC CDR2包含GIYPSGGKTKYADSVKG(SEQ ID NO:110),和HC CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111);和

LC CDR1包含RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:114),LC CDR2包含LGSNRAS(SEQ ID NO:115),和LC CDR3包含MQALQTPWT(SEQ ID NO:116)。

2.如权利要求1所述的抗体,其中抗体是全长抗体或其抗原结合片段。

3.如权利要求2所述的抗体,其中抗体是Fab。

4.如权利要求1-3任一项所述的抗体,其中抗体是人抗体或人源化抗体。

5.如权利要求1-3任一项所述的抗体,其中重链可变区包含选自由SEQ ID NO:1-39和SEQ ID NO:125组成的组的氨基酸序列。

6.如权利要求1-3任一项所述的抗体,其中轻链可变区包含SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:126的氨基酸序列。

7.如权利要求1-6任一项所述的抗体,其中重链还包含重链恒定区。

8.如权利要求7所述的抗体,其中重链恒定区包含至少一个突变,所述突变相比野生型对应物延长抗体的半衰期。

9.如权利要求8所述的抗体,其中至少一个突变在对应于SEQ ID NO:119的位置145、147或149的位置处。

10.如权利要求9所述的抗体,其中至少一个突变是选自由以下组成的组的氨基酸取代:M145Y、S147T和T149E。

11.如权利要求8所述的抗体,其中重链恒定区包含在对应于SEQ ID NO:119的位置145、147和149的位置处的氨基酸取代。

12.如权利要求11所述的抗体,其中重链恒定区包含氨基酸取代M145Y、S147T和T149E。

13.如权利要求8所述的抗体,其中重链恒定区包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列。

14.一种分离的核酸或一组核酸,其共同编码如权利要求1-13任一项所述的抗体。

15.一种载体或载体组,包含如权利要求14所述的核酸或核酸组。

16.如权利要求15所述的载体或载体组,其中载体是表达载体。

17.一种宿主细胞或宿主细胞组,包含如权利要求15或16所述的载体或载体组。

18.如权利要求17所述的宿主细胞或宿主细胞组,其中细胞是细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞或哺乳动物细胞。

19.如权利要求18所述的宿主细胞或宿主细胞组,其中细胞是CHO细胞。

20.一种产生与因子XIIa(FXIIa)结合的抗体的方法,所述方法包括:

在培养基中培养如权利要求17-19任一项所述的细胞或细胞组;和

收集培养的细胞或培养基,用于分离抗体。

21.如权利要求20所述的方法,其中所述方法进一步包括从培养的细胞或培养基中分离抗体。

22.一种药物组合物,包括

(a)如权利要求1-13任一项所述的抗体、如权利要求14所述的核酸或核酸组,或如权利要求15或16所述的载体或载体组;和

(b)药学上可接受的载体。

23.如权利要求1-13任一项所述的抗体、如权利要求14所述的核酸或核酸组、或如权利要求15或16所述的载体或载体组在制备用于治疗与接触系统激活有关的疾病的药物中的用途，包括向需要其的受试者施用如权利要求1-13任一项所述的抗体、如权利要求14所述的核酸或核酸组、或如权利要求15或16所述的载体或载体组，

其中与接触系统激活有关的疾病是血栓形成、遗传性血管性水肿(HAE)或眼病。

24.如权利要求23所述的用途，其中受试者患有、被怀疑患有与接触系统激活有关的疾病或处于与接触系统激活有关的疾病的风险中。

25.如权利要求23或24所述的用途，其中血栓形成与心房颤动、深静脉血栓形成(DVT)、肺栓塞、中风或动脉或静脉血栓性事件有关。

26.如权利要求23或24所述的用途，其中HAE是I型、II型或III型HAE。

27.如权利要求23或24所述的用途，其中眼病是黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、高血压性视网膜病、年龄相关性黄斑变性或视网膜静脉阻塞。

28.有效量的包含如权利要求1-13任一项所述的抗体的组合物在制备用于治疗受试者的遗传性血管性水肿(HAE)或眼病的药物中的用途。

29.如权利要求28所述的用途，其中抗体抑制FXI对FXIa的激活。

30.如权利要求28所述的用途，其中抗体的Ki^{app}低于大约110pM。

31.如权利要求28所述的用途，其中抗体的Ki^{app}低于大约50pM。

32.如权利要求28所述的用途，其中抗体的Ki^{app}低于大约10pM。

33.如权利要求28-32任一项所述的用途，其中受试者患有、被怀疑患有HAE或处于HAE的风险中。

34.如权利要求33所述的用途，其中HAE是I型、II型或III型HAE。

35.如权利要求28-32任一项所述的用途，其中受试者患有、被怀疑患有或处于眼病的风险中。

36.如权利要求35所述的用途，其中眼病是黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、高血压性视网膜病、年龄相关性黄斑变性或视网膜静脉阻塞。

一种因子XIIA的单克隆抗体抑制剂

[0001] 本申请为申请号为201680046558.0(PCT/US2016/043265),申请日为2016年7月21日,发明名称为“一种因子XIIA的单克隆抗体抑制剂”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2015年7月21日提交的美国临时申请号62/194957、2015年12月31日提交的美国临时申请号62/273657和2016年3月31日提交的美国临时申请号62/316310的申请日的权益。这些参考申请中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0004] 因子XII(FXII)是血浆接触激活系统的组分,其负责内源性凝血的引发和前激肽释放酶向血浆激肽释放酶(pKal)的转化二者。活性pKal切割高分子量激肽原(HMWK)以释放缓激肽,缓激肽是水肿和疼痛的有效激活剂。血液凝固的内源性途径的激活导致血纤蛋白的产生和血块(血栓)的形成。

[0005] 发明概述

[0006] 本公开是基于对特异性结合因子XIIa(FXIIa)而不结合因子XII(FXII)的一些抗体的鉴定。这些抗体对FXIIa具有高结合亲和力(例如,Ki^{app}<50pM);成功地降低血浆激肽释放酶的激活;和延迟活化部分促凝血酶原激酶时间(APTT)而对凝血酶原时间(PT)没有影响。

[0007] 因此,本公开的一个方面特征在于与因子XIIa(FXIIa)结合而不与因子XII(FXII)结合的单克隆抗体。在一些实施方案中,抗体是全长抗体或其抗原结合片段,诸如Fab。在一些实施方案中,抗体是人抗体或人源化的抗体。

[0008] 在一些实施方案中,抗体与FXIIa的链C中的一个或多个氨基酸残基相互作用。在一些实施例中,氨基酸残基选自SEQ ID NO:128中的L390、Y391、W392、G393、H394、S395、F396、C397、H412、C413、L414、Q415、D416、R432、N433、V456、Y458、H507、F509、E510、G511、A512、E513、Y515、D557、A558、C559、Q560、G561、D562、S563、I584、S585、W586、G587、S588、G589、C590、G591、D592和G597。在一些实施方案中,抗体与FXIIa的片段结合,所述片段包含SEQ ID NO:128的残基390-397、412-416、432-433、456-458、507-515、557-563或584-592。

[0009] 在一些实施例中,本文描述的抗-FXIIa抗体包含(a)含有重链可变区的重链,所述重链可变区包含重链互补决定区1(CDR1)、重链互补决定区2(CDR2)和重链互补决定区3(CDR3),和任选地(b)含有轻链可变区的轻链,所述轻链可变区包含轻链CDR1、轻链CDR2和轻链CDR3。

[0010] 在一些实施方案中,重链可变区包含重链CDR3,所述重链CDR3包含QRYRGPKYYYYMDV(SEQ ID NO:111)、QRYRGPKYYYYMDA(SEQ ID NO:112)或QRYRGPRYYYYIDA(SEQ ID NO:113)的氨基酸序列。这样的重链可变区可进一步包含包括式$X_1YX_3MX_5$(SEQ ID NO:117)的重链CDR1,其中:X_1是R、Q、W、H、F、P、M或N;X_3是I、V、T、H、S或N;和X_5是H、G、V、A、R、Q、Y、L、N或S。在一些实施例中,CDR1的X_1是W或Q;CDR1的X_3是S或V;和/或X_5是H。在一些实施例中,重链CDR1可包含SEQ ID NO:41-73和121中任意之一的氨基酸序列。

[0011] 可选地或另外，本文描述的抗-FXIIa抗体的重链可变区可进一步包含包括式$X_1IX_3PSGX_7X_8TX_{10}YX_{12}DSVKG$(SEQ ID NO:118)的重链CDR2，其中：X_1是S、R、V、Y或G；X_3是Y、W、V或S；X_7是G或S；X_8是V、K、M、N、L、F、A、I、S、H或R；X_{10}是K、R、T、Q、S、N、H或L；和X_{12}是A或T。在一些实施例中，CDR2的X_1是V或S、CDR2的X_3是Y或W、CDR2的X_7是G、CDR2的X_8是K或H、CDR2的X_{10}是R、和/或CDR2的X_{12}是A。在一些实施例中，重链CDR2包含SEQ ID NO:74-110、122-124和127中任意之一的氨基酸序列。

[0012] 在某些实施方案中，本文描述的抗-FXIIa抗体的重链可变区包含表1所示的重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3的组合。

[0013] 在一些实施例中，本文描述的抗-FXIIa抗体的重链包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:1-39和SEQ ID NO:125中任意之一的氨基酸序列。

[0014] 本文描述的抗-FXIIa抗体的任意重链可进一步包含重链恒定区。在一些实施方案中，重链恒定区包含相比野生型相对物延长抗体的半衰期的至少一个突变(例如，氨基酸取代)。这样的突变的重链恒定区可包含在对应于SEQ ID NO:119的位置145、147或149的位置处的至少一个突变，SEQ ID NO:119代表示例性野生型人重链恒定区的氨基酸序列。所述至少一个突变可以是以下氨基酸取代：M145Y、S147T和/或T149E。在一些实施例中，突变的重链恒定区包含SEQ ID NO:119的位置145、147和149处的氨基酸取代(例如，M145Y、S147T和T149E)。这样的突变的重链可包含SEQ ID NO:120的氨基酸序列。

[0015] 本文描述的抗-FXIIa抗体的轻链可变区可包含轻链CDR3，所述轻链CDR3包含MQALQTPWT(SEQ ID NO:116)的氨基酸序列。在一些实施例中，轻链可变区可进一步包含轻链CDR1，所述轻链CDR1包含RSSQSLLHSNGYNYLD(SEQ ID NO:114)的氨基酸序。可选地或另外，轻链可变区可进一步包含轻链CDR2，所述轻链CDR2包含LGSNRAS(SEQ ID NO:115)的氨基酸序列。在一些实施例中，本文描述的抗-FXIIa抗体的轻链可包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:126的氨基酸序列。

[0016] 本文描述的任意抗-FXIIa抗体均可以是全长抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中，抗体可以是人抗体或人源化的抗体。

[0017] 也属于本公开范围的是：共同编码本文所述的任意抗-FXIIa抗体(例如，编码至少抗体的重链和轻链可变区)的分离的核酸或核酸组、包含所述核酸或核酸组的载体或载体组(例如，表达载体)和包含所述载体或载体组的宿主细胞或宿主细胞组。示例性宿主细胞包括但不限于细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、植物细胞和哺乳动物细胞，诸如CHO细胞。

[0018] 另外，本公开提供产生本文描述的任意抗-FXIIa抗体的方法。所述方法包括培养包含共同编码抗体的载体或载体组的宿主细胞或宿主细胞组，和收集培养的细胞或培养基用于分离抗体。这样的方法可进一步包括从培养的细胞或培养基分离抗体。

[0019] 在另一方面，本公开提供用于治疗受试者的与因子XII有关的疾病的方法，所述与因子XII有关的疾病例如，与接触系统激活有关的疾病、与pKal信号传导途径有关的疾病诸如遗传性血管性水肿或HAE或眼病(例如，黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、高血压性视网膜病、年龄相关性黄斑变性或视网膜静脉阻塞)。这样的方法可包括向需要其的受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含与FXIIa结合而不与FXII结合的抗体(例如，本文描述的任意抗-FXIIa抗体)、共同编码所述抗体的一种或多种核酸或包含这样的核酸的表达载体。在一些实施方案中，抗体特异性结合FXIIa的催化结构域。在其它实施方案中，抗体抑制FXI对

FXIa的激活。在再其它的实施方案中，抗体的Ki^{app}小于大约110pM(例如，小于大约50pM或10pM)。

[0020] 待通过本文描述的方法治疗的受试者可以是人受试者，其患有、被怀疑患有pKal-相关疾病(例如，HAE)，或处于pKal-相关疾病(例如，HAE)的风险中。在一些实施例中，受试者患有、被怀疑患有I型、II型或III型HAE，或处于I型、II型或III型HAE的风险中。

[0021] 在一些实施方案中，待通过本文描述的方法治疗的受试者可以是人受试者，其患有、被怀疑患有与因子XII有关的疾病，或处于与因子XII有关的疾病风险中，所述与因子XII有关的疾病诸如本文公开的那些疾病(例如，与接触系统激活有关的疾病)。例如，受试者可患有、被怀疑患有与接触系统激活有关的疾病，或处于与接触系统激活有关的疾病风险中，所述与接触系统激活有关的疾病诸如血栓形成，包括与心房颤动有关的血栓形成、深部静脉血栓形成(DVT)、肺栓塞、中风或动脉或静脉血栓形成。在另一个实施例中，受试者可患有、被怀疑患有与pKal信号传导途径有关的疾病，或处于与pKal信号传导途径有关的疾病风险中，所述与pKal信号传导途径有关的疾病例如，HAE，诸如I型、II型或III型HAE。在再另外的实施例中，受试者可患有、被怀疑患有眼病，或处于眼病的风险中，所述眼病可以是黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、高血压性视网膜病、年龄相关性黄斑变性或视网膜静脉阻塞。

[0022] 包含本文描述的任意抗-FXIIa抗体和药学上可接受的载体的药物组合物也属于本公开范围。这样的药物组合物可用于治疗与pKal信号传导途径有关的疾病(例如，HAE，诸如I型、II型或III型HAE)或用于制备用于治疗这样的疾病的药物。

[0023] 在下面的描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。通过下面的附图和几个实施方案的详细描述以及附加的权利要求中，本发明的其它特征或优点将变得显而易见。

[0024] 附图简述

[0025] 下面的附图形成本说明书的一部分，并且被包括以进一步说明本公开的某些方面，通过参考附图并结合本文给出的具体实施方案的详细描述，可以更好地理解本公开。

[0026] 图1是示意图，其显示涉及因子XII的凝血级联。

[0027] 图2是示意图，其显示抗体选择策略。

[0028] 图3是示意图，其显示用于表征FXIIa抑制剂的活性的生物测定，包括体外活性测定、血浆活性测定和结合优先测定。

[0029] 图4是显示亲本抗体559C-M71-F06(人IgG1抗体)针对人(左小图)和小鼠FXIIa(右小图)的抑制性活性的图。

[0030] 图5是显示通过APTT测定的M71-F06的物种交叉反应性的图。

[0031] 图6显示在注射抗-FXIIa抗体之后在各个时间点大鼠血浆中示例性抗-FXIIa抗体M191-E09和M192-H11的浓度。

[0032] 图7是显示在存在抗-FXIIa抗体559C-X211-A01(A01)的情况下，APTT和PT增加(sec)的时间过程的图。A:10mg/kg A01之后的APTT动力学。B:在存在10mg/kg A01的情况下，APTT相对于基线的时间过程。C:在存在10mg/kg A01的情况下，PT(sec)的时间过程。

[0033] 图8是显示在施用指定的治疗之前(给药前(Pre Drug)，灰条柱)、在开始研究之前5分钟(研究前，黑条柱)和在研究结束前5分钟(研究后，白条柱)的指定的时间点，抗体DX-

4012的APTT活性的图。数值表示以秒为单位的平均APTT+/-标准误差。A:APTT时间。B:APTT相对于基线值(在对照研究天(一天或多天)针对相同动物,研究前和研究后测量的平均值)的增加倍数。

[0034] 图9是显示在施用指定的治疗之前(给药前,灰条柱)、在开始研究之前5分钟(研究前,黑条柱)和在研究结束前5分钟(研究后,白条柱)的指定的时间点,抗体DX-4012的PT活性的图。数值表示以秒为单位的平均PT+/-标准误差。A:PT时间。B:PT相对于基线值(在对照研究天(一天或多天)针对相同动物,研究前和研究后测量的平均值)的增加倍数。

[0035] 图10是在非人灵长类动物中的血栓形成研究期间慢性动静脉(AV)瘘的外环(external loop)的示意图。外环延伸超过γ照相机的顶部,用于实时测量血小板沉积。

[0036] 图11是显示包被胶原的移植物上的血小板沉积的时间过程的图。A:血栓头。B:血栓尾。

[0037] 图12是显示包被胶原的移植物上的血小板沉积的时间过程的图。

[0038] 图13是显示包被胶原的移植物上的血小板沉积(全部血栓)的时间过程的图。

[0039] 图14是显示包被胶原的移植物上的血栓生长速率的图,其被测量为每5分钟间隔血小板沉积量。

[0040] 图15是显示包被组织因子的移植物上的血小板沉积的时间过程的图。A:血栓头。B:血栓尾。

[0041] 图16是显示包被组织因子的移植物上的血小板沉积的时间过程的图。

[0042] 图17是显示包被组织因子的移植物上的血小板沉积的时间过程的图。

[0043] 图18是显示包被组织因子的移植物上的血栓生长速率的图,其被测量为每5分钟间隔血小板沉积量。

[0044] 图19是显示包被胶原的移植物(灰条柱)和包被组织因子的移植物(白条柱)中全血栓(头和尾)中的末端血纤蛋白含量和血小板沉积量的图。A:血小板沉积量。B:血纤蛋白含量。

[0045] 图20是通过SEC分析显示DX-4012(称为559C-X211-A01,抗FXIIa Fab片段称为559C-R174-A01)的Fab片段和FXIIa的复合物形成的图。A:FXIIa和Fab。B:FXIIa、Fab以及50μM FXIIa和30μM Fab的FXIIa-Fab复合物。C:FXIIa、Fab以及50μM FXIIa和40μM Fab的FXIIa-Fab复合物。D:FXIIa、Fab以及50μM FXIIa和50μM Fab的FXIIa-Fab复合物。E:FXIIa、Fab以及50μM FXIIa和60μM Fab的FXIIa-Fab复合物。

[0046] 图21是显示抗-FXIIa抗体M192-H11对人FXIIa的抑制性活性的图。

[0047] 图22是显示与DX-4012有关的止血测量的图。A:流血时间的图。B:流血量。

[0048] 发明详述

[0049] 接触系统的组分引发凝血的内源性途径,并通过释放促炎性肽缓激肽而促进炎症。因子XII(FXII)也称为Hageman因子,是在激活凝血的内源性途径以及激肽释放酶-激肽系统中发挥作用的丝氨酸蛋白酶。FXII通过带负电的表面(如聚阴离子表面、玻璃、聚磷酸盐、鞣花酸)激活,产生活性形式FXIIa。激活的FXIIa有能力切割前-激肽释放酶,产生活性pKal。随后,激活的pKal能够将FXII切割成FXIIa,产生正反馈环,其中FXIIa产生甚至更多的pKal,这进一步将另外的FXII活化成FXIIa。激活的pKal也能切割高分子量激肽原(HMWK),以释放缓激肽。图1阐释了涉及FXII的凝血级联。

[0050] 在与接触系统激活有关的疾病，诸如HAE中，增加的缓激肽水平可引起导致水肿性HAE发作的血管舒张和炎症。因此，期望开发用于治疗可能由接触系统的激活介导的一系列疾病的新型治疗剂。

[0051] 本文描述的是与FXIIa结合并抑制FXIIa的抗体及其在抑制FXIIa和治疗与接触系统激活有关的疾病中的用途。如下面的实施例所示，产生了一些示例性抗-FXIIa抗体，其显示与FXIIa特异性结合并抑制FXIIa的活性。预期本文所例举的这类抗体在治疗与接触系统激活有关的疾病，尤其是降低缓激肽的产生、减少血管舒张和与疾病症状有关的病理性血栓形成方面展示增强的治疗作用。

[0052] 与FXIIa结合的抗体

[0053] 本公开提供结合FXIIa，例如FXIIa的催化结构域，的抗体。这类抗体可以不与FXII结合。

[0054] 抗体(以复数形式互换使用)是免疫球蛋白分子，其通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点能够特异性结合靶标，比如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等。如本文所使用，术语“抗体”不仅包括完整的(即，全长)多克隆或单克隆抗体，而且包括其抗原结合片段(比如Fab、Fab′、$F(ab')_2$、Fv)、单链(scFv)、其突变体、包括抗体部分的融合蛋白、人源化的抗体、嵌合抗体、双抗体、纳米抗体、线性抗体、单链抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)和包括具有必要特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰的构型，包括抗体的糖基化变体、抗体的氨基酸序列变体和共价修饰的抗体。抗体包括任何类的抗体，比如IgD、IgE、IgG、IgA或IgM(或其亚类)，并且抗体不需要是任何具体的类别。根据其重链的恒定结构域的抗体氨基酸序列，免疫球蛋白可命名为不同的类。有五个主要的免疫球蛋白类：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，并且这些中的若干可进一步分成亚类(同种型)，例如，IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应不同类免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为α、δ、ε、γ和μ。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是熟知的。

[0055] 在一些实施方案中，本文所述的抗-FXIIa抗体可结合FXIIa并抑制FXIIa的活性的至少50％(例如，60％、70％、80％、90％、95％或更大)。提供对抑制剂效力的测量的表观抑制常数(Ki^{app}或$K_{i,app}$)与降低酶活性所需的抑制剂浓度相关，并且不依赖于酶浓度。本文所述的抗-FXIIa抗体的抑制性活性可通过本领域已知的常规方法测定。

[0056] 可通过测量不同浓度的抗体对反应程度(例如，酶活性)的抑制作用确定抗体的$K_{i,}{}^{app}$值；将作为抑制剂浓度的函数的准一级速率(pseudo-first order rate)常数(v)的变化拟合至修改的Morrison方程式(方程式1)，产生对表观Ki值的评估。对于竞争性抑制剂，从$K_{i,}{}^{app}$对底物浓度的图的线性回归分析提取的y-截距获得Ki^{app}。

[0057] $$v = A \cdot \frac{([E]-[I]-K_i^{app}) + \sqrt{([E]-[I]-K_i^{app})^2 + 4[E]\cdot K_i^{app}}}{2} \qquad (方程式\ 1)$$

[0058] 其中A等于v_o/E，即，在不存在抑制剂(I)的情况下酶促反应的初速度(v_o)除以总酶浓度(E)。

[0059] 在一些实施方案中，本文描述的抗-FXIIa抗体对靶抗原或抗原表位的Ki^{app}值可以为1000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、50、40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5pM或更小。在一些实施方案中，相对于第二靶标(例如，FXII)，抗-FXIIa抗体对第一靶标(例如，FXIIa)可具有较低的Ki^{app}。Ki^{app}的差异(例如，针对特异性或

其它比较)可以是至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000或10^5倍。在一些实施例中,相对于第二抗原(例如,处于第二构象的相同第一蛋白质或其模拟物;或第二蛋白质),抗-FXIIa抗体更好地抑制第一抗原(例如,处于第一构象的第一蛋白质或其模拟物)。在一些实施方案中,可进一步使任何抗-FXIIa抗体亲和力成熟,以降低抗体对靶抗原或其抗原表位的Ki^{app}。

[0060] 本文所述的抗体可以是鼠科、大鼠、人或任何其它来源(包括嵌合或人源化的抗体)。这类抗体不是天然产生的,即,在没有人的作用(例如,用期望的抗原或其片段免疫这类动物)下不能在动物中产生。

[0061] 本文所述的任何抗体可以是单克隆或多克隆的。“单克隆抗体”指同质性(homogenous)抗体群体和“多克隆抗体”指异质性(heterogeneous)抗体群体。这两个术语不限制抗体的来源或制备其的方式。

[0062] 在一个实例中,本文所述的方法中使用的抗体是人源化的抗体。人源化的抗体指非人(例如鼠科)抗体的形式,其是包含最少的源自非人免疫球蛋白序列的特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其抗原结合片段。对于大部分,人源化的抗体是人免疫球蛋白(接受抗体),其中来自接受者的互补决定区域(CDR)的残基被来自非人物种(供体抗体)比如小鼠、大鼠或兔子的具有期望特异性、亲和力和能力的CDR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被相应的非人残基替换。此外,人源化的抗体可包括既不在接受抗体也不在输入的CDR或框架序列中发现的残基,但是所述残基被包括以进一步改善和优化抗体性能。一般而言,人源化的抗体包括基本上所有的至少一个和通常两个可变区,其中所有或基本上所有的CDR区域对应非人免疫球蛋白的那些,且所有的或基本上所有的FR区域是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化的抗体也最佳包括至少一部分免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc),通常为人免疫球蛋白的恒定区或结构域(Fc)。抗体可具有如WO 99/58572中描述的修饰的Fc区域。其它形式的人源化的抗体具有一个或多个相对于初始抗体被改变的CDR(一、二、三、四、五、六个),其也称为“源自”一个或多个来自初始抗体的CDR的一个或多个CDR。人源化的抗体也可参与亲和力成熟。

[0063] 在另一实例中,本文所述的抗体是嵌合抗体,其可包括来自人抗体的重链恒定区和轻链恒定区。嵌合抗体指具有来自第一物种的可变区或部分可变区以及来自第二物种的恒定区的抗体。典型地,在这些嵌合抗体中,轻链和重链二者的可变区模拟源自一种哺乳动物(例如,非人哺乳动物比如小鼠、兔子和大鼠)的抗体的可变区,而恒定部分与源自另一哺乳动物比如人的抗体的序列同源。在一些实施方案中,可对可变区和/或恒定区进行氨基酸修饰。

[0064] 在一些实施方案中,本文描述的抗-FXIIa抗体特异性结合至相应靶抗原或其表位。“特异性地结合”至抗原或表位的抗体是本领域中悉知的术语。如果相比可替代的靶标,一个分子更加频繁、更加迅速、以更长的持续时间和/或以更高的亲和力与特定靶抗原反应,则认为该分子展示“特异性结合”。与抗体与其它物质的结合相比,如果抗体以更高的亲和力、亲合力、更加容易和/或以更长的持续时间结合靶抗原或表位,则该抗体“特异性结合”至该靶抗原或表位。例如,特异性地(或优先地)结合至抗原(FXIIa)或其中的抗原表位的抗体是这样的抗体,所述抗体相比其与其它抗原或相同抗原内的其它表位的结合,与该靶抗原以更高的亲和力、亲合力、更容易和/或以更长的持续时间进行结合。通过该定义也

可理解，例如，特异性结合至第一靶抗原的抗体可以特异性地或优先地结合至第二靶抗原或可以不特异性地或优先地结合至第二靶抗原。由此，“特异性结合”或“优先结合”并非一定要求(尽管其可以包括)专一性结合。在一些实施例中，“特异性地结合”至靶抗原或其表位的抗体可以不结合至其它抗原或相同抗原中的其它表位。在一些实施方案中，本文所述的抗体特异性地结合至FXIIa。在一些实施方案中，本文所述的抗体特异性结合至FXIIa但不结合至FXII。

[0065] 如本文所用的，术语“因子XIIa”或“FXIIa”是指因子XII的活性形式，而术语“因子XII”或“FXII”是指因子XII的前酶或酶原(失活形式)。FXII是单链糖蛋白，分子量约为80kD。一旦激活，FXII被转化成活性形式FXIIa，其含有由二硫键连接的两条链——重链(人FXIIa重链的353个残基)和轻链(人FXIIa轻链的243个残基)。人FXII是由基因F12编码的。人FXII的氨基酸序列在本领域是众所周知的，例如GenBank登录号NP_000496.2。

[0066] 在一些实施方案中，本文所述的抗-FXIIa抗体对于靶抗原(例如FXIIa)或其抗原表位具有合适的结合亲和力。如本文所用，“结合亲和力”指的是表观缔合常数或K_A。K_A是解离常数(K_D)的倒数。对于靶抗原或抗原表位，本文所述的抗-FXIIa抗体可具有至少10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}M或更低的结合亲和力(K_D)。增加的结合亲和力对应于减少的K_D。相对于第二抗原，抗体对第一抗原较高的亲和性结合可以通过相比针对结合第二抗原的K_A(或数值K_D)，针对结合第一抗原的更高的K_A(或更小的数值K_D)来指示。在这类情况中，相对于第二抗原(例如处于第二构象的相同的第一蛋白质或其模拟物;或第二蛋白质)，抗体对第一抗原(例如处于第一构象的第一蛋白质或其模拟物)具有特异性。在一些实施方案中，相比与酶原FXII或pKal信号传导系统中的另外的蛋白质的结合亲和力，本文描述的抗-FXIIa抗体对FXIIa具有更高的结合亲和力(更高的K_A或更小的K_D)。结合亲和力的差异(例如针对特异性或其它比较)可为至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000或10^5倍。在一些实施方案中，可进一步使任何抗-FXIIa抗体亲和力成熟，以提高抗体对靶抗原或其抗原表位的结合亲和力。

[0067] 结合亲和力(或结合特异性)可通过各种方法确定，所述方法包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子体共振或光谱法(例如使用荧光测定)。用于评估结合亲和力的示例性条件是在HBS-P缓冲液(10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、0.005％(v/v)表面活性剂P20)中。这些技术可用于测量随着靶蛋白浓度而变化的结合的结合蛋白的浓度。根据下述方程，结合的结合蛋白的浓度([结合的])通常与游离靶蛋白的浓度([游离的])相关：

[0068] [结合的]＝[游离的]/(Kd+[游离的])

[0069] 但是，并不总是有必要对K_A进行精确测定，因为有时足以获得对亲和力的定量测量，例如使用诸如ELISA或FACS分析所测定的，其与K_A成比例，因此可用于比较，诸如确定较高的亲和力是否是例如2倍，以获得对亲和力的定性测量，或获得对亲和力的推导，例如通过功能测定例如体外测定或体内测定中的活性。

[0070] 在一些实施方案中，抗-FXIIa抗体包含含有重链可变区的重链，所述重链可变区包含重链CDR1、重链CDR2和重链CDR3。在一些例子中，重链CDR3区包含SEQ ID NO:111、112或113的氨基酸序列(见表1)。本文描述的任意抗-FXIIa抗体的重链可变区可进一步包含CDR1区，其包括本文所述的式$X_1YX_3MX_5$(SEQ ID NO:117)；和/或CDR2区，其包括也在本文中

描述的式$X_1IX_3PSGX_7X_8TX_{10}YX_{12}$DSVKG(SEQ ID NO:118)。在一些实施例中,抗-FXIIa抗体包含重链CDR1区,其选自SEQ ID NO:41-73和121(见表1);和/或CDR2区,其选自SEQ ID NO:74-110和122-124。在一些具体实施例中,本文所述的抗-FXIIa抗体的重链可变区包含SEQ ID NO:1-39中任意之一的氨基酸序列。

[0071] 表1提供示例性抗-FXIIa抗体的重链CDR的氨基酸序列。与那些示例性抗-FXIIa抗体具有相同重链CDR1、CDR2和CDR3区的抗体也属于本公开范围。

[0072] 表1:抗-FXIIa抗体的重链CDR序列

[0073]

示例性抗体	CDR1	CDR2	CDR3
M0191-E09	WYSMH (SEQ ID NO: 41)	VIYPSGGKTRYADSVKG (SEQ ID NO: 74)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-H11	QYVMH (SEQ ID NO: 42)	SIWPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO: 75)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0184-F12	WYVMH (SEQ ID NO: 43)	GIWPSGGRTKYADSVKG (SEQ ID NO: 76)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0292-D07	NYVMH (SEQ ID NO: 44)	SIWPSGGKTKYADSVKG (SEQ ID NO: 77)	QRYRGPKYYYYMDA (SEQ ID NO: 112)
M0182-D04	MYTMN (SEQ ID NO: 45)	RIYPSGGKTLYADSVKG (SEQ ID NO: 78)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-F07	QYVMS (SEQ ID NO: 46)	RIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 79)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0183-C03	WYNMH (SEQ ID NO: 47)	YISPSGGKTKYTDSVKG (SEQ ID NO: 80)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0183-H08	RYIMH (SEQ	SIYPSGGVTKYADSVKG	QRYRGPKYYYYMDV

[0074]

	ID NO: 48)	(SEQ ID NO: 81)	(SEQ ID NO: 111)
M0183-D08	RYIMG (SEQ ID NO: 49)	SIYPSGGVTRYADSVKG (SEQ ID NO: 82)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-G03	QYNMV (SEQ ID NO: 50)	RIWPSGGKTTYADSVKG (SEQ ID NO: 83)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-C06	RYVMV (SEQ ID NO: 51)	RIYPSGGMTQYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-F01	WYNMA (SEQ ID NO: 52)	RIYPSGGMTQYADSVKG (SEQ ID NO: 84)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-A03	QYIMH (SEQ ID NO: 53)	SIYPSGGNTKYADSVKG (SEQ ID NO: 85)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-A01	HYVMH (SEQ ID NO: 54)	SIYPSGGLTKYADSVKG (SEQ ID NO: 86)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-H10	WYTMH (SEQ ID NO: 55)	SIYPSGGFTRYADSVKG (SEQ ID NO: 87)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0177-C12	FYHMH (SEQ ID NO: 56)	RIVPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 88)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0184-B04	FYSMH (SEQ ID NO: 57)	RIYPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 89)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0308-H03	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	SIWPSGGKTTYADSVKG (SEQ ID NO: 90)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-D02	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	SIWPSGGFTKYADSVKG (SEQ ID NO: 91)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-G07	FYNMH (SEQ ID NO: 59)	SIYPSGGVTRYADSVKG (SEQ ID NO: 92)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-F06	WYVMH (SEQ ID NO: 43)	SIYPSGGKTSYADSVKG (SEQ ID NO: 93)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-A04	PYIMH (SEQ	VIYPSGSKTNYADSVKG	QRYRGPKYYYYMDV

[0075]

	ID NO: 60)	(SEQ ID NO: 94)	(SEQ ID NO: 111)
M0310-F02	RYTMR (SEQ ID NO: 61)	SIWPSGGMTRYADSVKG (SEQ ID NO: 95)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-B09	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	SIYPSGGLTRYADSVKG (SEQ ID NO: 96)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-G06	WYIMG (SEQ ID NO: 62)	YIYPSGGNTRYADSVKG (SEQ ID NO: 97)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0182-H01	RYVMH (SEQ ID NO: 63)	SIWPSGGMTKYADSVKG (SEQ ID NO: 98)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0178-A08	FYIMG (SEQ ID NO: 64)	RIYPSGGATQYADSVKG (SEQ ID NO: 99)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0184-D01	FYVMG (SEQ ID NO: 65)	RIYPSGGLTQYADSVKG (SEQ ID NO: 100)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0177-A06	FYSMH (SEQ ID NO: 66)	RIYPSGGITSYADSVKG (SEQ ID NO: 101)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-E04	MYIMH (SEQ ID NO: 67)	SIYPSGGMTKYADSVKG (SEQ ID NO: 102)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0191-H09	MYVMH (SEQ ID NO: 68)	SIYPSGGLTKYADSVKG (SEQ ID NO: 103)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-H04	QYVMH (SEQ ID NO: 58)	RIYPSGGLTNYADSVKG (SEQ ID NO: 104)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0192-A03	WYVMQ (SEQ ID NO: 69)	SIYPSGGMTKYADSVKG (SEQ ID NO: 102)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-G08	WYIMG (SEQ ID NO: 62)	RIYPSGGSTHYADSVKG (SEQ ID NO: 105)	QRYRGPRYYYYIDA (SEQ ID NO: 113)
M0192-G05	QYTMV (SEQ ID NO: 70)	RIYPSGGVTQYADSVKG (SEQ ID NO: 106)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0183-B12	WYVMY	RIYPSGGITHYADSVKG	QRYRGPKYYYYMDV

[0076]

	(SEQ ID NO: 71)	(SEQ ID NO: 107)	(SEQ ID NO: 111)
M0308-F04	FYVML (SEQ ID NO: 72)	SIWPSGGVTKYADSVKG (SEQ ID NO: 108)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0182-B04	WYVMQ (SEQ ID NO: 69)	YIYPSGGHTKYADSVKG (SEQ ID NO: 109)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
M0310-F04	RYSMN (SEQ ID NO: 73)	GIYPSGGKTKYADSVKG (SEQ ID NO: 110)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO: 111)
X211-A01 (DX-4012)	QYVMH (SEQ ID NO:58)	SIWPSGGHTRYADSVKG (SEQ ID NO:75)	QRYRGPKYYYYMDV (SEQ ID NO:111)

[0077] 表1所列的示例性抗-FXIIa抗体的重链可变区在下面提供(CDR区以粗体表示)。在其它实施方案中,抗-FXIIa抗体的HC CDR1可以是QYSMH(SEQ ID NO:121),其可以与SEQ ID NO:74的HC CDR2和/或SEQ ID NO:111的HC CDR3组合。在再其它的实施方案中,抗-FXIIa抗体的HC CDR2可以是SIYPSGGKTRYADSVKG(SEQ ID NO:122)、VIWPSGGKTRYADSVKG(SEQ ID NO:123)或VIYPSGGHTRYADSVKG(SEQ ID NO:124),其可以与SEQ ID NO:41的HC CDR1和/或SEQ ID NO:111的HC CDR3组合。在再另外的实施方案中,抗-FXIIa抗体的HC CDR2可以是SIWPSGGHTRYADSVHG(SEQ ID NO:127),其可以与SEQ ID NO:58的HC CDR1和/或SEQ ID NO:111的HC CDR3组合。

[0078] M0191-E09的重链可变区序列(SEQ ID NO:1):

[0079] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYSMHWVRQAPGKGLEWVSVIYPSGGKTRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0080] M0192-H11的重链可变区序列(SEQ ID NO:2):

[0081] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGHTRYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0082] M0184-F12的重链可变区序列(SEQ ID NO:3):

[0083] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMHWVRQAPGKGLEWVSGIWPSGGRTKYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0084] M0292-D07的重链可变区序列(SEQ ID NO:4):

[0085] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGKTKYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDAWGQGTTVTVSS

[0086] M0182-D04的重链可变区序列(SEQ ID NO:5):

[0087] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYTMNWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGKTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0088] M192-F07的重链可变区序列(SEQ ID NO:6):

[0089] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMSWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGVTKYADSVKGRFT

ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0090] M0183-C03的重链可变区序列(SEQ ID NO:7)：

[0091] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYNMHWVRQAPGKGLEWVSYISPSGGKTKYTDSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0092] M0183-H08的重链可变区序列(SEQ ID NO:8)：

[0093] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYIMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGVTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0094] M0183-D08的重链可变区序列(SEQ ID NO:9)：

[0095] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYIMGWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGVTRYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0096] M0192-G03的重链可变区序列(SEQ ID NO:10)：

[0097] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYNMVWVRQAPGKGLEWVSRIWPSGGKTTYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0098] M0310-C06的重链可变区序列(SEQ ID NO:11)：

[0099] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMVWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGMTQYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0100] M0192-F01的重链可变区序列(SEQ ID NO:12)：

[0101] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYNMAWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGMTQYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0102] M0191-A03的重链可变区序列(SEQ ID NO:13)：

[0103] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYIMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGNTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0104] M0192-A01的重链可变区序列(SEQ ID NO:14)：

[0105] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGLTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0106] M0191-H10的重链可变区序列(SEQ ID NO:15)：

[0107] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYTMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGFTRYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0108] M0177-C12的重链可变区序列(SEQ ID NO:16)：

[0109] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYHMHWVRQAPGKGLEWVSRIVPSGGMTRYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0110] M0184-B04的重链可变区序列(SEQ ID NO:17)：

[0111] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYSMHWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGVTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0112] M0308-H03的重链可变区序列(SEQ ID NO:18)：

[0113] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGKTTYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0114] M0192-D02的重链可变区序列(SEQ ID NO:19)：

[0115] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGFTKYADSVKGRFT

ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0116] M0310-G07的重链可变区序列(SEQ ID NO:20)：

[0117] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYNMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGVTRYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0118] M0192-F06的重链可变区序列(SEQ ID NO:21)：

[0119] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGKTSYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0120] M0310-A04的重链可变区序列(SEQ ID NO:22)：

[0121] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYIMHWVRQAPGKGLEWVSVIYPSGSKTNYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0122] M0310-F02的重链可变区序列(SEQ ID NO:23)：

[0123] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYTMRWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGMTRYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGQGTTVTVSS

[0124] M0310-B09的重链可变区序列(SEQ ID NO:24)：

[0125] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGLTRYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGQGTTVTVSS

[0126] M0310-G06的重链可变区序列(SEQ ID NO:25)：

[0127] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYIMGWVRQAPGKGLEWVSYIYPSGGNTRYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0128] M0182-H01的重链可变区序列(SEQ ID NO:26)：

[0129] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGMTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0130] M0178-A08的重链可变区序列(SEQ ID NO:27)：

[0131] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYIMGWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGATQYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0132] M0184-D01的重链可变区序列(SEQ ID NO:28)：

[0133] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYVMGWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGLTQYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0134] M0177-A06的重链可变区序列(SEQ ID NO:29)：

[0135] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYSMHWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGITSYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0136] M0191-E04的重链可变区序列(SEQ ID NO:30)：

[0137] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYIMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGMTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0138] M0191-H09的重链可变区序列(SEQ ID NO:31)：

[0139] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGLTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0140] M0192-H04的重链可变区序列(SEQ ID NO:32)：

[0141] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGLTNYADSVKGRFT

ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0142] M0192-A03的重链可变区序列(SEQ ID NO:33)：

[0143] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMQWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGMTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0144] M0310-G08的重链可变区序列(SEQ ID NO:34)：

[0145] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYIMGWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGSTHYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPRYYYYIDAWGQGTTVTVSS

[0146] M0192-G05的重链可变区序列(SEQ ID NO:35)：

[0147] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYTMVWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGVTQYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0148] M0183-B12的重链可变区序列(SEQ ID NO:36)：

[0149] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMYWVRQAPGKGLEWVSRIYPSGGITHYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0150] M0308-F04的重链可变区序列(SEQ ID NO:37)：

[0151] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFYVMLWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGVTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0152] M0182-B04的重链可变区序列(SEQ ID NO:38)：

[0153] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYVMQWVRQAPGKGLEWVSYIYPSGGHTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0154] M0310-F04的重链可变区序列(SEQ ID NO:39)：

[0155] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYSMNWVRQAPGKGLEWVSGIYPSGGKTKYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0156] X211-A01的重链可变区序列(SEQ ID NO:125)

[0157] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYVMHWVRQAPGKGLEWVSSIWPSGGHTRYADSVKGRFT ISRDNSK

[0158] NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRQRYRGPKYYYYMDVWGKGTTVTVSS

[0159] 本公开还提供本文公开的任何示例性抗-FXIIa抗体的种系化变体(germlined variant)。相对于其亲本抗体对于相应的种系序列,种系化变体在框架区含有一个或多个突变。为了制备种系变体,亲本抗体的重链或轻链可变区序列或其部分(例如,框架序列)可以用作针对抗体种系序列数据库(例如,www.bioinfo.org.uk/abs/、www.vbase2.org或www.imgt.org)的查询(query),以鉴定亲本抗体使用的相应种系序列和种系序列和亲本抗体之间一个或多个框架区中的氨基酸残基变异。然后,可基于种系序列将一个或多个氨基酸取代引入到亲本抗体中,以产生种系化变体。作为例子,克隆X211-A01(DX-4012)是克隆M192-H11的种系变体。如本文所描述的,抗-FXIIa抗体可以为任何抗体形式,包括但不限于完整(即,全长)抗体、其抗原结合片段(诸如Fab、Fab′、F(ab′)2、Fv)和单链抗体。

[0160] 在一些实施方案中,本文所述的任意抗-FXIIa抗体的重链可进一步包含重链恒定区(CH)或其部分(例如,CH1、CH2、CH3或其组合)。重链恒定区可以属于任何合适的来源,例如,人、小鼠、大鼠或兔子。在一个具体实施例中,重链恒定区来自人IgG(γ重链)。下面提供了一个示例性人重链恒定区(SEQ ID NO:119)：

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTL**M**I**S**R**T**P EVTCVVVDVS
[0161] HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

[0162] 粗体表示/下划线表示的残基代表其中可引入突变以增强FcRn结合进而延长血清半衰期的那些残基。

[0163] 在一些实施方案中,抗-FXIIa抗体包含SEQ ID NO:119的重链恒定区。可选地,本文所述抗体的重链恒定区可包含单结构域(例如,CH1、CH2或CH3)或恒定区(例如,SEQ ID NO:119)的任意单结构域的组合。

[0164] 在需要时,本文所述的抗-FXIIa抗体可包含修饰的恒定区。例如,其可包含免疫惰性(例如,不触发补体介导的裂解或不刺激抗体-依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC))的修饰的恒定区。可使用美国专利号5,500,362中公开的方法评估ADCC活性。在其它实施方案中,如Eur.J.Immunol.(1999)29:2613-2624;PCT申请号PCT/GB99/01441;和/或UK专利申请号9809951.8中所述修饰恒定区。

[0165] 在一些实施方案中,本文描述的抗-FXIIa抗体中使用的重链恒定区可包含突变(例如,氨基酸残基取代),以增强抗体期望的特征,例如,提高对新生儿Fc受体(FcRn)的结合活性,从而延长抗体的血清半衰期。已知与FcRn的结合对于维持抗体体内平衡和调节抗体血清半衰期是至关重要的。可在合适的位置(例如,在CH2区中)将一个或多个(例如,1、2、3、4、5或更多)突变(例如,氨基酸残基取代)引入到恒定区中,以增强FcRn结合和延长抗体的半衰期。这样的突变可以在对应于SEQ ID NO:119的145、147和/或149的位置(基于Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Public Health Service,National Institutes of Health,Washington,D.C.报道的编号系统,对应于位置252、254和256)处。也见Dall'Acqua等,J.B.C.,2006,281:23514-23524;Robbie等,Antimicrob.Agents Chemother,2013,57(12):6147;和Dall'Acqua等,J.Immunol.2002 169:5171-5180。如果使用了除SEQ ID NO:119以外的恒定区,则可引入突变的位置可通过如下手段确定:比对该恒定区的氨基酸序列与SEQ ID NO:119,以鉴定对应于感兴趣的位置(例如,SEQ ID NO:119中的位置145、147或149)的位置。可选地,这样的位置可通过公认的编号系统,诸如上述Kabat编号系统来确定。

[0166] 在一些实施例中,在重链恒定区的位置252(SEQ ID NO:119的位置145)的氨基酸残基(例如,甲硫氨酸残基)处引入取代突变,例如M→Y取代。在一些实施例中,在重链恒定区的位置254(SEQ ID NO:119的位置147)处引入取代突变,例如S→T取代。在一些实施例中,在重链恒定区的位置256(SEQ ID NO:119的位置149)处引入取代突变,例如T→E。在一些实施例中,位置256处的苏氨酸被突变成谷氨酸残基。在需要时,可将多个突变(例如,氨基酸取代),例如上述取代的任意组合,引入到重链恒定区中。在具体实施例中,任何抗-FXIIa抗体中使用的修饰的重链恒定区可包含位置252、254和256处的氨基酸取代(例如,M252Y、S254T和T256E;也称为YTE变体)。见,例如,Dall'Acqua等,J.B.C.,2006,281:23514-

23524;Robbie等,Antimicrob.Agents Chemother,2013,57(12):6147;和Dall'Acqua等,J.Immunol.2002 169:5171-5180。下面的氨基酸序列(SEQ ID NO:120)代表示例性修饰的重链恒定区,其具有增强的FcRn结合活性进而具有延长的血清半衰期:

[0167] YTE变体的示例性重链恒定区序列(SEQ ID NO:120):

ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP
KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTL**YI**T**R**E**P** EVTCVVVDVS

[0168] HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK
EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC
LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG

[0169] 在SEQ ID NO:120中相对于SEQ ID NO:119突变的氨基酸残基以粗体显示。

[0170] 本文描述的任意抗-FXIIa抗体可进一步包含轻链,所述轻链包含轻链可变区和任选地轻链恒定区,其可以是本领域已知的任何CL。在一些实施例中,所述CL是κ轻链。在其它实施例中,所述CL是λ轻链。抗体重链和轻链恒定区是本领域熟知的,例如,IMGT数据库(www.imgt.org)或www.vbase2.org/vbstat.php.(这两者通过引用以其整体并入本文)中提供的那些。

[0171] 本文描述的抗-FXIIa抗体可包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:116所示的轻链CDR3(见表2)。在一些实施方案中,抗-FXIIa抗体的轻链可变区可进一步包含SEQ ID NO:114所示的轻链CDR1区(见表2)和/或SEQ ID NO:115所示的轻链CDR2区(见表2)。例如,抗-FXIIa抗体轻链可变区可包含SEQ ID NO:114的轻链CDR1、SEQ ID NO:115的轻链CDR2和SEQ ID NO:116的轻链CDR3。在一个实施例中,轻链可变区包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。可选地,轻链可变区是SEQ ID NO:40的种系变体,其对于相应的种系序列可在一个或多个框架中含有一个或多个突变。相应的种系序列可通过本领域已知的方法以及本文描述的那些方法来鉴定。

[0172] 抗-FXIIa抗体的示例性轻链可变区在下面提供(CDR区以粗体表示)。

[0173] 抗-FXIIa抗体的示例性轻链可变区(SEQ ID NO:40):

[0174] DIQMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEIK

[0175] 抗-FXIIa抗体的示例性轻链可变区(SEQ ID NO:126)

[0176] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPWTFGQGTKVEIK

[0177] 表2:抗-FXIIa抗体的轻链CDR序列

[0178]

	CDR1	CDR2	CD3
示例性抗体	RSSQSLLHSNGYNYLD (SEQ ID NO: 114)	LGSNRAS (SEQ ID NO: 115)	MQALQTPWT (SEQ ID NO: 116)

[0179] 在一些实施方案中,本文描述的抗-FXIIa抗体包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:1-39任意之一的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列。在其它实施方案中,本文描述的抗-FXIIa抗体(例如,X211-A01;aka DX-4012)包含重链可变区,

其包含SEQ ID NO:125的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:126的氨基酸序列。

[0180] 本文所公开的任何示例性抗-FXIIa抗体的功能变体(例如,上述44抗体克隆)也属于本公开范围。在一些实施例中,抗-FXIIa抗体是包含由SEQ ID NO:1-39任意之一提供的重链可变区和由SEQ ID NO:40提供的轻链可变区的抗体的功能变体。功能变体可在抗体的一个或多个CDR区中包含至多5(例如,4、3、2或1)个氨基酸残基变异,并且以基本上类似的亲和力(例如,具有相同数量级的K_D值)结合FXIIa的相同表位。在一个实施例中,氨基酸残基变异是保守氨基酸残基取代。如本文所使用,"保守氨基酸取代"指不改变其中进行氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或尺寸特征的氨基酸取代。可根据本领域普通技术人员已知的改变多肽序列的方法制备变体,诸如汇编这样方法的参考文献中找到的方法,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook,等编辑,第二版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989;或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel,等编辑,John Wiley&Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守取代包括在下述组内的氨基酸间进行的取代:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。

[0181] 在一些实施方案中,抗-FXIIa抗体包含重链CDR和/或轻链CDR序列,所述重链CDR与SEQ ID NO:41-113、SEQ ID NO:121-124和SEQ ID NO:127提供的任何一个重链CDR序列具有至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)同一性,所述轻链CDR序列与SEQ ID NO:114-116提供的至少一个相应的轻链CDR具有至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)同一性。在一些实施方案中,抗-FXIIa抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,所述重链可变区与SEQ ID NO:1-39任意之一的重链可变区具有至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)同一性,所述轻链可变区与SEQ ID NO:40提供的轻链可变区具有至少80%(例如,85%、90%、95%或98%)同一性。

[0182] 使用Karlin和Altschul(Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:5873-77,1993)改良的Karlin和Altschul的算法(Proc.Natl.Acad.Sci.USA87:2264-68,1990),测定两条氨基酸序列的"同一性百分数"。这样的算法被并入到Altschul等(J.Mol.Biol.215:403-10,1990)的NBLAST和XBLAST程序(2.0版本)中。可用XBLAST程序,分数=50,字长=3,进行BLAST蛋白质搜索,以获得与感兴趣的蛋白质分子同源的氨基酸序列。当两个序列之间存在空隙时,可使用如Altschul等(Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997)中描述的空隙化BLAST(Gapped BLAST)。当利用BLAST和空隙化BLAST程序时,可使用各自程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0183] 此外,抗-FXIIa抗体可以包含基于本文实施例5中讨论的晶体结构鉴定的参与与FXIIa的C链相互作用的一个或多个其它残基。这些残基可以位于VH或VL链。实例包括重链可变区中的T28、S30、Q31、W52、P53、S54、G55、G56、H57、R59、N74、R100、Y101、R102、G103、P104、K105、Y106、Y107和Y108,和轻链可变区中的H31、N33、Y35、Y54、L55、N58和T99。

[0184] 本文还提供了靶向FXIIa中的特定残基的抗体。抗体可以优先结合至FXIIa而不结合FXII。在一些实施方案中,特异性结合至FXIIa的抗体与FXIIa的C链的一个或多个残基(例如,至少3、5、8、10、15、20、25、30、35、40或45个)相互作用,所述残基包括L390、Y391、W392、G393、H394、S395、F396、C397、H412、C413、L414、Q415、D416、R432、N433、V456、Y458、H507、F509、E510、G511、A512、E513、Y515、D557、A558、C559、Q560、G561、D562、S563、I584、

S585、W586、G587、S588、G589、C590、G591、D592和G597。根据下面实施例5描述的晶体结构，这些残基被鉴定为与抗-FXIIa抗体的重链可变区和轻链可变区中的一个或多个残基相互作用。

[0185] 示例性人FXIIa的氨基酸序列(SEQ ID NO:128)在下面提供，并且，上述残基以粗体突出显示：

[0186]
1 mrallllgfl lvslestlsi ppweapkehk ykaeehtvvl tvtgepchfp fqyhrqlyhk
61 cthkgrpgpq pwcattpnfd qdqrwgycle pkkvkdhcsk hspcqkggtc vnmpsgphcl
121 cpqhltgnhc qkekcfepql lrffhkneiw yrteqaavar cqckgpdahc qrlasqacrt
181 npclhggrcl eveghrlchc pvgytgafcd vdtkascydg rglsyrglar ttlsgapcqp
241 waseatyrnv taeqarnwgl gghafcrnpd ndirpwcfvl nrdrlsweyc dlaqcqtptq
301 aapptpvspr lhvplmpaqp appkpqpttr tppqsqtpga lpakreqpps ltrngplscg
361 qrlrkslssm trvvgglval rgahpyiaal ywghsfcags liapcwvlta ahclqdrpap
421 edltvvlgqe rrnhscepcq tlavrsyrlh eafspvsyqh dlallrlqed adgscallsp
481 yvqpvclpsg aarpsettlc qvagwghqfe gaeeyasflq eaqvpflsle rcsapdvhgs
541 silpgmlcag fleggtdacq gdsggplvce dqaaerrltl qgiiswgsgc gdrnkpgvyt
601 dvayylawir ehtvs

[0187] 其它示例性FXIIa序列可包括人、小鼠或大鼠FXIIa序列、与这些序列之一或其片段具有80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％或99％同一性的序列。

[0188] 相互作用意思是由两个结合配体(binding partner)形成的复合物中两个残基之间的距离小于预定的值，例如，<6Å、<4Å或<2Å。例如，一个结合配体中的相互作用的残基具有至少一个原子，其与来自复合结构上另一结合配体的残基的至少一个原子具有给定阈值(例如，<6Å、<4Å或<2Å)。相互作用不要求实际结合。提议相互作用的残基参与抗体识别。

[0189] 在一些实施方案中，本文所述的抗体在包括上面列举的一个或多个残基的表位处结合人活性FXIIa。“表位”指靶化合物上由抗体诸如Fab或全长抗体结合的位点。表位可以是线性的，其长度通常是6-15aa。可选地，表位可以是构象的。

[0190] 在一些实施例中，本文所述的特异性结合至FXIIa的抗体结合包含SEQ ID NO:128的以下区段的表位：残基390-397、残基412-416、残基432-433、残基456-458、残基507-515、残基557-563和/或残基584-592。

[0191] 抗-FXIIa抗体的制备

[0192] 可通过本领域已知的任何方法制备如本文所描述的能够结合FXIIa的抗体。见，例如，Harlow和Lane,(1998)Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York。

[0193] 在一些实施方案中，可通过常规的杂交瘤技术制备对靶抗原(例如，FXIIa或其催化结构域)特异性的抗体。任选地与载体蛋白比如KLH连接的全长靶抗原或其片段可用于免疫宿主动物，用于产生结合该抗原的抗体。免疫宿主动物的路线和方案一般按照抗体刺激和生产的既定的常规技术，如本文进一步描述地。用于产生小鼠抗体、人源化抗体和人抗体的一般技术是本领域已知的，并在本文中被描述。考虑任何哺乳动物受试者，包括人或来自其的产生抗体的细胞可被操作，以用作产生哺乳动物，包括人杂交瘤细胞系的基础。典型地，宿主动物腹膜内、肌内、口服、皮下、足底和/或皮内接种一定量的免疫原，包括如本文所描述的免疫原。

[0194] 可从淋巴细胞和永生化的骨髓瘤细胞，使用Kohler,B.和Milstein,C.(1975)Nature 256:495-497或如Buck,D.W.等,In Vitro,18:377-381(1982)改良的一般体细胞杂

交技术制备杂交瘤。可用的骨髓瘤系，包括但不限于X63-Ag8.653和来自美国加州圣地亚哥，细胞分配中心，Salk研究所(Salk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,Calif.,USA)的那些，可用于杂交。一般而言，该技术涉及使用融合剂比如聚乙二醇，或通过本领域技术人员熟知的电学技术，使骨髓瘤细胞和淋巴细胞融合。融合之后，从融合培养基分离细胞并且在选择性生长培养基比如次黄嘌呤-氨蝶呤-胸苷(HAT)培养基上生长，以消除未杂交的亲本细胞。本文所述的任何补充有血清或没有血清的培养基可用于培养分泌单克隆抗体的杂交瘤。作为细胞融合技术的另一可选方案，EBV永生化的B细胞可用于产生本文所述的抗-FXIIa单克隆抗体。如果需要，则扩增和亚克隆杂交瘤，并且通过常规的免疫测定程序(例如，放射免疫测定、酶免疫测定或荧光免疫测定)分析上清液的抗免疫原活性。

[0195] 可用作抗体来源的杂交瘤包括产生能够干扰FXIIa活性的单克隆抗体的亲本杂交瘤的所有衍生物、子代细胞。产生这样的抗体的杂交瘤可在体外或体内使用已知的程序生长。如果需要，单克隆抗体可通过常规的免疫球蛋白纯化程序比如硫酸铵沉淀、凝胶电泳、透析、色谱和超滤从培养基或体液中分离。如果存在非期望的活性，可例如通过使制品在连接至固相的由免疫原制备的吸附剂上运行并且从免疫原洗脱或释放期望的抗体，而去除非期望的活性。使用双功能或衍生化试剂，例如马来酰亚胺苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酸酐、SOCl或R1N＝C＝NR，其中R和R1是不同的烷基基团，用靶抗原或包含缀合至在待免疫的物种中是免疫原性的蛋白质的靶氨基酸序列的片段免疫宿主动物可产生大量的抗体(例如，单克隆抗体)，所述免疫原性的蛋白质是例如钥孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0196] 如果需要，可对感兴趣的抗体(单克隆或多克隆)(例如，通过杂交瘤产生的)测序并且然后多核苷酸序列可克隆至载体，用于表达或增殖。编码感兴趣的抗体的序列可保持在宿主细胞的载体中并且可然后扩增宿主细胞并且冷冻用于进一步使用。可选的，多核苷酸序列可用于遗传操作以“人源化”抗体或改善抗体的亲和力(亲和力成熟)，或其它特征。例如，恒定区可被工程化为更类似的人恒定区，以避免抗体在用于人类的临床试验和治疗时的免疫应答。可期望遗传操作抗体序列，以获得对靶抗原更大的亲和力和抑制FXIIa活性的更大的效力。对本领域技术人员显而易见的是，可对抗体进行一个或多个多核苷酸改变并且仍维持其对靶抗原的结合特异性。

[0197] 在其它实施方案中，可通过使用商业上可得的小鼠获得全人抗体，所述小鼠已经被工程化以表达特定的人免疫球蛋白。被设计为产生更期望的(例如，全人抗体)或更强健的免疫应答的转基因动物也可用于产生人源化的或人抗体。这样的技术的例子是来自Amgen,Inc.的Xenomouse^{RTM}(Fremont,Calif.)和来自Medarex,Inc.的HuMAb-Mouse^{RTM}和TC MouseTM(Princeton,N.J.)。另外可选的的是，抗体可通过噬菌体展示或酵母技术进行重组制备。见，例如，美国专利号5,565,332、5,580,717、5,733,743和6,265,150;以及Winter等，(1994)Annu.Rev.Immunol.12:433-455。可选地，噬菌体展示技术(McCafferty等,(1990)Nature 348:552-553)可用于从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因谱系(gene repertoires)在体外产生人抗体和抗体片段。

[0198] 可经常规方法制备完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段。例如，可通过胃蛋白酶消化抗体分子产生F(ab′)2片段，和可通过还原F(ab′)2片段的二硫键产生Fab片段。

[0199] 可经例如常规的重组技术产生遗传工程化的抗体,比如人源化的抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体。在一个实例中,编码对靶抗原特异性的单克隆抗体的DNA可容易地使用常规的程序(例如,通过使用能够特异性结合编码单克隆抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)分离和测序。杂交瘤细胞用作这样的DNA的优选来源。一旦分离,DNA可被置入一个或多个表达载体中,其然后被转染至宿主细胞比如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞(其否则不能产生免疫球蛋白蛋白质),以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。见,例如,PCT公开号WO 87/04462。然后,可例如通过用人重链和轻链恒定结构域的编码序列代替同源的鼠序列来修饰DNA,Morrison等,(1984)Proc.Nat.Acad.Sci.81:6851,或通过共价结合免疫球蛋白编码序列与非免疫球蛋白多肽的所有或部分编码序列来修饰DNA。以该方式,遗传工程化的抗体,比如"嵌合"或"杂交"抗体,可被制备为具有靶抗原的结合特异性。

[0200] 开发用于产生"嵌合抗体"的技术是本领域熟知的。见,例如,Morrison等(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81,6851;Neuberger等(1984)Nature 312,604;和Takeda等(1984)Nature 314:452。

[0201] 构建人源化的抗体的方法也是本领域熟知的。见,例如,Queen等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:10029-10033(1989)。在一个实例中,亲本非人抗体的VH和VL的可变区根据本领域已知的方法进行三维分子模拟分析。接下来,使用相同分子模拟分析鉴定被预测为对于形成正确的CDR结构是重要的框架氨基酸残基。同时,从任何抗体基因数据库使用亲本VH和VL序列作为搜索查询鉴定具有与亲本非人抗体同源的那些氨基酸序列的人VH和VL链。然后选择人VH和VL受体基因。

[0202] 可用来自亲本非人抗体或其功能变体的CDR区域替换所选择的人受体基因内的CDR区域。当必要时,预测对于和CDR区域相互作用是重要的亲本链的框架区中的残基(见上面说明)可用于取代人受体基因中相应的残基。

[0203] 可经重组技术通过连接编码重链可变区的核苷酸序列和编码轻链可变区的核苷酸序列来制备单链抗体。优选地,将柔性接头并入在两个可变区之间。可选地,可采用针对产生单链抗体描述的技术(美国专利号4,946,778和4,704,692),以产生噬菌体或酵母scFv文库,并且可根据常规程序从库中鉴定对FXIIa特异的scFv克隆。阳性克隆可进行进一步筛选,以鉴定抑制FXIIa活性的那些。

[0204] 可使用本领域熟知的方法表征根据本领域已知的和本文所描述的方法获得的抗体。例如,一种方法是鉴定抗原所结合的表位,或"表位绘图"。有许多本领域已知的方法用于绘图和表征蛋白质上表位的位置,包括解析抗体-抗原复合物的晶体结构、竞争测定、基因片段表达测定和基于合成肽的测定,如例如在Harlow和Lane,Using Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1999中第11章所描述的。在另外的实例中,表位绘图可用于确定抗体所结合的序列。表位可以是线性表位,即包含在单延伸的氨基酸中,或由可能没必要包含在单延伸(初级结构线性序列)中的氨基酸的三维相互作用形成的构象表位。可分离或合成(例如,经重组)不同长度(例如,至少4-6个氨基酸长)的肽并用于抗体的结合测定。在另一实例中,可在系统筛选中,通过使用源自靶抗原序列的重叠肽和通过抗体测定结合,测定抗体所结合的表位。根据基因片段表达测定,使编码靶抗原的开放阅读框随机或通过特异性基因构建进行片段

化,并且测定与待测试抗体的抗原的表达片段的反应性。可例如通过PCR产生基因片段,然后在存在放射性氨基酸的情况下体外转录和翻译成蛋白质。然后通过免疫沉淀和凝胶电泳测定抗体与放射性标记的抗原片段的结合。也可通过使用展示在噬菌体颗粒表面上的随机肽序列大文库(噬菌体文库)鉴定某些表位。可选地,可在简单的结合测定中测试定义的重叠肽片段的文库与测试抗体的结合。在另外的实例中,可进行抗原结合结构域的诱变、结构域交换实验和丙氨酸扫描诱变,以鉴定对于表位结合必要的、足够的和/或必须的残基。例如,可使用其中FXIIa多肽的各种片段已经用来自密切关联、但是抗原性不同的蛋白质(比如神经营养蛋白家族的另一成员)的序列替换(交换)的靶抗原的突变体进行结构域交换实验。通过评估抗体与突变体FXIIa的结合,可评估具体的抗原片段对抗体结合的重要性。

[0205] 可选地,可使用已知结合相同抗原的其它抗体进行竞争测定,以测定抗体是否如其它抗体一样结合相同表位。竞争测定是本领域技术人员熟知的。

[0206] 在一些实施例中,通过下面示例的重组技术制备抗-FXIIa抗体。

[0207] 编码如本文所述的抗-FXIIa抗体的重链和轻链的核酸可以被克隆到一个表达载体中,其中每个核苷酸序列与合适的启动子可操作地连接。在一个实施例中,编码重链和轻链的每个核苷酸序列与独特的启动子可操作地连接。可选地,编码重链和轻链的核苷酸序列可以与单启动子可操作地连接,以便重链和轻链均从相同的启动子表达。必要时,可以在重链和轻链编码序列之间插入内部核糖体进入位点(IRES)。

[0208] 在一些实施例中,编码抗体的两条链的核苷酸序列被克隆到两个载体中,所述载体可以被引入相同或不同的细胞中。当两条链在不同的细胞中表达时,所述链各自可以从表达其的宿主细胞分离,并且分离的重链和轻链可以混合并在允许形成抗体的合适条件下孵育。

[0209] 通常,可使用本领域已知的方法将编码抗体的一条或全部链的核酸序列克隆到合适的表达载体中,所述表达载体与合适的启动子可操作地连接。例如,核苷酸序列和载体可在适合的条件下与限制性内切酶接触,以在每个分子上产生可以互相配对并用连接酶连接在一起的互补末端。可选地,合成核酸连接体可以连接到基因的末端。这些合成连接体含有对应于载体中的特定限制性位点的核酸序列。表达载体/启动子的选择将取决于用于产生抗体的宿主细胞的类型。

[0210] 多种启动子可用于本文所述的抗体的表达,包括但不限于巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子(intermediate early promoter)、诸如鲁斯氏肉瘤病毒LTR、HIV-LTR、HTLV-LTR的病毒性LTR、猿猴病毒40(SV40)早期启动子、大肠杆菌(E.coli)lac UV5启动子和单纯性疱疹tk病毒启动子。

[0211] 也可以使用可调节的启动子。这类可调节的启动子包括利用来自大肠杆菌的lac阻遏物作为转录调节剂以调节携带lac操纵子的哺乳动物细胞启动子的转录的那些可调节的启动子[Brown,M.等,Cell,49:603-612(1987)]、利用四环素阻遏物(tetR)的那些可调节的启动子[Gossen,M.,和Bujard,H.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547-5551(1992);Yao,F.等,Human Gene Therapy,9:1939-1950(1998);Shockelt,P.,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92:6522-6526(1995)]。其它系统包括FK506二聚体、VP16或p65(其利用雌二醇(astradiol)、RU486、二酚米乐甾酮(diphenolmurislerone)或雷帕霉素。可诱导的系统可从Invitrogen、Clontech和Ariad获得。

[0212] 可以使用包括阻遏物的可调节的启动子与操纵子。在一个实施方案中,来自于大肠杆菌的lac阻遏物可作为转录调节剂调节携带lac操纵子的哺乳动物细胞启动子的转录[M.Brown等,Cell,49:603-612(1987)];Gossen和Bujard(1992);[M.Gossen等,Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992)]将四环素阻遏物(tetR)与转录激活剂(VP16)组合以产生tetR-哺乳动物细胞转录激活剂融合蛋白tTa(tetR-VP16),其具有来源于人巨细胞病毒(hCMV)主要即刻早期启动子(major immediate-early promoter)的携带tetO的最小启动子,以产生tetR-tet操纵子系统来控制哺乳动物细胞中的基因表达。在一个实施方案中,使用四环素可诱导开关。四环素阻遏物(tetR)单独地,而不是tetR-哺乳动物细胞转录因子融合衍生物,可作为有效的反式调制剂,以在四环素操纵子正确地布置于CMVIE启动子的TATA元件的下游时调节哺乳动物细胞中的基因表达(Yao等,Human Gene Therapy)。该四环素可诱导开关的一个具体的优势是不需要使用四环素阻遏物-哺乳动物细胞反式激活剂或阻遏物融合蛋白(其在一些情况下对细胞可能是有毒的)(Gossen等,Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992);Shockett等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,92:6522-6526(1995))来实现其调节效果。

[0213] 另外,载体可包含例如以下的一些或所有:可选择的标记基因,诸如用于在哺乳动物细胞中选择稳定转染子或瞬时转染子的新霉素基因;来自人CMV的即刻早期基因的增强子/启动子序列,用于高水平转录;来自SV40的转录终止信号和RNA加工信号,用于mRNA稳定性;SV40多瘤复制起点和ColE1,用于适当的游离基因复制;内部核糖体结合位点(IRESes),通用型多克隆位点;和T7和SP6 RNA启动子,用于有义和反义RNA的体外转录。用于生产包含转基因的载体的合适的载体和方法在本领域是已知的,并且是可以得到的。

[0214] 对实践本文所述的方法有用的多腺苷酸化信号的实例包括但不限于人胶原I多腺苷酸化信号、人胶原II多腺苷酸化信号和SV40多腺苷酸化信号。

[0215] 可以将包含编码任何抗体的核酸的一个或多个载体(例如,表达载体)引入合适的宿主细胞中以产生抗体。宿主细胞可以在表达抗体或其任意多肽链的合适条件下培养。这样的抗体或其多肽链可以通过培养的细胞(例如,来自细胞或培养上清液)经常规方法(例如亲和纯化)回收。如果需要,抗体的多肽链可以在合适的条件被孵育允许产生抗体的一段合适的时间。

[0216] 在一些实施方案中,用于制备本文所述的抗体的方法涉及编码抗-FXIIa抗体的重链和轻链二者的重组表达载体,其也在本文中描述。通过常规方法,例如磷酸钙介导的转染,可以将重组表达载体引入到合适的宿主细胞(例如,dhfr-CHO细胞)中。可以选择阳性转化子宿主细胞,并在允许表达形成抗体的两条多肽链的合适的条件下培养,所述多肽链可以从细胞或从培养基回收。必要时,从宿主细胞中回收的两条链可以在允许形成抗体的合适的条件下孵育。

[0217] 在一个实施例中,提供了两种重组表达载体,一种编码抗-FXIIa抗体的重链,另一种编码抗-FXIIa抗体的轻链。两种重组表达载体均可通过常规方法(例如磷酸钙介导的转染)被引入到合适的宿主细胞(例如,dhfr-CHO细胞)中。可选地,可以将每种表达载体引入到合适的宿主细胞中。可以选择阳性转化子,并在允许表达抗体的多肽链的合适条件下培养。当将两种表达载体引入到相同的宿主细胞中时,其中产生的抗体可以从宿主细胞或培养基中回收。如果需要,可以从宿主细胞或从培养基回收多肽链,然后在允许形成抗体的合

适条件下孵育多肽链。当两种表达载体被引入到不同的宿主细胞中时，其各自均可以从相应的宿主细胞或从相应的培养基回收。然后，两条多肽链可以在形成抗体的合适条件下孵育。

[0218] 标准分子生物学技术被用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化子、培养宿主细胞和从培养基中回收抗体。例如，一些抗体可以通过亲和层析用蛋白质A或蛋白质G偶联基质分离。

[0219] 编码如本文所描述的抗-FXIIa抗体的重链、轻链或两者的任何核酸；含有所述核酸的载体(例如，表达载体)；和包含所述载体的宿主细胞均在本公开的范围内。

[0220] 药物组合物

[0221] 如本文所述的抗体、以及编码核酸或核酸组、包含其的载体或包含所述载体的宿主细胞可以与药学上可接受的载体(赋形剂)混合，以形成用于治疗目标疾病的药物组合物。“可接受的”意指载体必需与组合物的活性成分相容(并且优选地，能够稳定活性成分)，并且对待治疗的受试者是无害的。药学上可接受的赋形剂(载体)，包括缓冲剂，是本领域所熟知的。见例如，Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(2000)，Lippincott Williams and Wilkins,编辑者K.E.Hoover。

[0222] 待在本发明的方法中使用的药物组合物可包含以冻干制剂形式或水溶液形式的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(2000)Lippincott Williams and Wilkins,编辑者K.E.Hoover)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在使用的剂量和浓度下对接受者是无毒的，其可包括缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和蛋氨酸；防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵、六甲氯铵、苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁醇或苄；对羟基苯甲酸烷基酯类诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚)；低分子量(约少于10个残基)多肽；蛋白质，诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖类、二糖类和其它糖类，包括葡萄糖、甘露糖或葡聚糖；螯合剂诸如EDTA；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；形成盐的抗衡离子诸如钠；金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物)；和/或非离子表面活性剂诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0223] 在一些实施例中，本文所述的药物组合物包含含有抗体(或编码核酸)的脂质体，其可以通过本领域已知的方法制备，诸如在Epstein,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:3688(1985)；Hwang,等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030(1980)；和美国专利号4,485,045和4,544,545中所述的方法。在美国专利号5,013,556中公开了具有延长的循环时间的脂质体。特别有用的脂质体可由反相蒸发法用包含磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG衍生化的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。脂质体通过具有定义的孔隙尺寸的过滤器挤出，以产生具有预期直径的脂质体。

[0224] 抗体或编码核酸也可以被包在微胶囊中，所述微胶囊例如通过凝聚技术或通过界面聚合法(例如分别是羟甲基纤维素或明胶-微胶囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳剂、纳米粒子和纳米胶囊)或在粗乳液中制备。这类技术在本领域是已知的，见例如Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Mack Publishing(2000)。

[0225] 在其它实施例中，本文所述的药物组合物可以以缓释形式被配制。缓释制剂的合适的实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半渗透性基质，该基质的形式是具有一定形状的制品，例如膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸和7-乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-醋酸乙烯酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物，诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林组成的可注射的微球)、蔗糖醋酸异丁酸酯和聚-D-(-)-3-羟丁酸。

[0226] 用于体内施用的药物组合物必须是无菌的。这容易通过例如经无菌过滤膜过滤而实现。治疗用抗体组合物通常被放置在具有无菌入口的容器中，例如静脉内溶液袋或具有塞子的小瓶，该塞子可被皮下注射针头穿透。

[0227] 本文所述的药物组合物可以是单位剂型，诸如片剂、丸剂、胶囊剂、粉剂、颗粒剂、溶液或悬液、或栓剂，用于口服、肠胃外或直肠施用，或用于通过吸入或吹入施用。

[0228] 为了制备固体组合物诸如片剂，主要活性成分可以与药物载体(例如常规的压片成分，诸如玉米淀粉、乳糖、蔗糖、山梨醇、滑石、硬脂酸、硬脂酸镁、磷酸氢钙或树胶)和其它药物稀释剂例如水混合以形成含有本发明的化合物或其无毒的药学上可接受的盐的均匀混合物的固体预制剂组合物。当提到这些预制剂组合物是均匀的时，意指活性成分均匀地分散在整个组合物中，以便组合物可以容易地被再分成相等的有效单位剂型诸如片剂、丸剂和胶囊剂。然后该固体预制剂组合物被再分成含有从0.1到约500mg的本发明的活性成分的上述类型的单位剂型。新型组合物的片剂或丸剂可被包衣或以其它方式被化合，以提供带来长效优点的剂型。例如，片剂或丸剂可包含内剂量组分和外剂量组分，后者的形式为前者上的包膜。这两种组分可以被肠溶层隔开，所述肠溶层用于抵抗胃中的崩解，从而允许内组分完整地进入十二指肠或延迟释放。多种材料可用于这类肠溶层或包衣，这类材料包括多种聚合酸和聚合酸与这类材料如虫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素的混合物。

[0229] 合适的表面活性剂包括(尤其包括)非离子剂诸如聚氧乙烯脱水山梨糖醇(例如Tween™20、40、60、80或85)和其它脱水山梨糖醇类(例如Span™20、40、60、80或85)。具有表面活性剂的组合物方便地包含0.05％至5％之间的表面活性剂，其可以是0.1％至2.5％之间。应该理解，如果必要的话，可以添加其它成分例如甘露醇或其它药学上可接受的载体。

[0230] 合适的乳剂可以利用商业上可获得的脂肪乳剂(诸如英脱利匹特™(Intralipid™)、乐补欣™(Liposyn™)、Infonutrol™、力保肪宁™(Lipofundin™)和Lipiphysan™)制备。活性成分可以在预先混合的乳剂组合物中溶解，或可选地，活性成分可溶解在油(例如大豆油、红花油、棉花籽油、芝麻油、玉米油或杏仁油)和当与磷脂(例如卵磷脂、大豆磷脂或大豆卵磷脂)和水混合后形成的乳剂中。应该理解，可以添加其它成分例如甘油或葡萄糖，以调节乳剂的张力。合适的乳剂通常包含多达20％的油，例如在5％和20％之间。脂肪乳剂可包含0.1至1.0.im之间的脂肪滴，尤其是0.1至0.5.im之间的脂肪滴，并且具有5.5至8.0的pH范围。

[0231] 乳剂组合物可以是通过使抗体和Intralipid™或其组分(大豆油、卵磷脂、甘油和水)混合而制备的那些乳剂组合物。

[0232] 用于吸入或吹入的药物组合物包括在药学上可接受的水性溶剂或有机溶剂或其混合物中的溶液或悬液，和粉末。液体或固体组合物可包含上述合适的药学上可接受的赋

形剂。在一些实施方案中，为了局部或全身作用，组合物通过口腔或鼻呼吸途径施用。

[0233] 优选的无菌的药学上可接受的溶剂中的组合物可用气体雾化。雾化的溶液可以直接从雾化器中呼吸，或雾化器可以附着在面罩、帐篷(tent)或间歇式正压呼吸机上。溶液、悬液或粉剂组合物可从以适当方式递送制剂的设备，优选地经口腔或鼻施用。

[0234] 治疗方法

[0235] 本文所述的任何抗体以及编码核酸或核酸组、包含其的载体或包含所述载体的宿主细胞可用于治疗与异常接触系统激活有关的疾病或病症，包括与接触系统激活有关的疾病、与异常接触系统激活有关的疾病(例如，HAE)或眼病。

[0236] 为了实践本文所公开的方法，可将有效量的本文所述的药物组合物通过合适的途径(诸如静脉内施用，例如作为丸剂或通过在一段时间内连续输注，经由肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口腔、吸入或局部途径)施用至需要治疗的受试者(例如人类)。用于液体制剂的商业上可用的雾化器(包括喷气式雾化器和超声雾化器)可用于给药。液体制剂可直接被雾化，并且冻干粉末在重构后可以被雾化。可选地，本文所述的抗体可利用碳氟化合物制剂和定量吸入器被气雾化，或作为冻干粉末和磨碎的粉末被吸入。

[0237] 待通过本文所述的方法治疗的受试者可以是哺乳动物，更优选地是人。哺乳动物包括但不限于农场动物、运动动物、宠物、灵长类动物、马、狗、猫、小鼠和大鼠。需要治疗的人受试者可以是患有目标疾病/病症(诸如遗传性血管性水肿(HAE)、血栓形成或眼病)、处于患目标疾病/病症风险的或被怀疑患有目标疾病/病症的人患者。患有目标疾病或病症的受试者可以通过常规医学检验(例如实验室测试、器官功能测试、CT扫描或超声)而被鉴定。被怀疑患有任何这类疾病/病症的受试者可能表现出该疾病/病症的一种或多种症状。处于该疾病/病症风险的受试者可以是具有该疾病/病症的一种或多种风险因素的受试者。

[0238] 本文所述的方法和组合物可用于治疗与接触系统激活和/或pKal信号传导途径有关的任何疾病或病症。在一些实施方案中，目标疾病是血栓形成，包括与心房颤动相关的血栓形成、DVT、肺栓塞、中风或其它动脉或静脉血栓性事件。血栓形成(例如，静脉血栓形成或动脉血栓形成)是指在血管内血块的形成，其可阻碍血液通过循环系统流动。可以通过常规医疗程序来鉴定具有血栓形成的受试者或处于血栓形成风险的受试者。

[0239] 在其它实施方案中，可通过本文描述的抗-FXIIa抗体治疗的疾病可以是与激肽释放酶系统(例如，pKal系统)有关的疾病，包括但不限于黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、高血压性视网膜病、年龄相关性黄斑变性和视网膜静脉阻塞。与接触激活系统有关的疾病或病症的实例包括但不限于类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病关节炎、银屑病、系统性红斑狼疮、系统性红斑狼疮性肾炎、系统性肥大细胞增多症、痛风、肠道疾病、口腔黏膜炎、神经性疼痛、炎性疼痛、椎管狭窄退行性脊椎病、动脉或静脉血栓形成、术后肠梗阻、主动脉瘤、血管炎、水肿、获得性血管性水肿、特发性血管性水肿、过敏性反应(anaphylasxis)、特发性过敏性反应、脑水肿、肺栓塞、中风、心室辅助设备或支架上的凝血、与留置导管或经外周静脉置入中心静脉导管的使用有关的凝血、与体外肺膜氧合器的使用有关的凝血、与移植物或透析用瘘管的使用有关的凝血、头部创伤或瘤周脑水肿、脓毒症、急性大脑中动脉(MCA)缺血性事件(中风)、再狭窄(例如，血管成形术之后)或烧伤。

[0240] 在一些实施方案中，可通过本文描述的抗-FXIIa抗体治疗的疾病是与接触激活系统有关的眼病，包括但不限于黄斑水肿、糖尿病性视网膜病、高血压性视网膜病、年龄相关

性黄斑变性和视网膜静脉阻塞。

[0241] 在一个实施例中,涉及接触系统激活的疾病或病状是遗传性血管性水肿(HAE)。遗传性血管性水肿(HAE)也称为“Quincke水肿”、C1酯酶抑制剂缺乏、C1抑制剂缺乏和遗传性血管神经性水肿(HANE)。HAE的特征在于严重肿胀的复发性发作(血管性水肿),其可影响,例如,四肢、面部、生殖器、胃肠道和气管。HAE的症状包括,例如,臂、腿、嘴唇、眼睛、舌头和/或喉咙的肿胀;可涉及喉咙肿胀和突然嘶哑的气管阻塞;没有明显原因的腹部绞痛的重复发作;和/或肠道的肿胀,其可能是严重的并且可导致腹部绞痛、呕吐、脱水、腹泻、疼痛和/或休克。患有该HAE的约三分之一的个体在发作期间发展出一种称为边缘性红斑的非痒皮疹。

[0242] 气道的肿胀可能是威胁生命的并且造成一些患者的死亡。估计死亡率是15-33%。HAE每年导致约15,000-30,000次急诊科的就诊。

[0243] 创伤或应激,例如,牙科手术、疾病(例如,病毒性疾病比如感冒和流感)、月经和外科手术可引发血管性水肿的发作。为了防止HAE的急性发作,患者可努力避免先前已经造成发作的特定刺激。但是,在许多情况下,在没有已知触发物的情况下发生发作。典型地,HAE症状第一次出现在童年并且在青春期加重。平均而言,未治疗的个体每1至2周发作,并且大部分发作持续约3至4天(ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)。发作的频率和持续时间在患有遗传性血管性水肿的人中间,甚至在相同家族的人中间有很大差异。

[0244] 有三种类型的HAE,称为I型、II型和III型。据估计,HAE在50,000人中影响1人,I型约占病例的85%,II型约占病例的15%,III型非常罕见。III型是最新描述的形式,最初被认为只发生在女性中,但已确定有受影响男性的家族。

[0245] HAE是以常染色体显性模式遗传,使得受影响的人可从一个受影响的亲代继承突变。也可出现基因的新突变,因此HAE也可出现于在家族中没有该疾病史的人中。据评估,20-25%的病例由新的自发突变导致。

[0246] SERPING1基因的突变造成I型和II型遗传性血管性水肿。SERPING1基因提供了用于制备对控制炎症重要的C1抑制剂蛋白质的指导。C1抑制剂阻碍了促进炎症的某些蛋白质的活性。引起I型遗传性血管性水肿的突变导致了血液中C1抑制剂的水平下降。相反,引起II型的突变导致产生功能异常的C1抑制剂。在没有适当水平的功能性C1抑制剂的情况下,产生过量的缓激肽。通过增加经过血管壁进入身体组织的流体的渗漏,缓激肽促进炎症。流体在身体组织中的过多积聚引起患有I型和II型遗传性血管性水肿的个体中见到的肿胀的发作。

[0247] F12基因中的突变与一些III型遗传性血管性水肿(也称为具有正常C1抑制剂的HAE)病例相关。F12基因提供了制备凝血FXII的指导。除了在血液凝结(凝血)中起到关键作用,因子XII也是重要的炎症的刺激剂并且参与缓激肽的产生。F12基因中的某些突变导致产生具有增加活性的因子XII。结果,产生更多的缓激肽并且血管壁变得更加渗漏,这引起肿胀的发作。III型遗传性血管性水肿的其它病例的原因仍是未知的。一个或多个仍未鉴定的基因的突变可能是造成这些病例中的疾病的原因。

[0248] HAE可呈现与源自变态反应或其它医学病况的其它形式的血管性水肿的相似性,但是病因和治疗明显的不同。当遗传性血管性水肿误诊为过敏时,其最通常用一般对HAE无

效的抗组胺剂、类固醇和/或肾上腺素治疗，但是肾上腺素可用于威胁生命的反应。误诊也已经导致患腹部肿胀的患者不必要的试探性外科手术，并且在一些HAE患者中腹部疼痛已经被错误地诊断为身心失调。

[0249] 可例如使用问卷，例如，通常由患者、临床医生或家庭成员完成的问卷，评估HAE的症状。这样的问卷是本领域已知的并且包括，例如，视觉模拟评分法。见，例如，McMillan，C.V.等，Pateint.2012;5(2):113-26。

[0250] 如本文所用的，“有效量”是指单独或与一种或多种其它活性剂组合时为受试者提供治疗效果所需的每种活性剂的量。在一些实施方案中，治疗效果是降低的FXIIa活性、降低的pKal或缓激肽的量或降低的血管舒张。相比也结合FXII的抗体抑制剂，特异性结合FXIIa而不结合FXII的抗体抑制剂可要求较低的有效剂量。确定抗体的量是否实现治疗效果对于本领域技术人员而言是显而易见的。如本领域技术人员所认识到的，有效量的变化取决于所治疗的具体病状、病状的严重程度、个体患者参数(包括年龄、身体状况、尺寸、性别和体重)、治疗的持续时间、同步治疗的性质(如果有的话)、具体给药途径以及在健康从业者知识和专业内的类似的因素。这些因素是本领域普通技术人员所熟知的，并且可仅仅通过常规实验而得到处理。通常优选使用单组分或其组合的最大剂量，即根据合理医学判断的最高安全剂量。

[0251] 经验上的考虑，诸如半衰期通常会有助于剂量的确定。例如，可以使用与人免疫系统相容的抗体(诸如人源化抗体或完全人抗体)来延长抗体的半衰期并防止抗体被宿主的免疫系统攻击。可以在治疗过程中确定和调整给药频率，其通常(但不一定)基于目标疾病/病症的治疗和/或抑制和/或改善和/或延迟。可选地，抗体的持续连续释放制剂可能是合适的。用于实现缓释的各种制剂和装置是本领域已知的。

[0252] 在一个实施例中，本文所述的抗体的剂量可以在被给予一次或多次抗体施用的个体中经经验确定。给予个体增量剂量的拮抗剂。为了评估拮抗剂的功效，可以随后施用疾病/病症的指示剂。

[0253] 通常，为了施用本文所述的任何抗体，初始候选剂量可以为约2mg/kg。为了本公开的目的，典型的日剂量的范围可以为约0.1μg/kg至3μg/kg至30μg/kg至300μg/kg至3mg/kg、至30mg/kg至100mg/kg或更多中的任何一个，这取决于上述因素。对于几天内或更长时间内的重复施用(取决于病状)，治疗持续到发生所期望的症状抑制或持续到达到足够的治疗水平以减轻目标疾病或病症或其症状为止。示例性的剂量方案包括施用约2mg/kg的初始剂量，随后每周维持剂量为约1mg/kg的抗体，或随后每隔一周的维持剂量为约1mg/kg。然而，其它剂量方案可能是有用的，这取决于从业者希望实现的药代动力学衰减的模式。例如，考虑每周给药一次至四次。在一些实施方案中，可以使用的剂量范围为约3μg/mg至约2mg/kg(诸如约3μg/mg、约10μg/mg、约30μg/mg、约100μg/mg、约300μg/mg、约1mg/kg和约2mg/kg)。在一些实施方案中，给药频率是每周一次、每2周一次、每4周一次、每5周一次、每6周一次、每7周一次、每8周一次、每9周一次或每10周一次；或每月一次、每2个月一次或每3个月一次或更长时间一次。通过常规技术和测定容易地监测该疗法的进展。给药方案(包括使用的抗体)可随时间变化。

[0254] 在一些实施方案中，对于正常体重的成年患者，可施用约0.3至5.00mg/kg范围的剂量。在一些实施例中，本文所述的抗-FXII抗体(例如，DX-4012)的剂量可以是10mg/kg。具

体的剂量方案，即剂量、时间和重复，将取决于具体个体和该个体的病史以及各种药剂的性质(诸如药剂的半衰期以及本领域熟知的其它考虑)。

[0255] 为了本公开的目的，本文所述的抗体的合适剂量将取决于所使用的特异性抗体、抗体和/或非抗体肽(或其组合物)、疾病/病症的类型和严重程度、抗体是用于预防目的被施用还是用于治疗目的被施用、以前的治疗、患者的临床病史和对拮抗剂的反应以及主治医师的判断。通常，临床医生将施用抗体，直到达到实现期望结果的剂量。在一些实施方案中，期望的结果是血栓形成减少。确定剂量是否导致期望结果的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。一种或多种抗体的施用可以是连续的或间歇的，这取决于例如接受者的生理状况、施用的目的是治疗性还是预防性的以及熟练从业者已知的其它因素。抗体的施用可以在预选的时间段内基本上连续，或可以是一系列间隔剂量，例如在发展目标疾病或病症之前、期间或之后。

[0256] 如本文所用，术语“治疗”是指将包含一种或多种活性剂的组合物应用或施用于具有目标疾病或病症、具有该疾病/病症的症状或对该疾病/病症易感的受试者，目的是治疗、治愈、减轻、缓解、改变、医治、改善、改良或影响病症、疾病的症状、或对疾病或病症易感。

[0257] 减轻目标疾病/病症包括延缓疾病的发展或进展，或降低疾病严重程度。减轻疾病并不一定需要有疗效的结果。如其中所使用的，“延迟”目标疾病或病症的发展意味着推迟、阻碍、减缓、妨碍、稳定和/或延缓疾病进展。这种延迟可以有不同的时间长度，这取决于疾病的历史和/或被治疗的个体。一种“延迟”或减轻疾病发展或延迟疾病发病的方法是，与未使用该方法比较时，在给定的时间范围内降低发展一种或多种疾病症状的可能性和/或在给定的时间范围内降低症状程度的方法。这种比较通常基于临床研究，其使用足以给出统计学显著结果的多个受试者。

[0258] 疾病的“发展”或“进展”意指疾病的初始表现和/或随后的进展。可以使用本领域熟知的标准临床技术检测和评估疾病的发展。然而，发展也指可能无法检测的进展。为了本公开的目的，发展或进展是指症状的生物学过程。“发展”包括发生、复发和发病(onset)。如本文所用，目标疾病或病症的“发病”或“发生”包括初始发病和/或复发。

[0259] 在一些实施方案中，将本文所述的抗体以足以在体内抑制一种或两种靶抗原的活性至少20％(例如30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更高)的量施用于需要治疗的受试者。在其它实施方案中，抗体以有效降低靶抗原的活性水平至少20％(例如，30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％或更高)的量被施用。

[0260] 根据待治疗的疾病的类型或疾病的部位，可以使用医学领域的普通技术人员已知的常规方法向受试者施用药物组合物。该组合物还可以通过其它常规途径施用，例如经口服、肠胃外、通过吸入喷雾、局部、直肠、鼻、口腔、阴道或经由植入的储库(reservoir)给药。本文所用的术语“肠胃外”包括皮下、皮内、静脉内，肌肉内、关节内、动脉内、滑膜内、胸骨内、鞘内、病灶内和颅内注射或输注技术。此外，其可以通过可注射的贮库(depot)给药途径施用于受试者，诸如使用1-、3-或6月贮库可注射的或可生物降解的材料和方法。在一些实施例中，药物组合物经眼内或经玻璃体内施用。

[0261] 可注射组合物可含有各种载体诸如植物油、二甲基乙酰胺(dimethylactamide)、二甲基甲酰胺、乳酸乙酯、碳酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、乙醇和多元醇(甘油、丙二醇、液体聚乙二醇等)。对于静脉内注射，可以通过滴注法施用水溶性抗体，由此输注含有抗体和生理

学上可接受的赋形剂的药物制剂。生理学上可接受的赋形剂可包括例如5％右旋糖、0.9％生理盐水、林格氏溶液或其它合适的赋形剂。肌肉内制剂例如抗体的合适的可溶性盐形式的无菌制剂可以在药物赋形剂例如注射用水、0.9％生理盐水或5％葡萄糖溶液中被溶解并施用。

[0262] 在一个实施方案中，通过位点特异性或靶向局部递送技术施用抗体。位点特异性或靶向局部递送技术的实例包括抗体的各种可植入的贮库源或局部递送导管(诸如输注导管、留置导管或针导管)、合成移植物，外膜包裹物，分流器和支架或其它可植入的设备、位点特异性载体、直接注射或直接应用。见例如PCT公开号WO 00/53211和美国专利号5,981,568。

[0263] 还可以使用含有反义多核苷酸、表达载体或亚基因组多核苷酸的治疗组合物的靶向递送。受体介导的DNA递送技术在以下中被描述：例如，Findeis等，Trends Biotechnol.(1993)11:202；Chiou等，Gene Therapeutics:Methods And Applications Of Direct Gene Transfer(J.A.Wolff编辑)(1994)；Wu等，J.Biol.Chem.(1988)263:621；Wu等，J.Biol.Chem.(1994)269:542；Zenke等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1990)87:3655；Wu等，J.Biol.Chem.(1991)266:338。

[0264] 含有多核苷酸(例如编码本文所述的抗体的那些)的治疗组合物在约100ng至约200mg的DNA范围内被施用，用于在基因治疗方案中局部施用。在一些实施方案中，约500ng至约50mg、约1μg至约2mg、约5μg至约500μg和约20μg至约100μg或更大的DNA浓度范围也可在基因治疗方案中使用。

[0265] 本文所述的治疗性多核苷酸和多肽可以使用基因递送载体递送。基因递送载体可以是病毒或非病毒来源的(一般见Jolly，Cancer Gene Therapy(1994)1:51；Kimura，Human Gene Therapy(1994)5:845；Connelly，Human Gene Therapy(1995)1:185；和Kaplitt，Nature Genetics(1994)6:148)。可以使用内源性哺乳动物或异源性启动子和/或增强子来诱导这类编码序列的表达。编码序列的表达可以是组成型的或调控型的。

[0266] 用于递送期望的多核苷酸和在期望的细胞中表达的基于病毒的载体是本领域熟知的。基于病毒的载体的实例包括但不限于重组逆转录病毒(见例如PCT公开号WO 90/07936；WO 94/03622；WO 93/25698；WO 93/25234；WO 93/11230；WO 93/10218；WO 91/02805；美国专利号5,219,740和4,777,127；英国专利号2,200,651；和欧洲专利号0345242)、基于甲病毒属的载体(例如辛德毕斯病毒(Sindbis virus)载体，塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus)(ATCC VR-67；ATCC VR-1247)、罗斯河病毒(Ross River virus)(ATCC VR-373；ATCC VR-1246)和委内瑞拉马脑炎病毒(ATCC VR-923；ATCC VR-1250；ATCC VR 1249；ATCC VR-532)和腺伴随病毒(AAV)载体(见例如PCT公开号WO 94/12649；WO 93/03769；WO 93/19191；WO 94/28938；WO 95/11984和WO 95/00655)。也可应用Curiel，Hum.Gene Ther.(1992)3:147中所述的连接至杀伤的腺病毒的DNA的施用。

[0267] 也可以使用非病毒递送载体和方法，包括但不限于与杀伤的腺病毒单独连接或未连接的聚阳离子缩合DNA(见例如Curiel，Hum.Gene Ther.(1992)3:147)；配体连接的DNA(见例如Wu，J.Biol.Chem.(1989)264:16985)；真核细胞递送载体细胞(见例如美国专利号5,814,482；PCT公开号WO 95/07994；WO 96/17072；WO 95/30763和WO 97/42338)和核电荷中和或与细胞膜融合。也可以使用裸DNA。示例性的裸DNA引入方法在PCT公开号WO 90/

11092和美国专利号5,580,859中描述。可以作为基因递送载体的脂质体在美国专利号5,422,120;PCT公开号WO 95/13796;WO 94/23697;WO 91/14445和欧洲专利号0524968中描述。另外的方法在Philip,Mol.Cell.Biol.(1994)14:2411和Woffendin,Proc.Natl.Acad.Sci.(1994)91:1581中描述。

[0268] 在本文描述的方法中使用的特定剂量方案,即剂量、时间和重复,将取决于特定受试者和该受试者的病史。

[0269] 在一些实施方案中,可将多于一种抗体、或抗体与另一种合适的治疗剂的组合施用于需要治疗的受试者。抗体也可以与用于增强和/或补充药剂的有效性的其它药剂连同使用。

[0270] 目标疾病/病症的治疗效果可以通过本领域熟知的方法进行评估。

[0271] 用于减轻与接触系统激活有关的疾病的试剂盒

[0272] 本公开还提供用于减轻与接触系统激活有关的疾病/病症(诸如HAE)的试剂盒。这样的试剂盒可包括一个或多个含有抗-FXIIa抗体(例如本文所述的任何抗-FXIIa抗体)的容器。

[0273] 在一些实施方案中,试剂盒可以包括根据本文所述的任何方法使用的说明书。所包括的说明书可以包括施用抗-FXIIa抗体来治疗、延缓发病或减轻本文所述的那些目标疾病的描述。该试剂盒可以进一步包括关于基于鉴定该个体是否患有目标疾病来选择适合于治疗的个体的描述。在其它实施方案中,说明书包括关于向处于目标疾病风险的个体施用抗体的描述。

[0274] 涉及使用抗-FXIIa抗体的说明书通常包括关于预期治疗的剂量、给药方案和给药途径的信息。容器可以是单位剂量、批量包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。在本发明的试剂盒中提供的说明书通常是在标签或包装插入物(例如,试剂盒中包括的纸张)上的书面说明书,但是机器可读说明书(例如,磁性或光学存储磁盘上携带的说明书)也是可以接受的。

[0275] 标签或包装插入物指示组合物用于治疗、延缓发病和/或减轻与pKal信号传导途径有关的疾病或病症,诸如HAE。可以提供说明书来实施本文所述的任何方法。

[0276] 本发明的试剂盒是在合适的包装内。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、罐、软包装(例如密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。还考虑用于与特定装置组合使用的包装,诸如吸入器、鼻给药装置(例如雾化器)或诸如微型泵的输注装置。试剂盒可以具有无菌进入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针穿透的塞子的小瓶)。容器还可以具有无菌进入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针穿透的塞子的小瓶)。组合物中至少一种活性剂是如本文所述的抗-FXIIa抗体。

[0277] 试剂盒可以任选地提供额外的组分,诸如缓冲物和解释信息。通常,该试剂盒包括容器和在容器上或与容器连接的标签或包装插入物。在一些实施方案中,本发明提供了包括上述试剂盒的内容物的制品。

[0278] 常规技术

[0279] 除非另有说明,本发明的实践将采用在本领域技术范围内的分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术。这些技术在文献中得到充分解释,所述文献诸如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook,等,

1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait,编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis,编辑,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney,编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue CulturE:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell,编辑,1993-8)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell,编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos,编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel,等,编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis,等,编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等,编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practical approach(D.Catty.,编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean,编辑,Oxford University Press,2000);Using antibodies:a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra,编辑,Harwood Academic Publishers,1995)。

[0280] 在没有进一步的详细阐述的情况下,相信本领域技术人员可以基于上述描述最大限度地利用本发明。因此,以下具体实施方案将被解释为仅仅是说明性的,而不是以任何方式限制本公开的其余部分。本文引用的所有出版物通过引用并入本文,用于本文的目的或用于本文所涉及的主题。

实施例

[0281] 实施例1:抗-FXIIa抗体的产生

[0282] 利用固定在包被链霉抗生物素蛋白的小珠上的FXIIa的生物素化的β片段,进行使用戴埃克斯(Dyax)的FAB310噬菌粒文库的噬菌体展示技术筛选。分离结合至固定的FXIIa的Fab分子。选择产生了选择性Fab抑制剂,其以800pM的Ki^{app}特异性地结合至FXIIa的催化结构域。分离的Fab对于以1μM浓度测试的下列蛋白酶不显示交叉反应性:尿激酶纤溶酶原激活剂、肝细胞生长因子激活剂、激活的蛋白质C、组织蛋白酶G、C1、弹性蛋白酶、因子VIIa、因子Xa、因子XIa、纤溶酶、α-凝血酶、胰蛋白酶、尿激酶、血浆激肽释放酶、肝细胞生长因子激活剂和尿激酶型纤溶酶原激活剂。

[0283] 经多种策略使分离的Fab(M71-F06)亲和力成熟,所述策略包括重链CDR1/2替换(shuffling)、轻链替换、重链CDR3摆动(wobble)和重链CDR3摆动和重链CDR1/2替换的组合。通过如下手段构建重链CDR1/2替换文库:去除M71-F06的CDR1/2区,并用全文库分异度(diversity)替换它,以制备分异度为～10^8的亲和力成熟文库。使重链CDR3与M71-F06的亲本CDR3序列在每个氨基酸位置都不同,以产生新的文库,其随后也与HC CDR1/2替换分异度组合。使用这些文库进行第二选择。与用针对天然文库选择使用的固定的FXIIa进行的选择相反,在溶液中以低于亲本Ki^{app}的浓度将亲和力成熟文库与生物素化的靶标一起孵育。生物素化的FXIIa和来自文库的任何结合的Fab随后被下拉到链霉抗生物素包被的珠子上。图

2示出了用于鉴定和产生抗-FXIIa抗体的选择策略的示意图。

[0284] 如通过下面实施例2中描述的“体外”活性测定所测量的克隆M71-F06针对人和小鼠FXIIa的抑制性活性显示在图4中。克隆M71-F06相比DX-2930的APTT值(见下面实施例2)显示在图5中。结果还表明,克隆M71-F06对激活的蛋白C、CCC 1、组织蛋白酶G、弹性蛋白酶、因子VIIa、因子Xa、因子Xia、激活的血浆激肽释放酶、纤溶酶、α-凝血酶、胰蛋白酶、尿激酶、HGFA和uPA没有抑制性活性,从而表明其抑制性活性对FXIIa是特异性的。

[0285] 来自选择的任何分离的Fab均通过ELISA筛选,得到39个独特的分离株。上面提供了重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。预期这些克隆与亲本克隆具有相同的抗原结合活性和特异性,并具有更高的结合亲和力。

[0286] 实施例2:抗-FXIIa抗体的表征

[0287] 方法:

[0288] 活化部分促凝血酶原激酶时间(APTT)测定

[0289] 将抑制剂(或对照稀释缓冲液=25mM HEPES,pH 7.5、125mM NaCl)以1:1混合加入到纯血浆中,并在37℃预平衡5分钟。将2×50μl该混合物分配到2个单独的KC4Δ测定样品池(cuvette)(带金属球)中。60秒后,将50μl的aPTT试剂(激活剂,Pacific Hemostasis APTT-XL)加入到旋转样品池中,并且在aPTT加入(为t=0秒)后180秒,加入50μl的$CaCl_2$。KC4Δ仪器以秒为单位记录凝血时间。

[0290] 凝血酶原时间(PT)测定

[0291] 将抑制剂(或对照稀释缓冲液=25mM HEPES,pH 7.5、125mM NaCl)以1:1混合加入到纯血浆中,并在37℃预平衡5分钟。将2×50μl该混合物分配到2个单独的KC4Δ测定样品池(带金属球)中。4分钟后,加入PT激活剂(Pacific Hemostasis促凝血酶原激酶D)(为t=0秒)。凝血时间由KC4Δ仪器自动记录。

[0292] 纯化组分抑制测定

[0293] 纯化组分抑制测定在图3的小图1中描述。在96-孔微孔板中将20pM FXIIa与不同浓度的抑制剂在30℃孵育1小时。在30℃加入10nM前激肽释放酶,持续20分钟,然后与100nM玉米胰蛋白酶抑制剂(CTI)一起孵育5min。然后,通过加入10uM最终的荧光肽底物(PFR-AMC)评估随着时间而变化的蛋白水解,以底物蛋白水解的初始速率(y-轴)针对抑制剂浓度(x-轴)作图,并将所得数据拟合至针对紧密结合抑制剂改良的莫里森方程(方程式1)。将所有试剂稀释成测定缓冲液=20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、0.1% PEG-8000和0.1%Triton X-100。

[0294] 血浆抑制测定

[0295] 血浆抑制测定在图3的小图2中描绘。在测定缓冲液(上面)中以1:40稀释汇集的正常人血浆,并且在室温以不同浓度将抑制剂加入到96-孔微孔板中。然后,通过加入25%(2.5%,最终)鞣花酸引起接触激活,通过轻轻摇动混合微孔板,在室温进行2分钟,由此加入100nM的CTI。然后,将10μl该混合物移入到含有80μl在30℃预平衡的测定缓冲液的重复微孔板中。然后,在30℃再孵育该稀释板5分钟,并且如上所述评估PFR-AMC的蛋白水解,但是在X-轴中使用反算的抑制剂浓度用于曲线拟合至标准IC_{50}方程式(在最终测定读数中,血浆以1:400被稀释)。

[0296] 在非人灵长类动物模型中还以两种不同的剂量测试了本文公开的一种或多种抗-

FXIIa抗体。研究进行了30天，然后，采取血液样品以通过蛋白质印迹分析评价药代动力学、对APTT的作用和对血浆激肽释放酶激活的作用。

[0297] 结合优先测定

[0298] 为确定抗-FXIIa抗体的结合优先，将每种抗体与接触/凝血系统的FXII酶原其它相关蛋白酶一起孵育。然后，使用Biacore生物传感器，通过表面等离子共振(SPR)分析评估结合亲和力。见图3，小图3。

[0299] 流动模型/毛细血管闭塞测定

[0300] 在离体流动模型中测试抗体，在所述离体流动模型中，补充以抗体的人血液以不同的流动速率经过胶原包被的毛细管。通过荧光评估血小板和血纤蛋白沉积。在该体系中，血小板和血纤蛋白沉积受到结合酶原因子XI或因子XII的抗体的抑制。在典型的试验中，在血液流动开始前使抗体结合其靶标。

[0301] 小鼠血栓形成模型

[0302] 在氯化铁诱导的颈动脉血栓形成的小鼠模型中测试抗体。模型并入了不同的$FeCl_3$浓度，以在C57Bl/6小鼠中一致地诱导血栓形成的最低浓度(3.5％)开始。如果抗体在低的$FeCl_3$浓度显示出抗血栓形成作用，则逐步测试较高的浓度，直到主要是抗体的抗血栓形成作用。

[0303] 结果：

[0304] 在多种体外活性测定中测试39株抗-FXIIa抗体分离株，以确定以下性质：表观Ki、IC_{50}、结合优先(诸如与FXII酶原结合)、与接触/凝血系统中的其它相关蛋白酶的交叉反应性、与密切相关的序列同源物的交叉反应性、对血浆激肽释放酶(pKal)的作用、在人血浆中的活性、部分促凝血酶原激酶时间(PT)、活化部分促凝血酶原激酶时间(APTT)和凝血酶产生的滞后时间。

[0305] 测定的结果在表3中示出。发现所有39株分离株延迟APTT而对PT没有影响。39株亲和力成熟的分离株中的每一株相对于亲本分离株均显示Ki^{app}增加10-100倍。如通过两个独立的抑制测定(纯化组分抑制测定和血浆抑制测定)所测量的，抗体减少pKal产生。

[0306] 根据SPR分析(Biacore)，抗体不结合FXII酶原，并且，当针对全长FXIIa测试时，其显示对催化结构域的特异性。抗体还防止FXI激活成FXIa。

[0307] 表3

[0308]

分离株	血浆 Ki^{app} (nM)	APTT (延迟倍数)	Ki^{app} (pM)
M0191-E09	31	3.70	5
M0183-C03	33	3.17	6
M0184-F12	38	3.74	4
M0183-H08	76	3.36	5
M0182-D04	96	3.13	11
M0192-H11	101	3.33	6
M0292-D07	115	3.11	14
M0183-D08	118	2.08	11
M0192-F07	125	3.00	7
M0192-G03	125	3.14	18
M0310-C06	135	2.46	57
M0192-F01	174	3.18	8
M0191-A03	176	2.88	13
M0192-A01	198	3.11	17
M0191-H10	216	3.81	13
M0177-C12	217	3.86	18
M0184-B04	269	3.76	8
M0308-H03	275	3.38	18

[0309]

M0192-D02	279	3.30	5
M0310-G07	295	4.48	22
M0192-F06	304	3.49	9
M0310-A04	316	3.48	15
M0310-F02	319	1.86	106
M0310-B09	331	3.73	12
M0310-G06	353	3.18	7
M0182-H01	359	N/A	N/A
M0178-A08	381	3.26	7
M0184-D01	435	3.32	4
M0177-A06	458	4.08	17
M0191-E04	460	3.59	7
M0191-H09	463	3.61	16
M0192-H04	485	3.51	9
M0192-A03	514	3.34	13
M0310-G08	796	2.76	24
M0192-G05	852	3.38	15
M0183-B12	1004	3.06	11
M0308-F04	1570	3.29	17
M0182-B04	N/A	N/A	N/A
M0310-F04	N/A	N/A	N/A

[0310] 克隆M0192-H11针对人FXIIa的抑制活性显示在图21中，并且发现该活性大约为4.7+/-0.6pM。

[0311] 在体内药代动力学试验中，还在大鼠中测试了抗-FXIIa抗体M192-H11和M192-E09。大鼠组被注射以20mg/kg的抗-FXIIa抗体M191-E09或M192-H11。在注射后的不同天，从大鼠收集样品，并评估抗-FXIIa抗体的浓度和药代动力学参数(图6和表4)。

[0312] 表4：抗体M192-H11和M191-E09的药代动力学特征：

[0313]

示例性抗体	C 最大 (μg/mL)	AUC 最后 (hr*μg/mL)	CI (ml/hr/kg)	Vss (mL/kg)	$t_{1/2}$ (hr)
M192-H11	360	18375	0.92	242	220
M191-E09	269	7612	2.28	489	218

[0314] 实施例3：抗-FXIIa抗体559C-X211-A01的开发和表征

[0315] 559C-X211-A01是前面描述的亲本抗体559C-M71-F06的亲和力成熟的、部分种系化的形式。该抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列在下面显示：

[0316] 559C-X211-A01_HV(CDR以下划线和粗体显示)

[0317] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS QYVMH WVRQAPGKGLEWVS SIWPSGGHTRYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR QRYRGPKYYYYMDV WGKGTTVTVSS(SEQ ID NO:125)

[0318] 559C-X211-A01_LV(CDR以下划线和粗体显示)

[0319] DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC RSSQSLLHSNGYNYLD WYLQKPGQSPQLLIY LGSNRAS GVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC MQALQTPWT FGQGTKVEIK(SEQ ID NO:126)

[0320] 在多种体外活性测定中测试559C-X211-A01,以确定以下性质:表观K_i、IC_{50}、与FXII酶原的结合、与接触/凝血系统中的其它相关蛋白酶的交叉反应性、与密切相关的序列同源物的交叉反应性、对血浆激肽释放酶(pKal)产生的作用和在人血浆中的活性。还在小鼠血浆中体外测试了部分促凝血酶原激酶时间(PT)和活化部分促凝血酶原激酶时间(APTT)。

[0321] 交叉反应性测定

[0322] 559C-X211-A01对以1μM测试的下列蛋白酶不显示交叉反应性:尿激酶纤溶酶原激活剂、人生长因子激活剂、激活的蛋白C、组织蛋白酶G、C1、弹性蛋白酶、因子VIIa、因子Xa、因子Xia、纤溶酶、α-凝血酶、胰蛋白酶、尿激酶和血浆激肽释放酶。

[0323] 活化部分促凝血酶原激酶时间(APTT)和凝血酶原时间测定

[0324] 将抑制剂(或对照稀释缓冲液=25mM HEPES,pH 7.5、125mM NaCl)以1:1混合加入到小鼠和人的纯血浆中,并在37℃预平衡5分钟。将2×50μl该混合物分配到2个单独的KC4Δ测定样品池(带金属球)中。60秒后,将50μl的aPTT试剂(激活剂,Pacific Hemostasis APTT-XL)加入到旋转的样品池中,并在此(为t=0秒)后180秒,加入50μl的$CaCl_2$。KC4Δ仪器以秒为单位记录凝血时间。

[0325] 如上所述,除了将2x50μl抑制剂/血浆混合物分配到2个单独的KC4Δ测定样品池中之后的4分钟,在t=0秒时加入PT激活剂(Pacific Hemostasis促凝血酶原激酶D)。凝血时间由KC4Δ仪器自动记录。

[0326] 559C-X211-A01延迟小鼠血浆中的APTT而对PT没有影响。图7。该数据支持与小鼠因子XII的物种交叉反应性。

[0327] 纯化组分抑制测定:

[0328] 在30℃,将20pM FXIIa与不同浓度的抑制剂在96-孔微孔板中孵育1小时。然后,在30℃,加入10nM前激肽释放酶,持续20分钟,接下来,与100nM玉米胰蛋白酶抑制剂(CTI)孵育5分钟。然后,通过加入10uM最终的荧光肽底物(PFR-AMC)评估随着时间而变化的蛋白水解,以底物蛋白水解的初始速率(y-轴)针对抑制剂浓度(x-轴)作图,并将所得数据拟合至针对紧密结合抑制剂改良的莫里森方程。将所有试剂稀释成测定缓冲液=20mM Tris-HCl pH 7.5、150mM NaCl、1mM EDTA、0.1% PEG-8000和0.1% Triton X-100。

[0329] 血浆抑制测定:

[0330] 在测定缓冲液(上面)中以1:40稀释汇集的正常人血浆,并且在室温以不同浓度将抑制剂加入到96-孔微孔板中。通过加入25%(2.5%,最终)APTT-XL试剂(稀释鞣花酸;Pacific Haemostasis)引起接触激活,通过轻轻摇动混合微孔板,并在室温进行2分钟,由此加入100nM的CTI。然后,将10ul该混合物移入到含有80ul在30℃预平衡的测定缓冲液的重复微孔板中。然后,在30℃再孵育稀释板5分钟,并且如上所述评估PFR-AMC的蛋白水解,但是在X-轴中使用反算的抑制剂浓度用于曲线拟合至标准IC50方程式和/或改良的莫里森方程(在最终测定读数中,血浆以1:400被稀释)。

[0331] 在上述测定中观察到的559C-X211-A01的活性总结在下面表5中:

[0332] 表5:559C-X211-A01的活性

[0333]

分离株	血浆 IC50 (nM)	APTT (延迟倍数)，在人血浆中使用 1uM X211-A01	APTT (延迟倍数)，在小鼠血浆中使用 1uM X211-A01	Ki app (pM)
559C-X211-A01	289	3.4	2.8	5

[0334]

[0335] 根据SPR分析，该抗体结合至FXIIa而不结合FXII酶原。通过FXIIa-β的酶抑制试验表明对催化结构域的特异性靶向。

[0336] 预期559C-X211-A01减少血纤蛋白产生和沉积，从而在流动模型/毛细血管闭塞测定中延长血液堵塞胶原包被的毛细管所花费的时间和/或减少血小板聚集和动脉包含物的发生率。预期559C-211-A01在血栓形成的小鼠模型和血栓形成的非人灵长类动物模型中减少血栓形成的发生率。

[0337] 实施例4：使用DX-4012进行体内血栓形成研究

[0338] 药代动力学研究

[0339] 在健康狒狒中评估单剂量DX-4012的抗凝血作用，作为循环中抗体存在的药效学标记物。使动物轻度镇静，并从肘前动脉抽取血液，用于基线凝聚值。然后，以饱和的剂量施用抗体。经静脉内递送单剂量的抗体，并且只要在APTT测定中相对于基线可以证实抗凝血，就在不同时间点抽取血液样品。还将血浆样品冷冻用于另外的测试。

[0340] 在狒狒中完成药代动力学研究和测定抗体的有效半衰期后，进行药效学血栓形成和止血研究。

[0341] 药效学和血栓形成研究

[0342] 在抗凝血之前和期间进行急性血栓形成和止血试验，以确定抗体相比阳性对照和阴性对照在单饱和剂量时的效力和安全性。通过将血管移植物区段布置到长期外置股骨动静脉分流器中在训练过的狒狒中进行血栓形成试验。在研究的每一天，在连续流血时间、体积测量和抗凝血测定的不同时间点，从分流环获取1mL柠檬酸盐血。取样时间包括给药前(在施用依诺肝素或DX-4012之前，在动物接受依诺肝素或DX-4012的当天)、研究前(在开始研究前5分钟)和研究后(在研究结束前5分钟，此时分流环被去除)。在血栓形成和止血试验之前，狒狒接受^{111}In-放射性标记的自体血小板和^{125}I-放射性标记的血纤蛋白原。将DX-4012的抗血栓形成活性与依诺肝素(低分子量肝素)的抗血栓形成活性进行比较。

[0343] 在绘制基线血液样品之后，开始进行血栓形成试验。使用硅管系统暂时(60min)延长长期动静脉分流器，并且，将短胶原ePTFE移植物区段或组织因子包被的ePTFE血管移植物区段(20mm)布置在外部AV环内(图10)。血栓在移植物中形成(血栓头)并延伸到远侧上(血栓尾)。使用γ照相机成像60分钟实时监测放射性标记的血小板在移植物中的积累，并计算为5分钟间隔留在移植物中的血小板的数目。在60分钟移植物灌注之后，去除移植物，再接合分流器，并且，在^{111}In衰变之后(30多天-大约10个半衰期之后)，测定到60min(终点)时移植物中沉积的血纤蛋白的量。血纤蛋白和血小板数代表血栓的尺寸。

[0344] 结果：

[0345] 如在实施例2和3中描述地进行APTT和PT测定。使用柠檬酸盐血浆、SynthA Sil®

(Instrumentation Laboratories)试剂和KC-4凝血计测量APTT。使用柠檬酸盐血浆、Dade®Innovin®试剂(Siemens)和KC-4凝血计测量PT。在血液抽取和将血液样品离心以产生缺乏血小板的血浆之后立即测量APTT和PT二者。在施用DX-4012之后1小时时,测量的APTT的倍数变化为2.2倍(预期>2.2倍)。在24-48小时时,测量的APTT的倍数变化是1.8倍(预期1.8-2.0倍);并且,在1周时,测量的APTT的倍数变化是1.3倍(预期1.3-1.5倍)。没有观察到PT的变化。

[0346] 胶原移植物

[0347] 对于血栓形成研究,动物接受10mg/kg的抗体DX-4012,并且在抗体施用后1hr、24hr、48hr、168hr和192hr进行研究。为了分析,将24和48hr时间点的数据归为一组,并将168和192hr时间点的数据归为一组。如所预期的,对照动物形成胶原引起的基线血栓头。在接受依诺肝素的动物中,血栓头明显减少。在抗体施用后多达48hr的时间点,血栓头尺寸相对于对照动物减小,并且与接受依诺肝素的动物的血栓头尺寸相当。在抗体施用后一周时(168-192hr),血栓头尺寸与对照动物的血栓头尺寸相当(图11A)。在抗体施用后多达48hr的时间点,血栓尾几乎消失,并且与接受依诺肝素的动物的血栓尾相当。在抗体施用后一周时(168-192hr),血栓尾仍然减少,但是减少的程度低于依诺肝素处理后减少的程度(图11B)。

[0348] 在另一试验中,在抗体施用后多达48hr的时间点,血栓头尺寸相对于对照动物减小,并与接受依诺肝素的动物的血栓头尺寸相当。在抗体施用后一周时(168-192hr),血栓头尺寸仍然减小,但是减小的程度低于依诺肝素处理后减小的程度(图12)。图13示出了血栓形成(总血栓),表明在抗体施用后1hr、24hr和48hr血栓形成是相当的。血栓生长速率(5分钟间隔的血小板沉积)显示于图14。在到达峰值之前的前30分钟内,对照血栓具有不断增加的生长速率。在依诺肝素处理后,生长速率在20分钟时达到较低的峰值,在40分钟后开始下降,并在60分钟时裂解(负生长速率)。在DX-4012施用后前48hr内,生长速率在15-20分钟时达到峰值,并具有降低的生长速率。在抗体施用后一周时,血栓在早期时间点(1hr和24-48hr)和对照之间。

[0349] 总体而言,施用10mg/kg DX-4012减小由胶原引发形成的血栓的尺寸,其作用可见于血栓头尺寸和血栓尾二者。在抗体施用后多达48hr观察到血栓尺寸的减小,且所述减小与依诺肝素处理(1mg/kg)相当。一周后,在接受抗体的动物中血栓头返回到基线,但血栓尾尺寸保持减小。

[0350] 组织因子移植物

[0351] 一般而言,相比胶原包被的分流器,血栓尺寸在组织因子包被的分流器中更趋于变化。在描述的试验中观察到大的变化(74、140和23亿血小板)。如所预期的,对照动物形成组织因子引起的基线血栓头。血栓头在接受依诺肝素的动物中明显减少。在抗体施用后多达48hr的时间点,血栓头尺寸与对照动物的血栓头尺寸相当(图15A)。在抗体施用后一周时(168-192hr),血栓头尺寸变化很大。依诺肝素处理几乎消除了组织因子引发的血栓尾形成。在接受抗体处理的动物中没有明显的血栓尾减少,但是数据表明存在朝向较小血栓尾的轻微趋势(图15B)。

[0352] 在另一试验中,依诺肝素处理导致血栓尺寸减小>50%,这很大程度上是由于几乎消失的血栓尾。在接受抗体处理的动物中没有明显的血栓尾减少,但是数据表明存在朝向

较小血栓尾的轻微趋势(图16)。图17示出了血栓形成(总血栓)。进行数据的RM ANOVA分析表明,在抗体处理后1hr时总血栓尺寸相比对照减小。血栓生长速率(以5分钟为间隔的血小板沉积)显示于图18。在达到峰值之前的前30分钟内,对照血栓具有不断增加的生长速率。依诺肝素处理后的生长速率在20分钟时达到峰值,在40分钟后开始下降,并且在60分钟时裂解(负生长速率)。在DX-4012施用后的前48hr内,血栓生长速率类似于在对照动物中观察到的速率(图18)。

[0353] 总体而言,在组织因子引起的血栓形成中,施用10mg/kg DX-4012对血栓头尺寸没有影响,而对血栓尾尺寸具有很小的影响。

[0354] 末端血纤蛋白含量和血小板沉积

[0355] 在试验结束时,用盐水洗涤分流器,并且捕获图像以评估最终的血小板计数。还保留环,用于血栓头和尾的血纤蛋白含量分析。

[0356] 末端血栓尺寸在接受依诺肝素的动物中减小。在接受DX-4012的动物中,如通过血小板沉积和血纤蛋白含量二者所测量的,血栓尺寸在胶原包被的分流器中也显著减小,但在组织因子包被的分流器中不减小(图19A和19B)。

[0357] 止血研究

[0358] 利用FDA批准的Surgicutt™流血时间装置和方案测量止血。还测量血量。每研究天进行一次流血时间和流血量测量。如图22A和22B所示,相比依诺肝素,DX-4012有效减少流血时间和流血量。

[0359] 实施例5:基于DX-4012-FXIIa复合物的晶体结构鉴定FXIIa的催化结构域中的关键残基

[0360] 通过常规重组技术在大肠杆菌中制备DX-4012的重组Fab片段并纯化。通过常规方法产生并纯化FXIIa。

[0361] 在允许Fab-FXIIa复合物的合适条件下以各种浓度混合DX-4012Fab片段和FXIIa。利用SEC纯化复合物,并以图20中所示的线条使其可视。

[0362] 在允许结晶的各种条件下保持Fab-FXIIa复合物。对结晶的复合物进行衍射分析。基于衍射数据确定晶体结构(2.6 Å和2.25 Å)。

[0363] 根据晶体结构,涉及与DX-4012的Fab片段相互作用的FXIIa的C链中的残基得以鉴定:L390、Y391、W392、G393、H394、S395、F396、C397、H412、C413、L414、Q415、D416、R432、N433、V456、Y458、H507、F509、E510、G511、A512、E513、Y515、D557、A558、C559、Q560、G561、D562、S563、I584、S585、W586、G587、S588、G589、C590、G591、D592、G597。

[0364] 另外,基于晶体结构,与FXIIa相互作用的DX-4012的Fab中的残基也得以鉴定,其包括:重链可变区中的T28、S30、Q31、W52、P53、S54、G55、G56、H57、R59、N74、R100、Y101、R102、G103、P104、K105、Y106、Y107和Y108,以及轻链可变区中的H31、N33、Y35、Y54、L55、N58和T99。

[0365] 这些结果表明,DX-4012的重链是与FXIIa相互作用的主要区域,并且发现LC CDR1中的几个残基有助于相互作用。

[0366] 晶体结构还揭示,抗-FXIIa Fab片段的残基R102结合FXIIa的S1区(pocket),并且通过水介导的相互作用而与残基D557相互作用。这使残基Fab残基R102-G103-P104的骨架位置接近FXIIa的催化三联体,但是是在催化无能的方向上。P104可有助于严格保持该方

向,从而抑制FXIIa的活性。

[0367] 也形成了其它抗-FXIIa抗体和其Fab片段与FXIIa的复合物,并将其共纯化,以确定另外的晶体结构。

[0368] 其它实施方案

[0369] 本说明书中公开的所有特征可以以任何组合进行组合。本说明书中公开的每个特征可以由用于相同、等同或相似目的的可替代特征代替。因此,除非另有明确说明,否则所公开的每个特征仅仅是等同或类似特征的通用系列的实例。

[0370] 通过上面的描述,本领域技术人员可以容易地确定本发明的基本特征,并且在不背离本发明的精神和范围的情况下,可以对本发明进行各种改变和修改以使其适应各种用途和条件。因此,其它实施方案也在权利要求书的范围内。

[0371] 等同原则

[0372] 尽管本文已经描述和阐释了若干发明的实施方案,但本领域技术人员容易想到用于进行本文所述的功能和/或获得结果和/或一个或多个优势的各种其它方式和/或结构,并且每种这样的改变和/或修饰被视为在本文所述的发明实施方案的范围内。更具体地,本领域技术人员容易认识到,本文所述的所有参数、尺寸、材料和构造仅仅是示例性的,并且实际的参数、尺寸、材料和/或构造将取决于使用本发明教导的具体应用或多种应用。本领域技术人员应该认识到,或仅仅使用常规实验能够确定,本文所述发明的实施方案的许多等同方案。因此,应理解,前述实施方案仅仅作为例子提供,并且在所附的权利要求和其等同范围内,本发明实施方案可以以如具体描述和要求的之外的方式实施。本公开的发明实施方案涉及本文所述的各个单独的特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法。另外,如果这种特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法不相互排斥,则两个或更多个这种特征、系统、制品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合都包括本公开的发明范围内。

[0373] 应理解,相对于词典定义、通过引用并入的文档中的定义和/或限定术语的通常含义,应以如本文定义和使用的所有定义为准。

[0374] 就其各自被引用的主题而言,本文公开的所有参考文献、专利和专利申请通过引用并入本文,这在某些情况下可涵盖所述文献的整体。

[0375] 如本文在说明书和权利要求书中使用的不定冠词“一个(a)”和“一个(an)”,除非明确地相反指出,否则应理解为是“至少一个”。

[0376] 如本文在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”,应理解为意思是所连接要素的“之一或二者”,即,在一些情况下共同存在并且在其它情况下分开存在的要素。用“和/或”列举的多个要素应以相同的方式理解,即,“一个或多个”如此连接的要素。除了“和/或”语句指出的多个要素之外,可任选地存在其它要素,无论是否与具体指出的那些要素相关。因此,作为非限制性例子,当结合开放式语言比如“包括”提及“A和/或B”时,在一个实施方案中,可仅仅指A(任选地包括B之外的要素);在另一实施方案中,仅仅指B(任选地包括A之外的要素);在仍另一实施方案中,指A和B二者(任选地包括其它要素)等。

[0377] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,“或”应理解为具有与如上定义的“和/或”相同的含义。例如,当在列表中分开项目时,“或”或“和/或”应解释为是包括性的,即,包括一些要素或要素列表中的至少一个,而且也包括大于一个,并且,任选地,包括另外未列举的项目。只有当项目清楚地相反指出,比如“仅仅…中的一个”或“…中的特定的一个”或,

当在权利要求中使用时，“由……组成”，指就包括一些要素或要素列表中的确定的一个。一般而言，如本文使用的术语“或”，当在排他性术语，比如“任意之一”、“…中之一”、“…中的仅仅一个”或“…中的特定的一个”之前时，应仅仅解释为指示排他性的可选物(即“一个或另一个但不是两个”)。当在权利要求书中使用时，“基本上由……组成”应具有其在专利法领域使用的通常含义。

[0378] 如在本文说明书和权利要求书中使用的，在提及一个或多个要素的列表时，短语“至少一个”应理解意思是选自要素列表中的任何一个或多个要素的至少一个要素，但是不必包括在要素列表中具体列举的要素中的每个和所有要素的至少一个并且不排除要素列表中要素的任何组合。该定义也允许要素可任选地存在短语“至少一个”涉及的要素列表中指出的具体要素的以外的要素，无论是否与具体指出的那些要素相关。因此，作为非限制性例子，“A和B的至少一个”(或，等同地，“A或B的至少一个”或，等同地“A和/或B的至少一个”)，在一个实施方案中，可指至少一个，任选地包括大于一个A，而不存在B(和任选地包括B之外的要素)；在另一实施方案中，指至少一个，任选地包括大于一个B，而不存在A(和任选地包括A之外的要素)；在仍另一实施方案中，指至少一个，任选地包括大于一个A，和至少一个，任选地包括大于一个B(和任选地包括其它要素)等。

[0379] 也应理解，除非清楚地相反指出，在本文要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中，方法的步骤或动作的顺序不必限于该方法的步骤或动作被叙述的顺序。

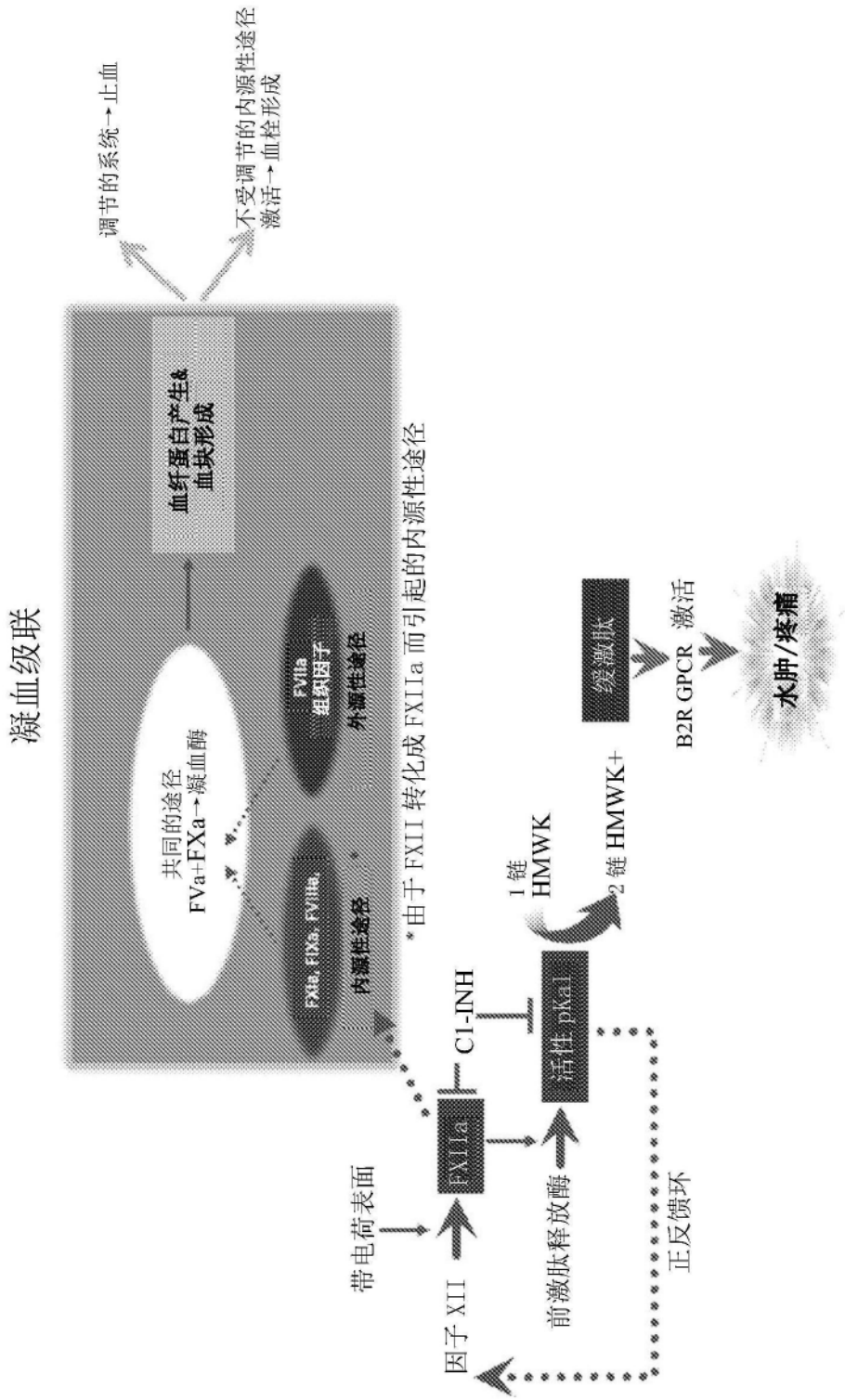

凝血级联
调节的系统→止血
不受调节的内源性途径
激活→血栓形成
血纤蛋白产生&
血块形成
共同的途径
FVa+FXa→凝血酶
FVIIa
组织因子
外源性途径
FXIIa, FIXa, FVIIIa,
内源性途径
*由于 FXII 转化成 FXIIa 而引起的内源性途径
C1-INH
1 链
HMWK
2 链 HMWK+
缓激肽
B2R GPCR
激活
水肿/疼痛
带电荷表面
FXIIa
活性 pKal
因子 XII
前激肽释放酶
正反馈环

图1

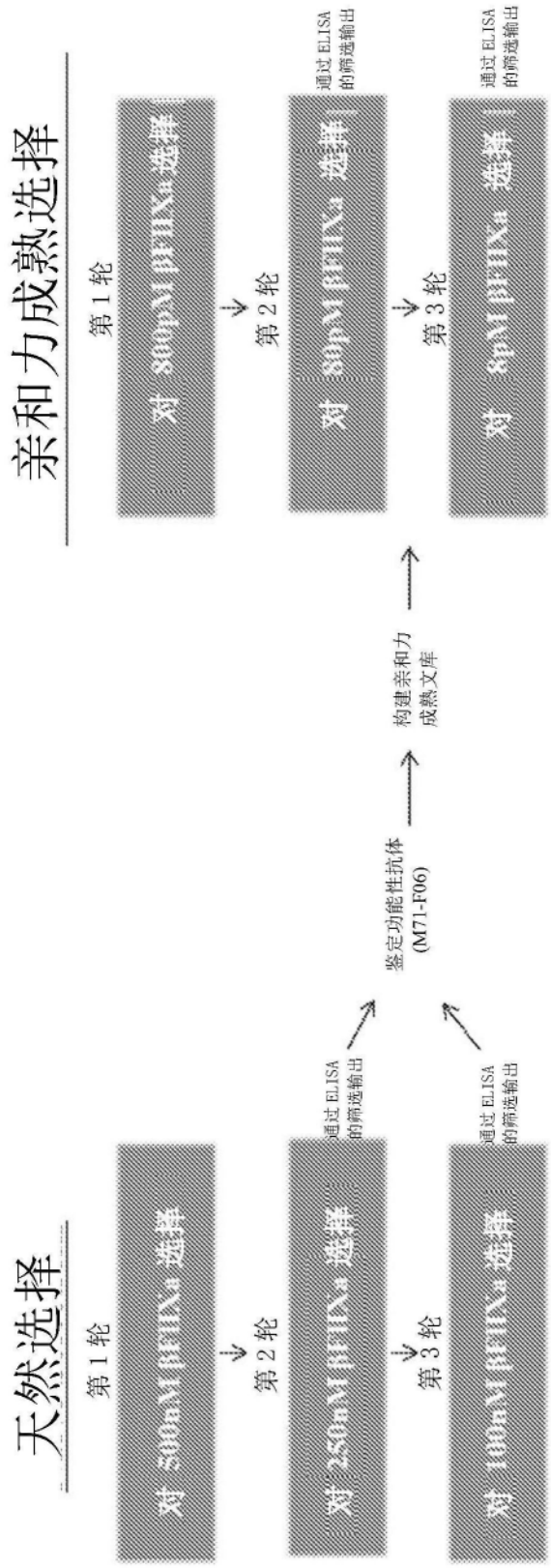

天然选择
第1轮
对 500nM PBMCs 选择
第2轮
对 250nM PBMCs 选择
通过 ELISA 的筛选输出
第3轮
对 100nM PBMCs 选择
通过 ELISA 的筛选输出
鉴定功能性抗体 (M71-F06)
构建亲和力成熟文库
亲和力成熟选择
第1轮
对 500pM PBMCs 选择
第2轮
对 50pM PBMCs 选择
通过 ELISA 的筛选输出
第3轮
对 5pM PBMCs 选择
通过 ELISA 的筛选输出

图2

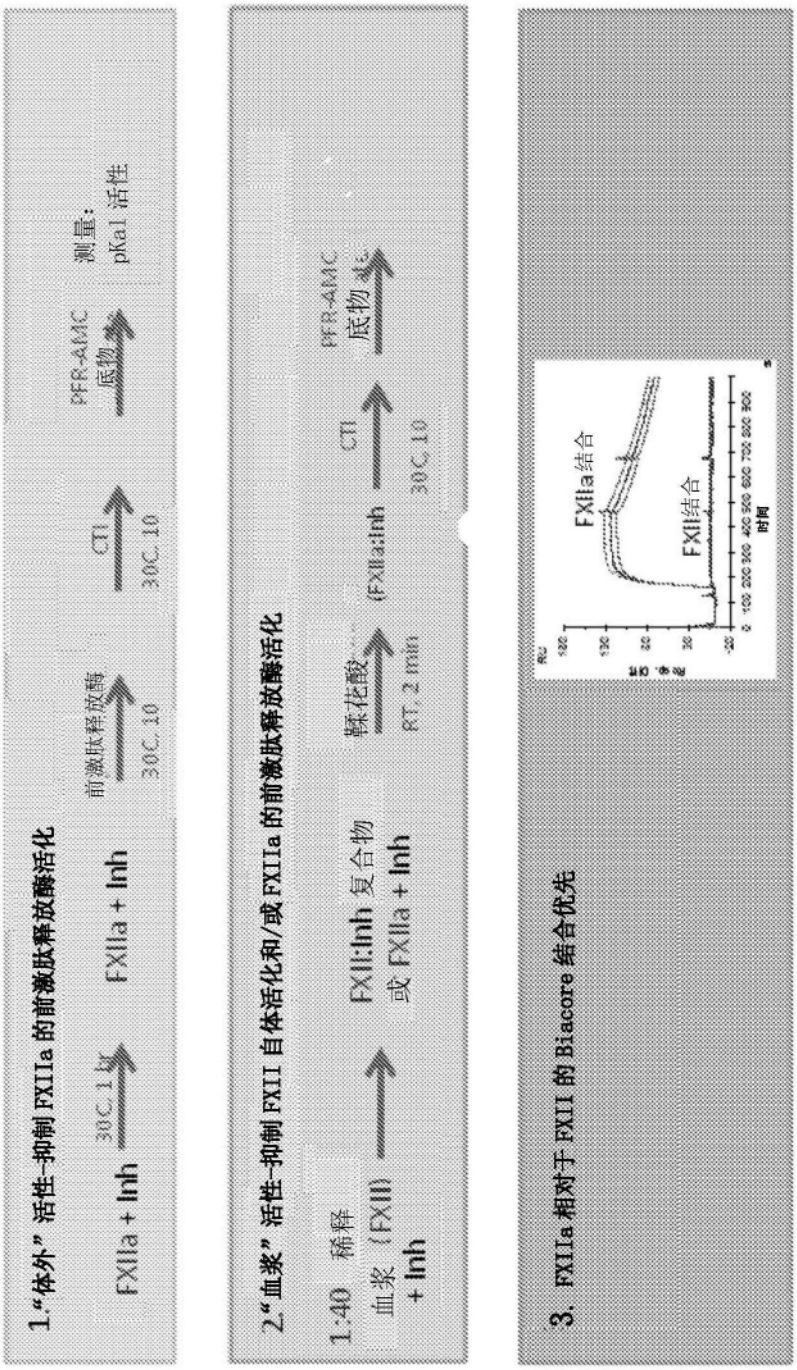

1."体外"活性–抑制 FXIIa 的前激肽释放酶活化
FXIIa + Inh
30C, 1 h
FXIIa + Inh
前激肽释放酶
30C, 10
CTI
30C, 10
PFR-AMC
底物
测量:
pKal 活性
2"血浆"活性–抑制 FXII 自体活化和/或 FXIIa 的前激肽释放酶活化
1:40 稀释
血浆 (FXII)
+ Inh
FXII:Inh 复合物
或 FXIIa + Inh
鞣花酸
RT, 2 min
(FXIIa:Inh
CTI
30C, 10
PFR-AMC
底物
3. FXIIa 相对于 FXII 的 Biacore 结合优先
FXIIa结合
FXII结合
RU
时间

图3

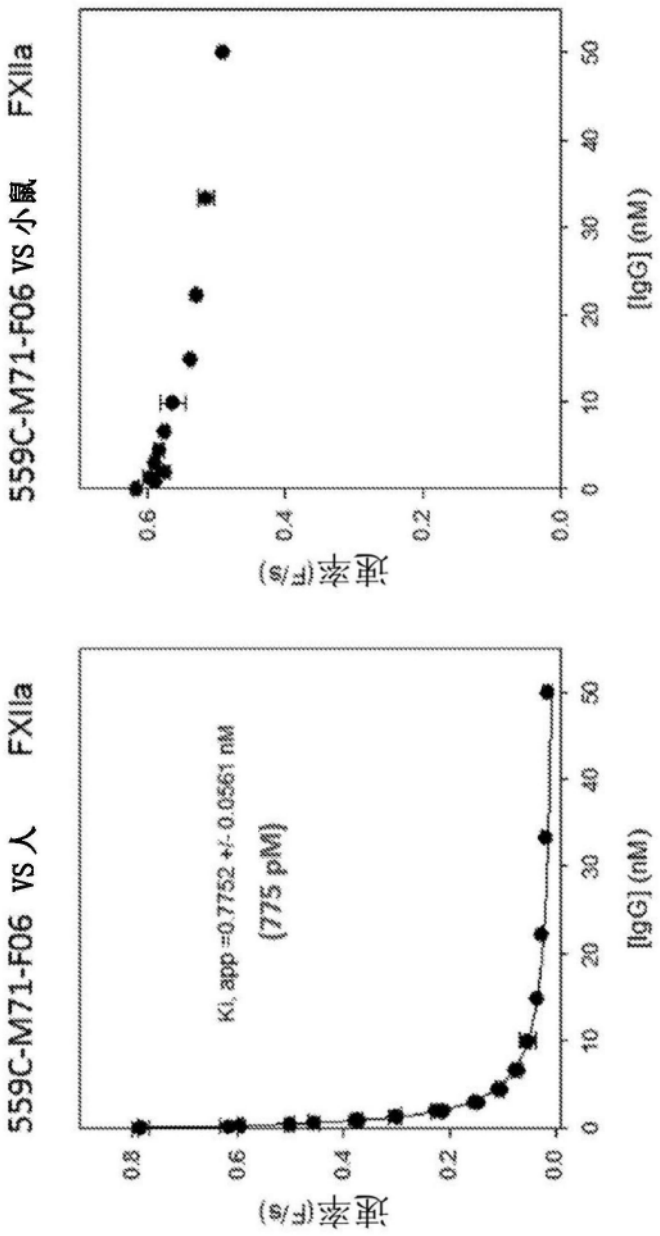

559C-M71-F06 vs 小鼠 FXIIa
速率(F/s)
[IgG] (nM)
0.0
0.2
0.4
0.6
0
10
20
30
40
50
559C-M71-F06 vs 人 FXIIa
Ki, app =0.7752 +/- 0.0561 nM
(775 pM)
速率(F/s)
[IgG] (nM)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
0
10
20
30
40
50

图4

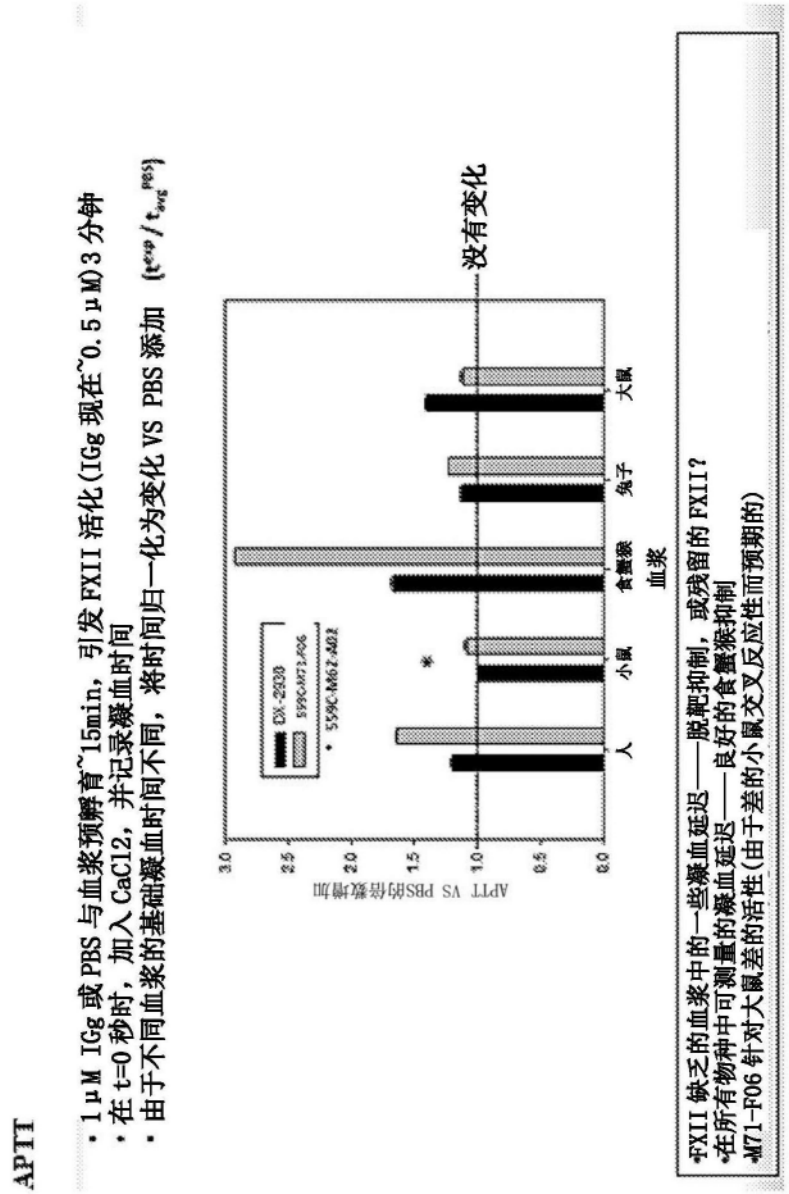

APTT
• 1μM IGg 或 PBS 与血浆预孵育~15min，引发 FXII 活化(IGg 现在~0.5μM)3 分钟
• 在 t=0 秒时，加入 CaCl2，并记录凝血时间
• 由于不同血浆的基础凝血时间不同，将时间归一化为变化 VS PBS 添加 (t^{exp}/t_{avg}^{PBS})
APTT VS PBS的倍数增加
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
没有变化
人
小鼠
食蟹猴
兔子
大鼠
血浆
•FXII 缺乏的血浆中的一些凝血延迟——脱靶抑制，或残留的 FXII?
•在所有物种中可测量的凝血延迟——良好的食蟹猴抑制
•M71-F06 针对大鼠差的活性(由于差的小鼠交叉反应性而预期的)

图5

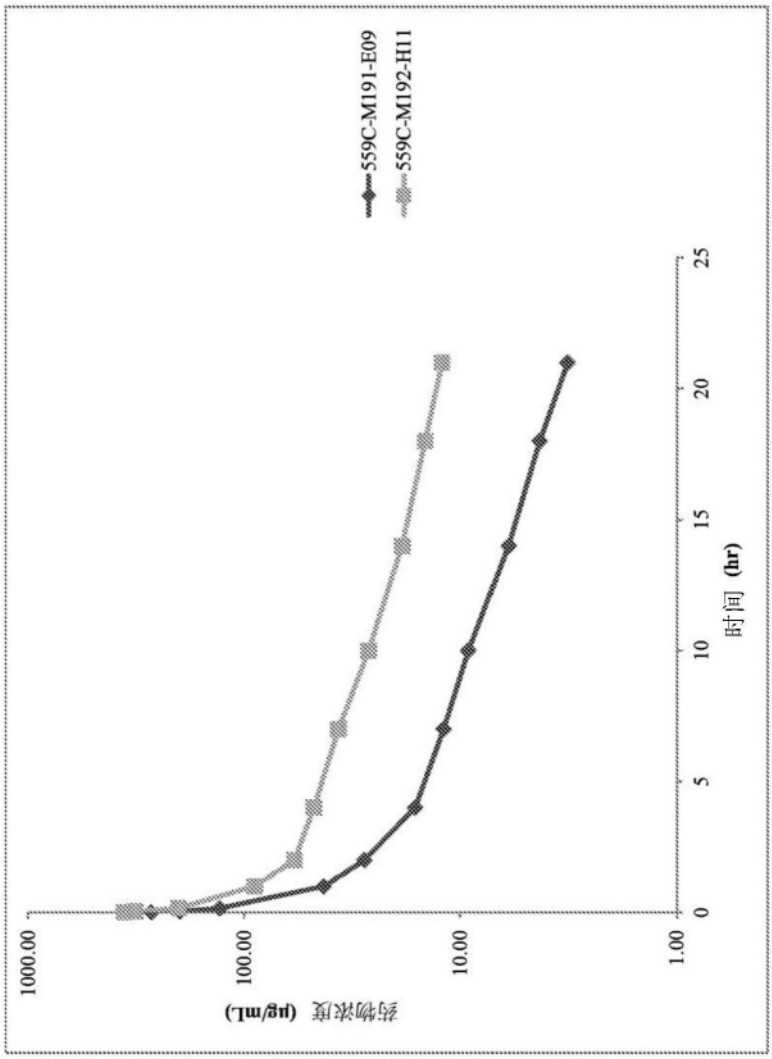
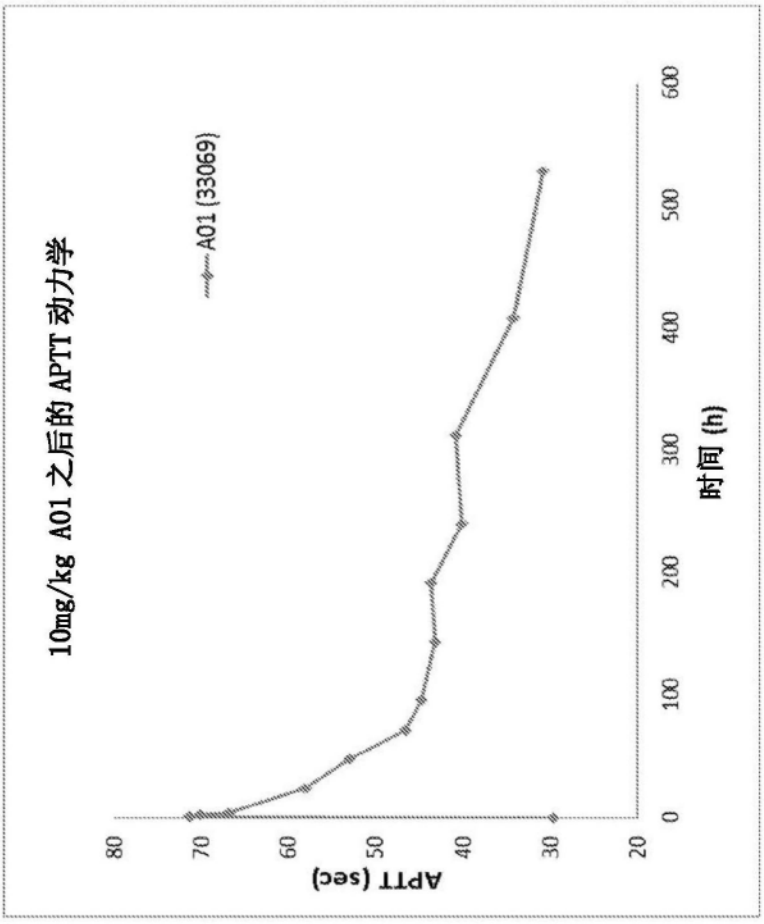
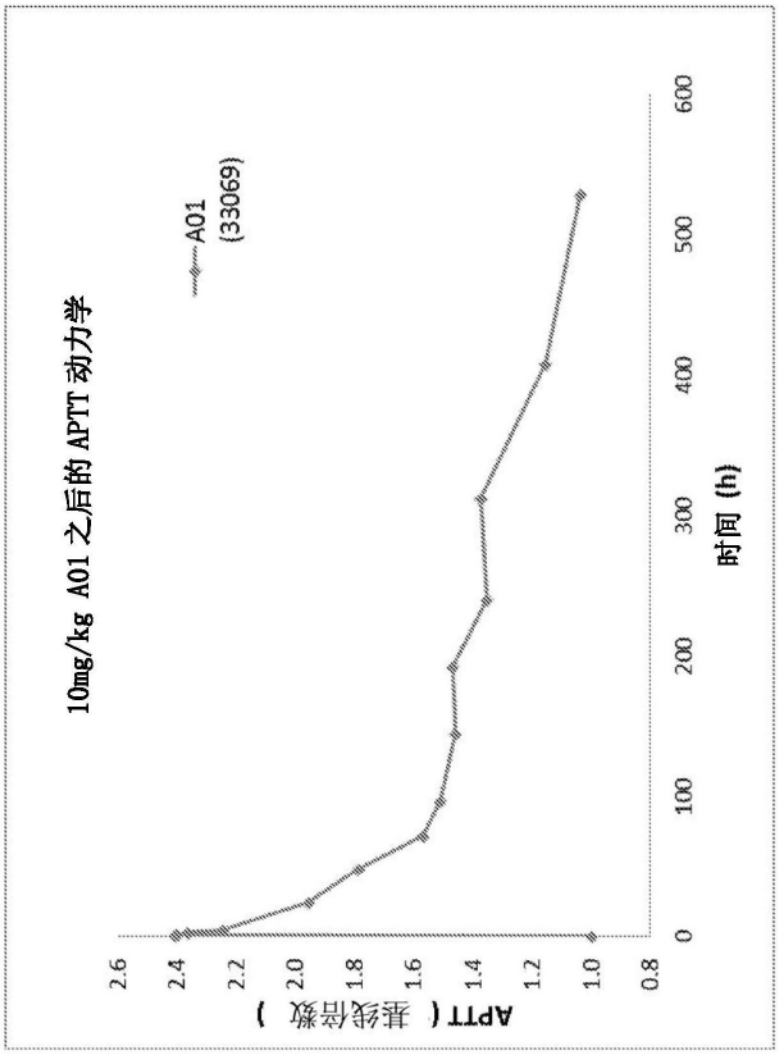

559C-M191-E09
559C-M192-H11
药物浓度 (μg/mL)
1000.00
100.00
10.00
1.00
0
5
10
15
20
25
时间 (hr)

图6


10mg/kg A01 之后的 APTT 动力学
A01 (33069)
APTT (sec)
时间 (h)
80
70
60
50
40
30
20
0
100
200
300
400
500
600

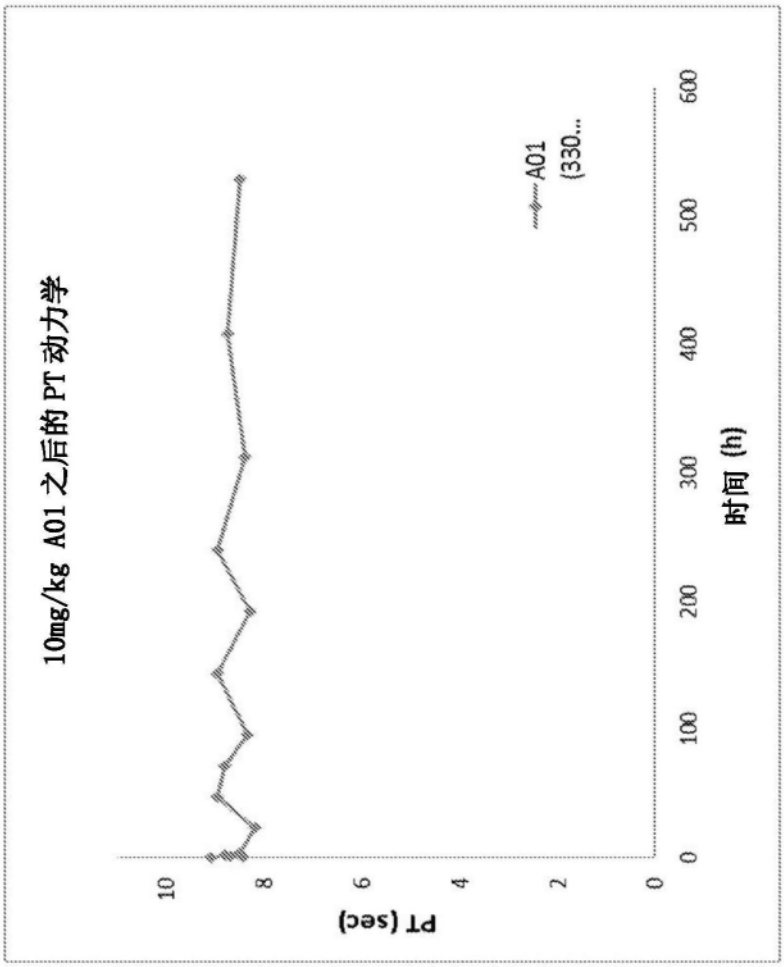
A.

图7


10mg/kg A01 之后的 APTT 动力学
A01
(33069)
APTT（基线倍数）
时间 (h)
2.6
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0
100
200
300
400
500
600

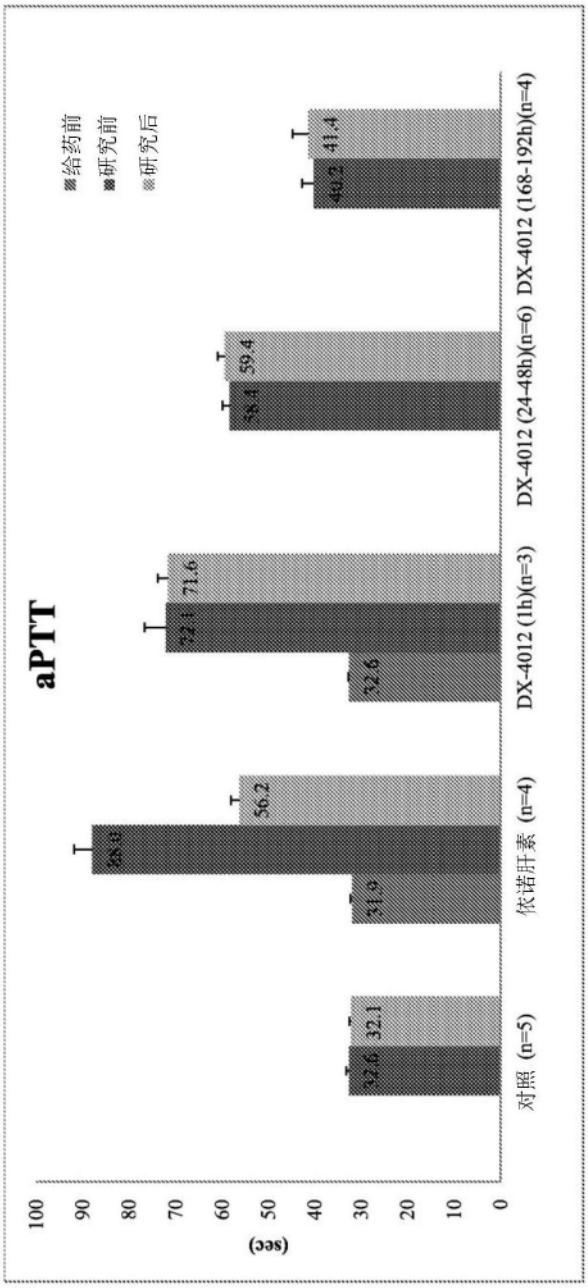
B.

图7(续)


10mg/kg A01 之后的 PT 动力学
A01
(330...
PT (sec)
时间 (h)
0
2
4
6
8
10
0
100
200
300
400
500
600

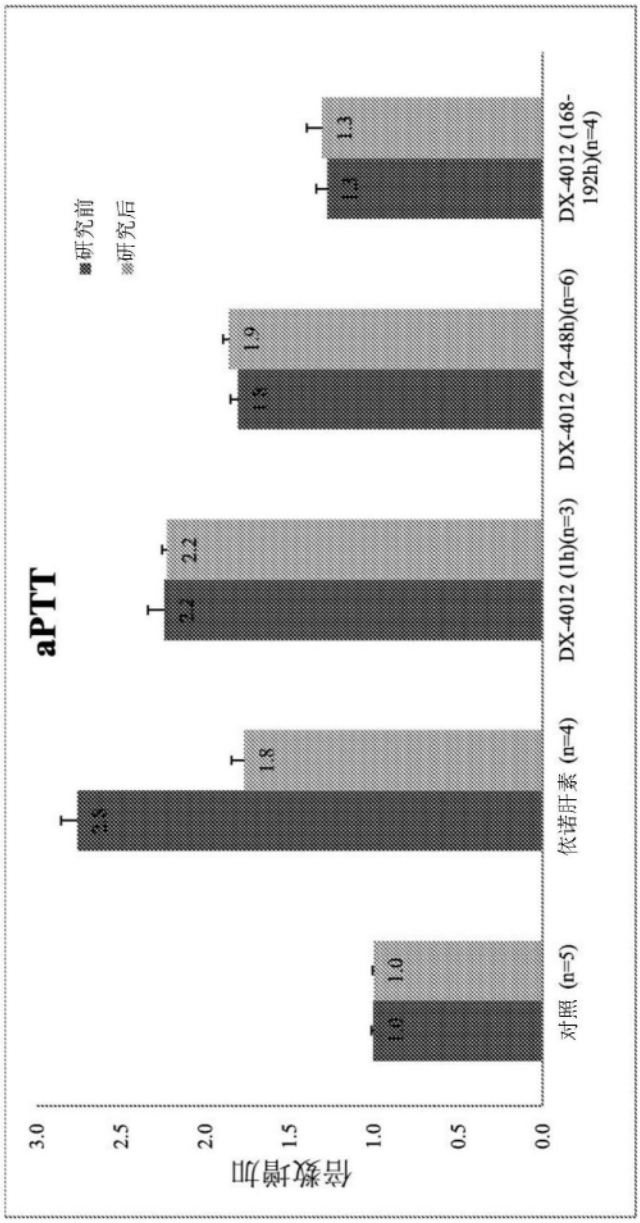
C.

图7(续)


aPTT
给药前
研究前
研究后
(sec)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
32.6
32.1
28.8
31.9
56.2
32.6
32.1
71.6
38.4
59.4
40.2
41.4
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)

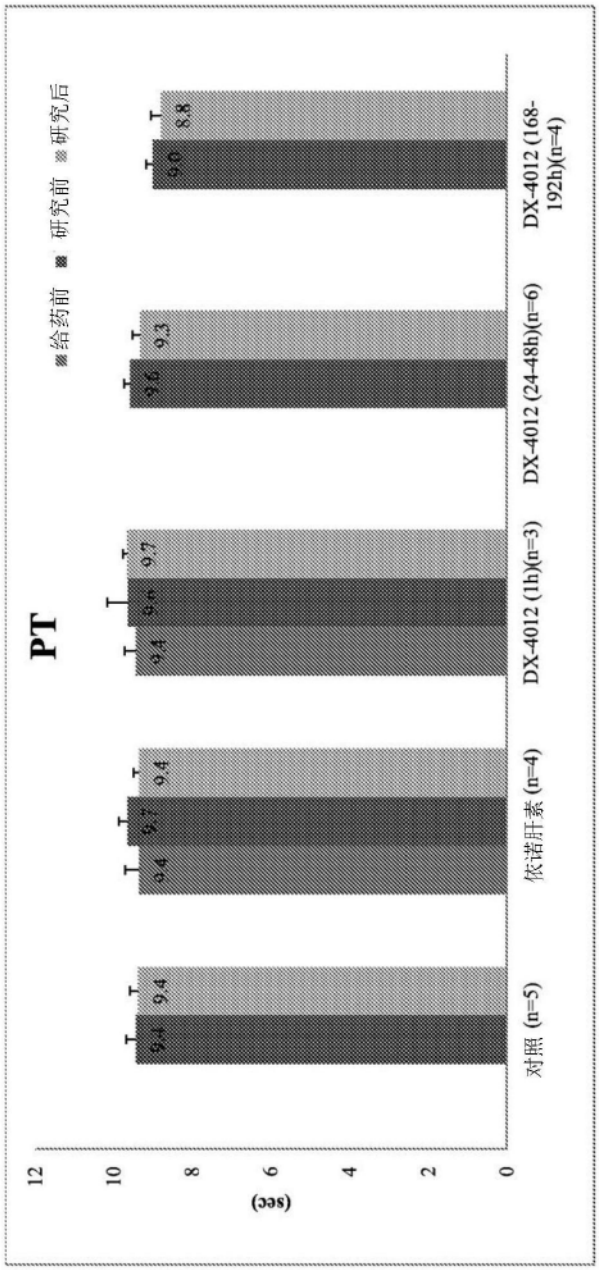
A.

图8


aPTT
研究前
研究后
倍数增加
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1.0
1.0
2.3
1.8
2.4
2.2
1.8
1.9
1.3
1.3
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)

B.

图8(续)


PT
给药前
研究前
研究后
(sec)
0
2
4
6
8
10
12
9.3
9.4
9.4
9.7
9.4
9.6
9.7
9.3
9.6
8.8
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)

A.

图9

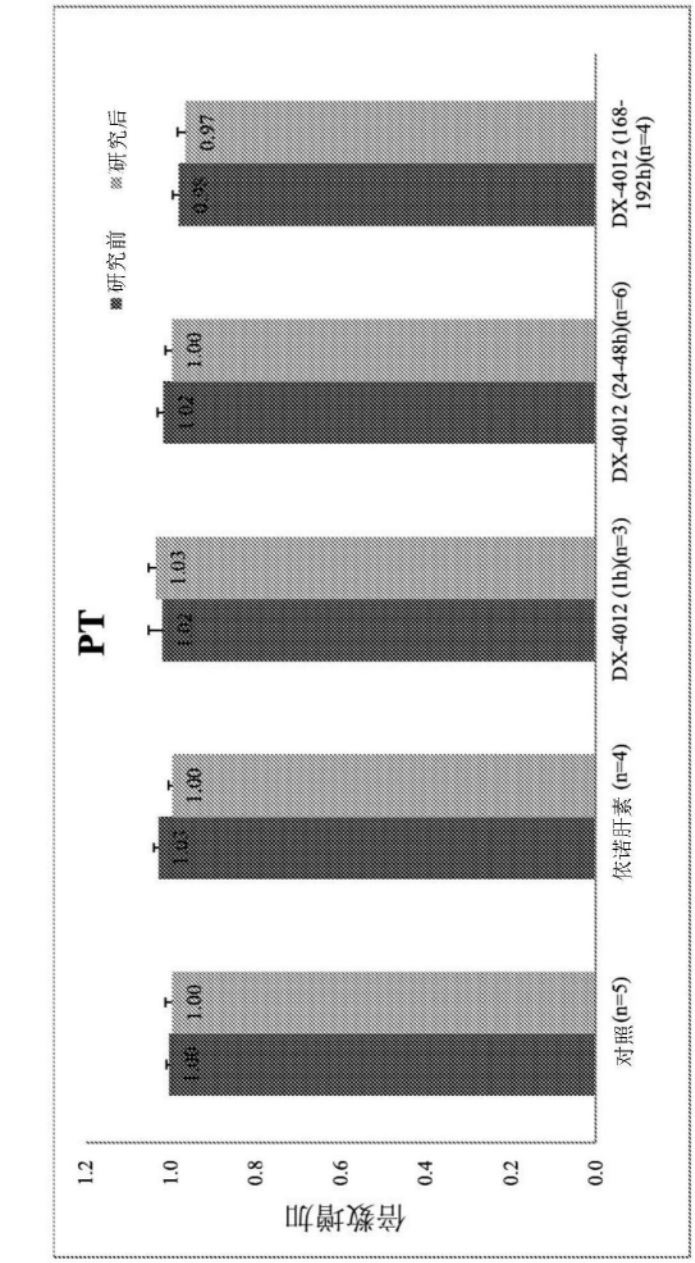

B.
PT
研究前
研究后
倍数增加
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1.00
1.00
1.03
1.00
1.02
1.03
1.02
1.00
0.98
0.97
对照(n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)

图9(续)

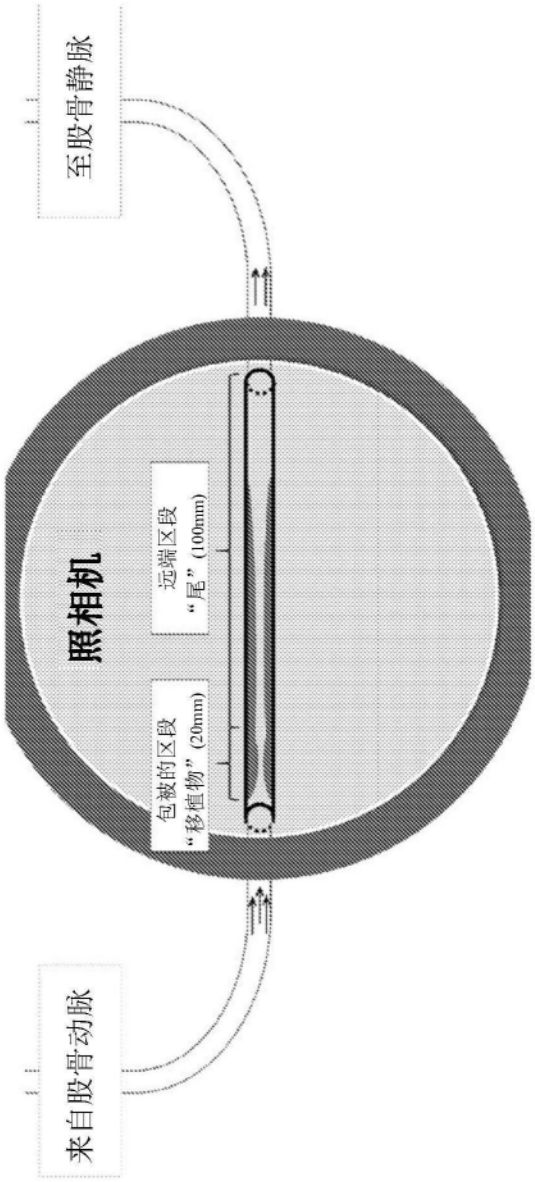
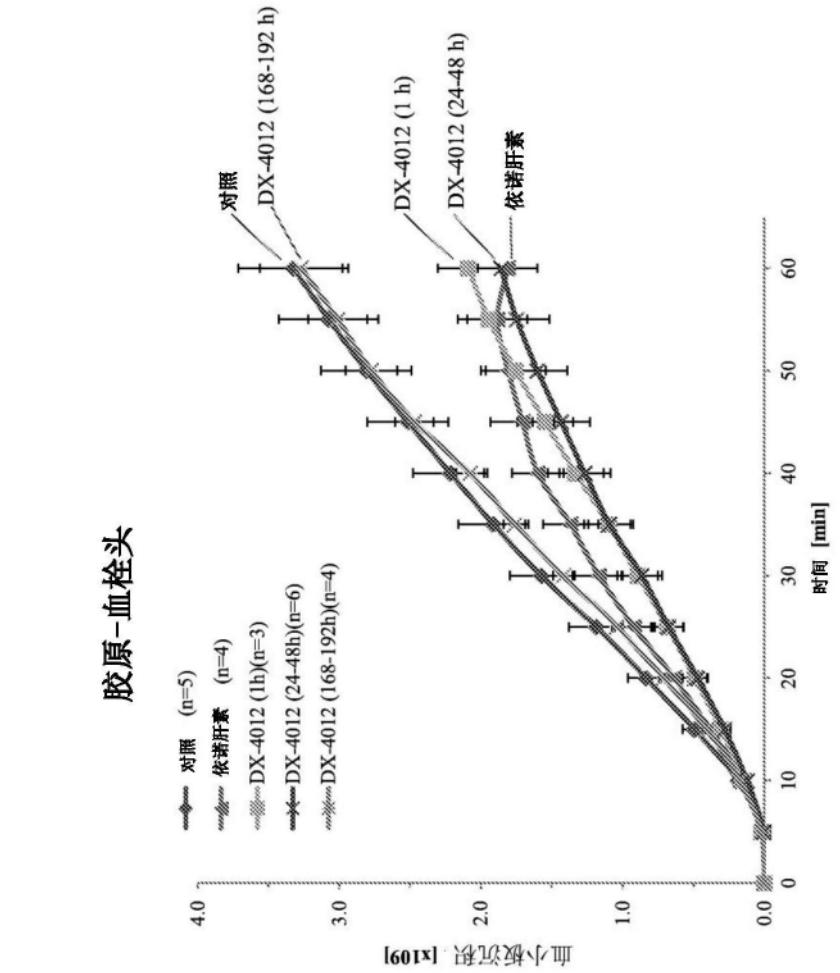
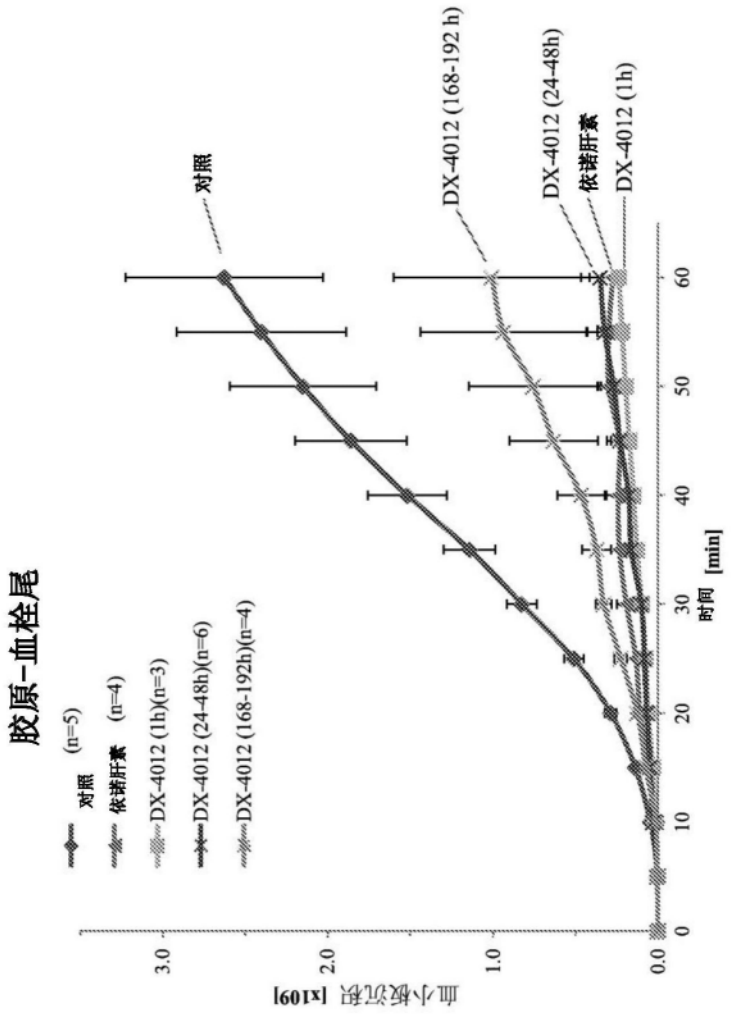


图10


胶原-血栓头
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)
对照
DX-4012 (168-192 h)
DX-4012 (1 h)
DX-4012 (24-48 h)
依诺肝素
血小板沉积 [x10⁹]
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
时间 [min]

A.

图11


胶原-血栓尾
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)
血小板沉积 [x109]
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
时间 [min]
对照
DX-4012 (168-192 h)
DX-4012 (24-48h)
依诺肝素
DX-4012 (1h)

B.

图11(续)

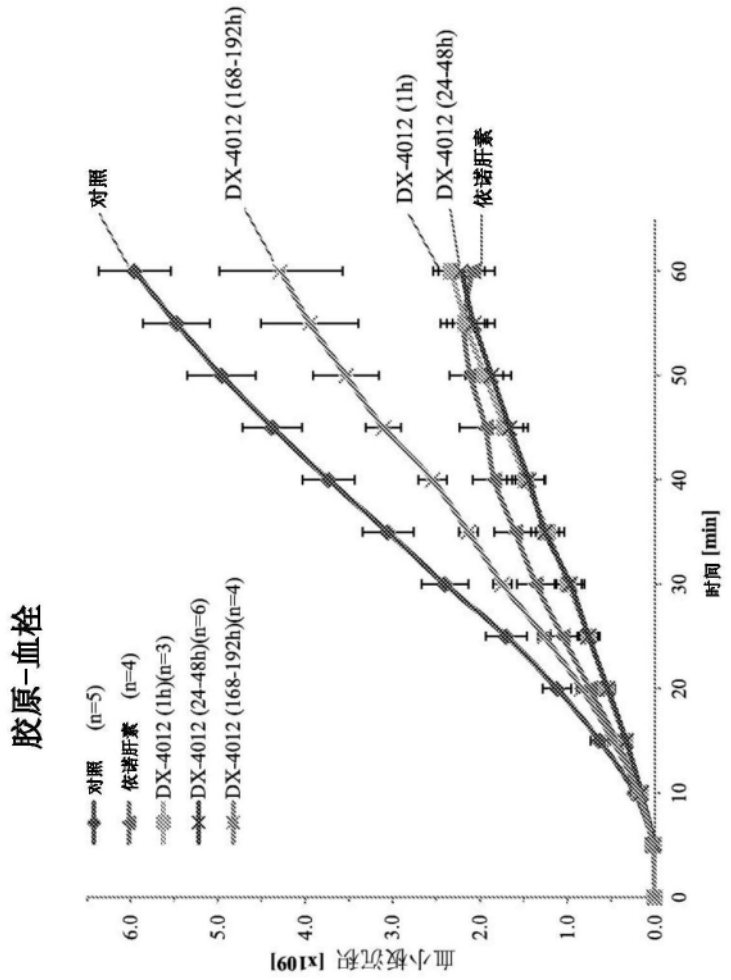

胶原-血栓
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)
对照
DX-4012 (168-192h)
DX-4012 (1h)
DX-4012 (24-48h)
依诺肝素
血小板沉积 [x10⁹]
时间 [min]
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
0
10
20
30
40
50
60

图12

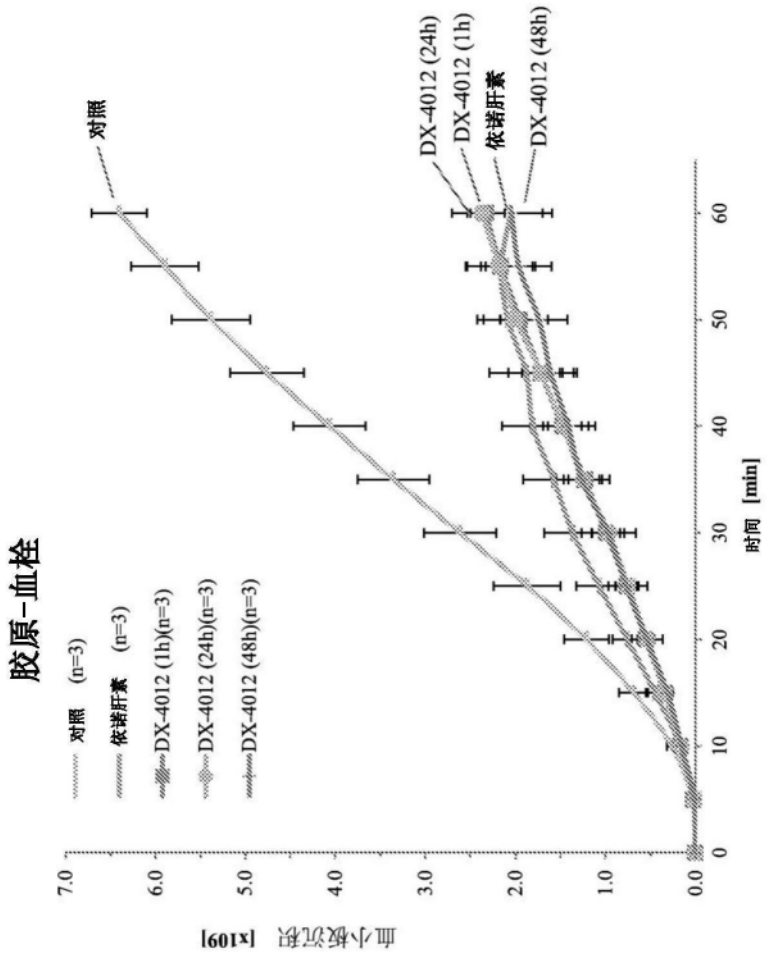

胶原-血栓
对照 (n=3)
依诺肝素 (n=3)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24h)(n=3)
DX-4012 (48h)(n=3)
对照
DX-4012 (24h)
DX-4012 (1h)
依诺肝素
DX-4012 (48h)
血小板沉积 [x10⁹]
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
时间 [min]

图13

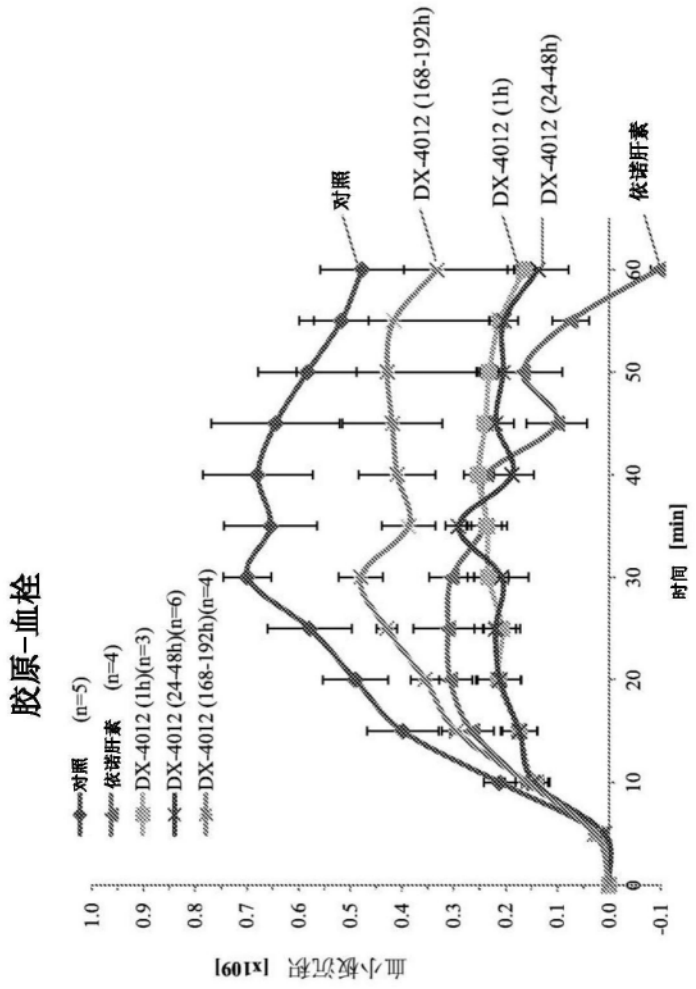
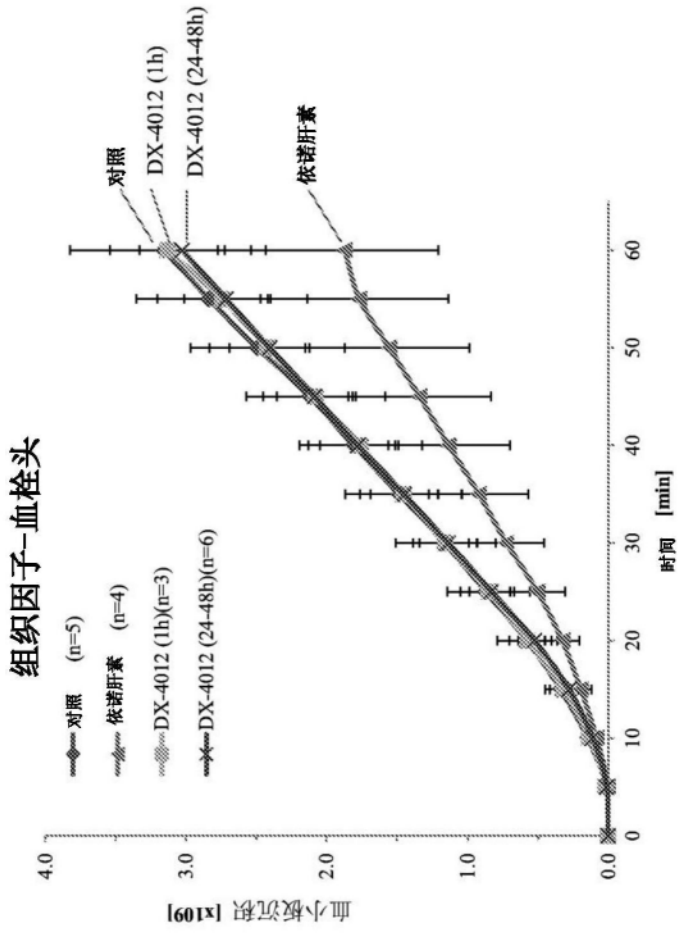

胶原-血栓
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=4)
血小板沉积 [x10⁹]
时间 [min]
对照
DX-4012 (168-192h)
DX-4012 (1h)
DX-4012 (24-48h)
依诺肝素

图14


组织因子-血栓头
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
对照
DX-4012 (1h)
DX-4012 (24-48h)
依诺肝素
血小板沉积 [x10⁹]
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
时间 [min]

A.

图15

B.

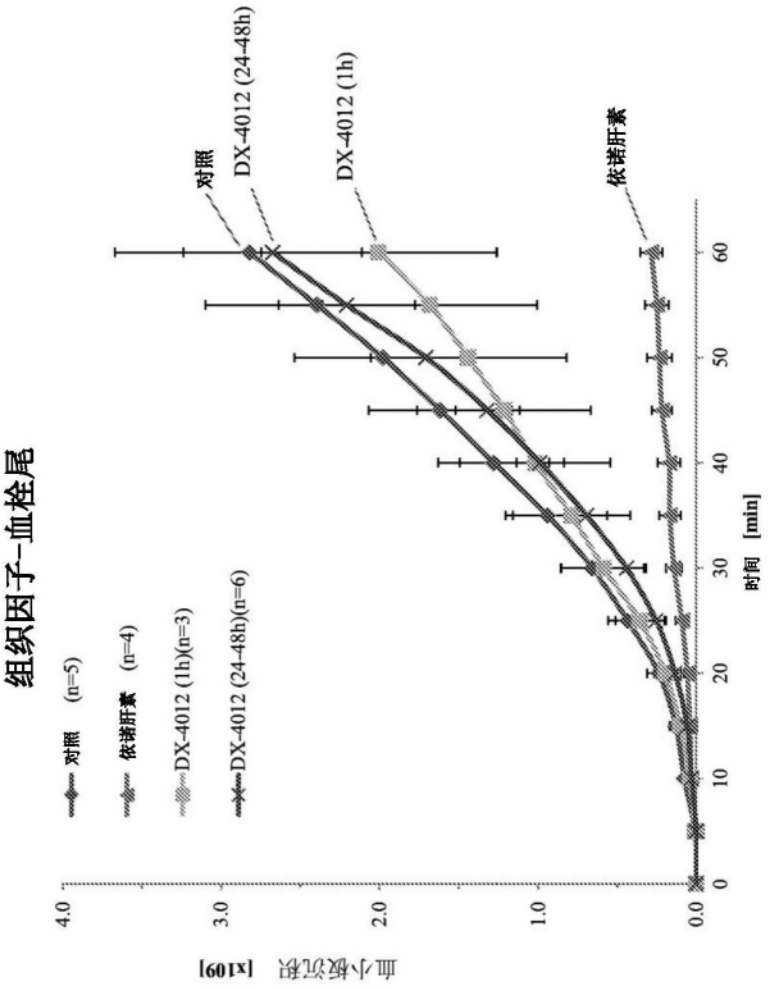

组织因子-血栓尾
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
对照
DX-4012 (24-48h)
DX-4012 (1h)
依诺肝素
血小板沉积 [x10⁹]
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
时间 [min]

图15(续)

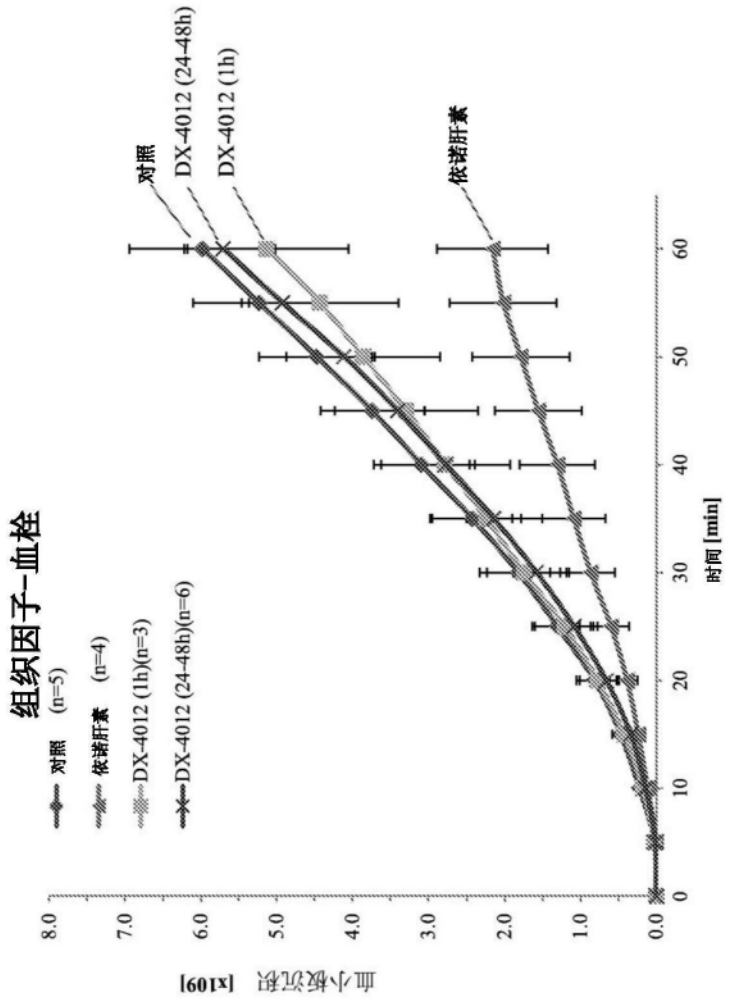

组织因子-血栓
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
对照
DX-4012 (24-48h)
DX-4012 (1h)
依诺肝素
血小板沉积 [x109]
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
时间 [min]

图16

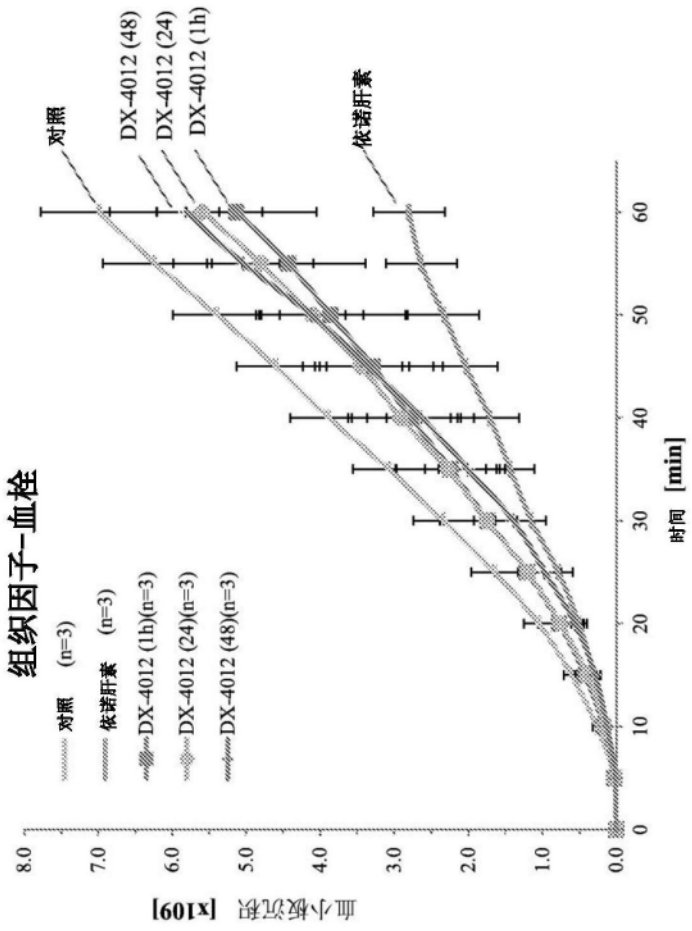

组织因子-血栓
对照 (n=3)
依诺肝素 (n=3)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24)(n=3)
DX-4012 (48)(n=3)
对照
DX-4012 (48)
DX-4012 (24)
DX-4012 (1h)
依诺肝素
血小板沉积 [x10⁹]
时间 [min]
0.0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
0
10
20
30
40
50
60

图17

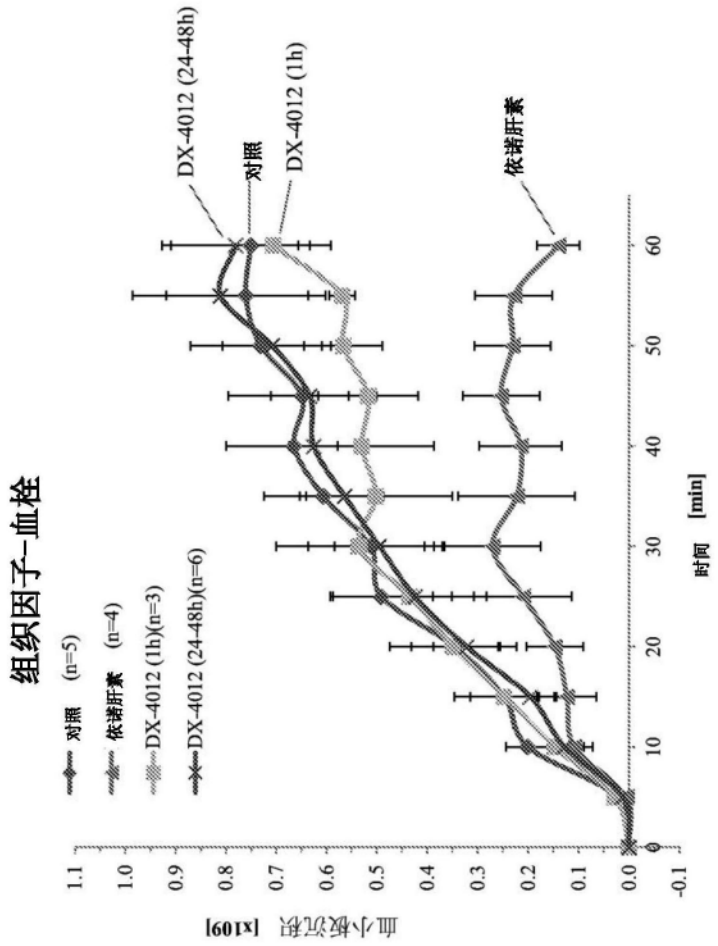

组织因子-血栓
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (24-48h)
对照
DX-4012 (1h)
依诺肝素
血小板沉积 [x10⁹]
时间 [min]
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
-0.1
0
10
20
30
40
50
60

图18

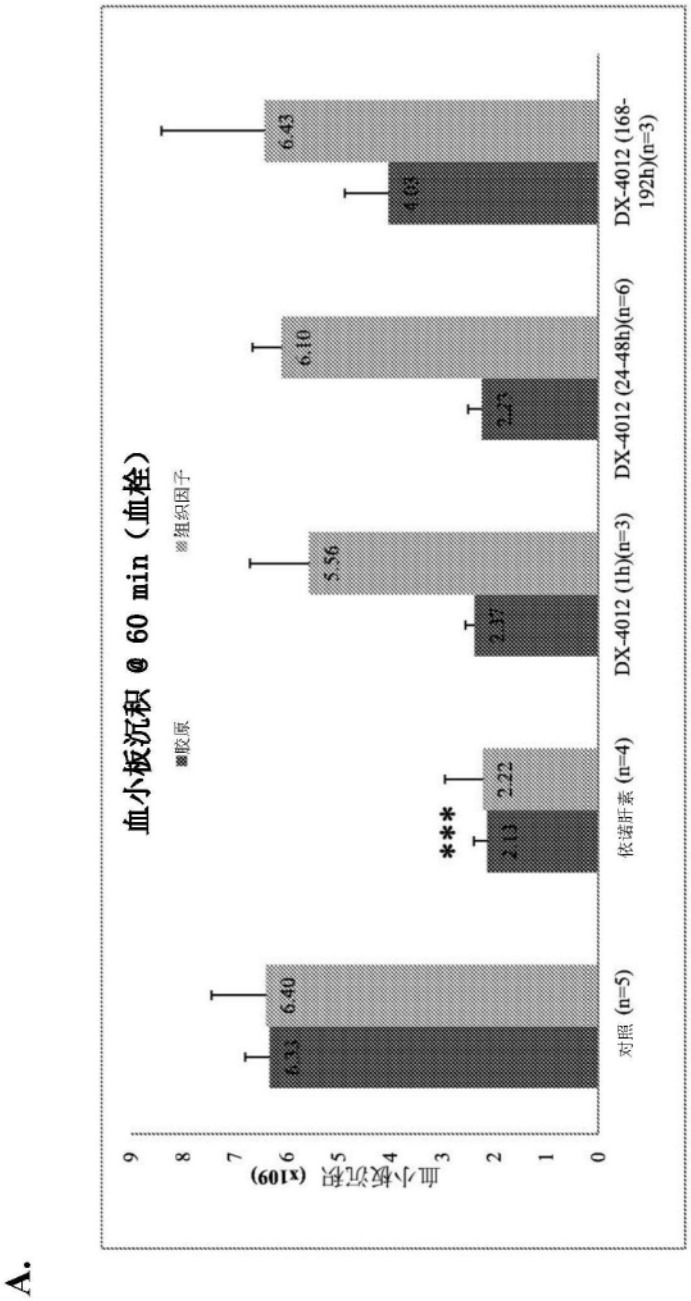

A.
血小板沉积 @ 60 min（血栓）
■胶原
▒组织因子
血小板沉积 (x10⁹)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
6.33
6.40
2.13
***
2.22
2.37
5.56
2.23
6.10
4.03
6.43
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=3)

图19

B.

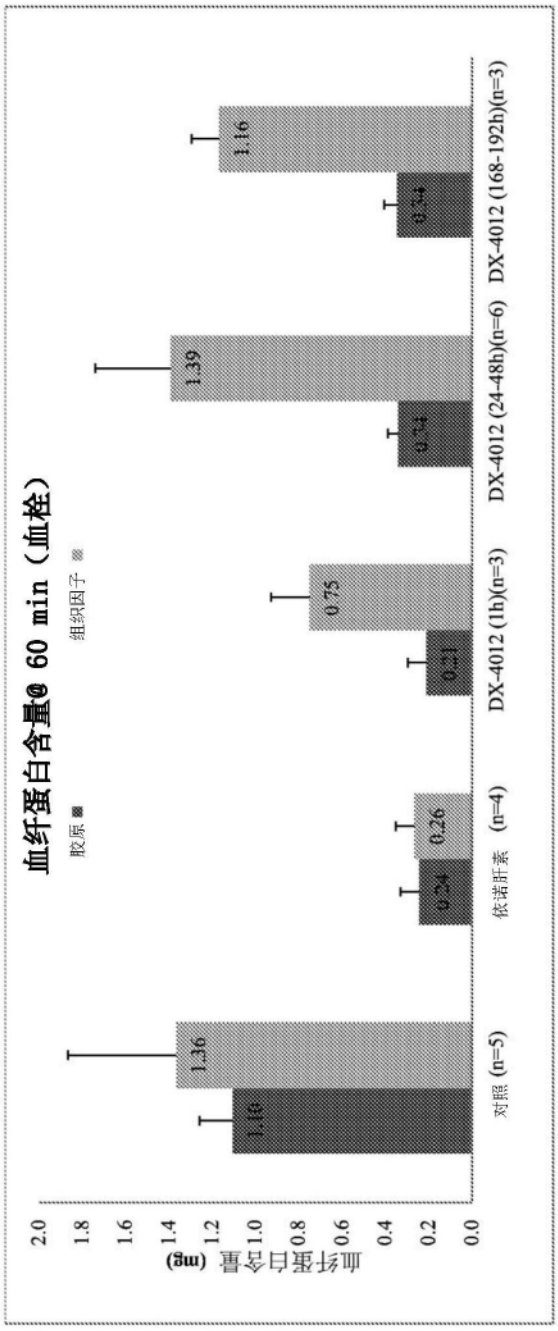

血纤蛋白含量@ 60 min（血栓）
胶原
组织因子
血纤蛋白含量 (mg)
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
1.10
1.36
0.24
0.26
0.75
0.21
1.39
0.74
1.16
0.74
对照 (n=5)
依诺肝素 (n=4)
DX-4012 (1h)(n=3)
DX-4012 (24-48h)(n=6)
DX-4012 (168-192h)(n=3)

图19(续)

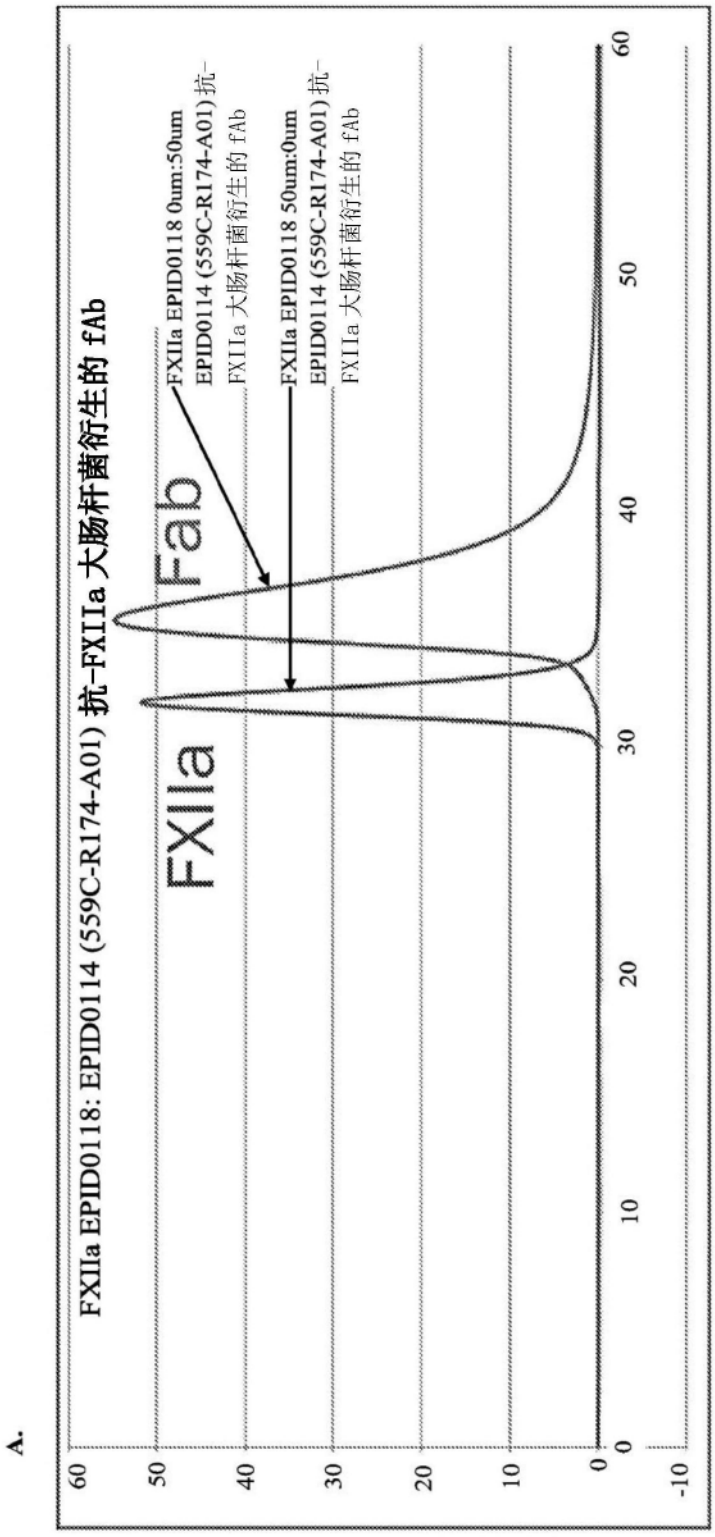

A.
FXIIa EPID0118: EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa
Fab
FXIIa EPID0118 0um:50um
EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-
FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 50um:0um
EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-
FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
60
50
40
30
20
10
0
-10
0
10
20
30
40
50
60

图20

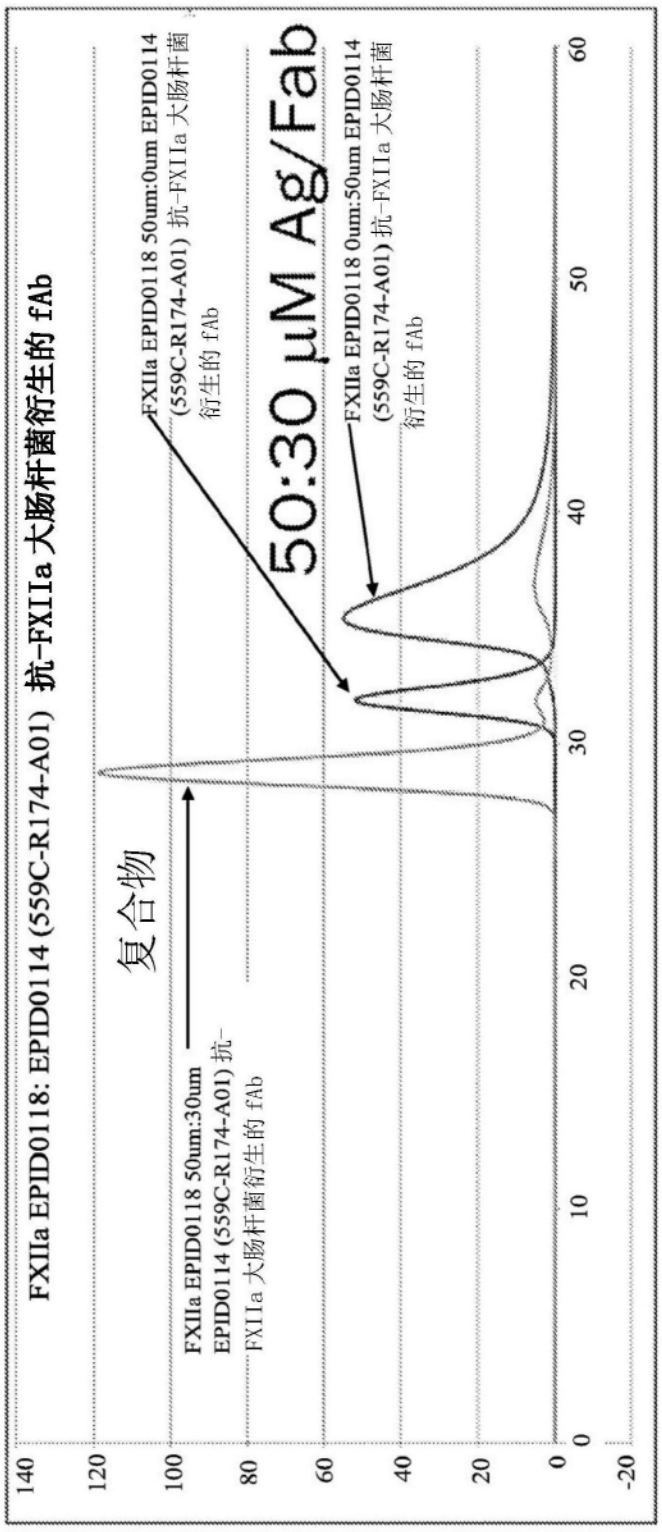

B.
FXIIa EPID0118: EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
10
20
30
40
50
60
复合物
50:30 μM Ag/Fab
FXIIa EPID0118 50um:30um EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 50um:0um EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 0um:50um EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb

图20(续)

C.

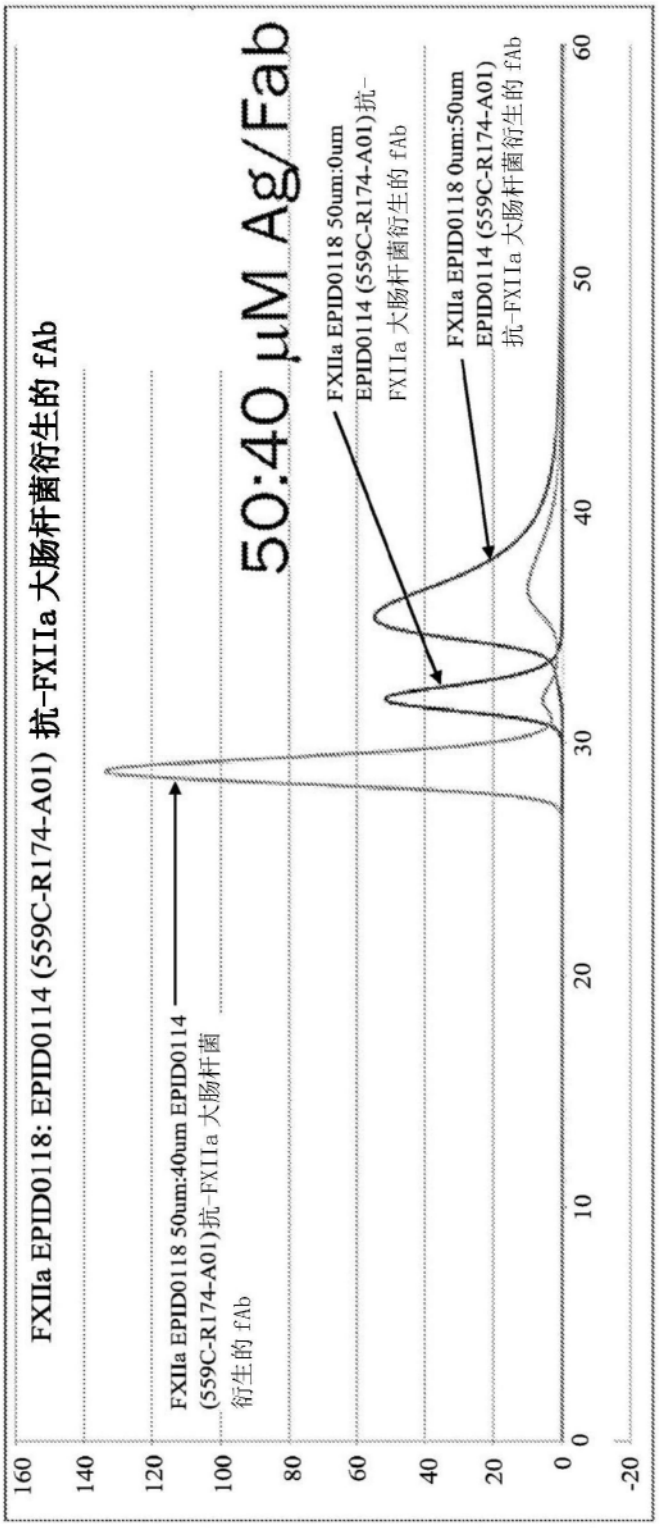

FXIIa EPID0118: EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
50:40 μM Ag/Fab
FXIIa EPID0118 50um:40um EPID0114 (559C-R174-A01)抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 50um:0um EPID0114 (559C-R174-A01)抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 0um:50um EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
10
20
30
40
50
60

图20(续)

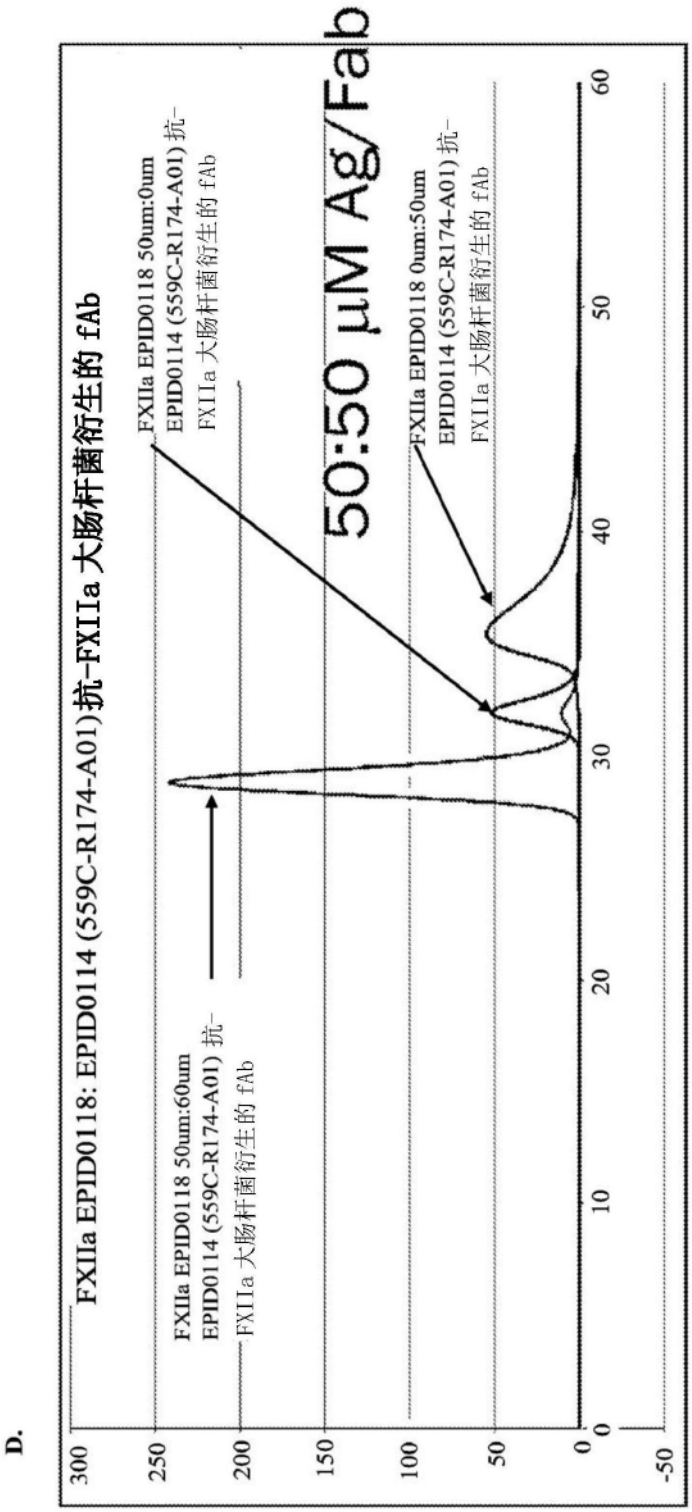

D.
FXIIa EPID0118: EPID0114 (559C-R174-A01)抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
50:50 µM Ag/Fab
FXIIa EPID0118 50um:0um
EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-
FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 50um:60um
EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-
FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 0um:50um
EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-
FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
300
250
200
150
100
50
0
-50
0
10
20
30
40
50
60

图20(续)

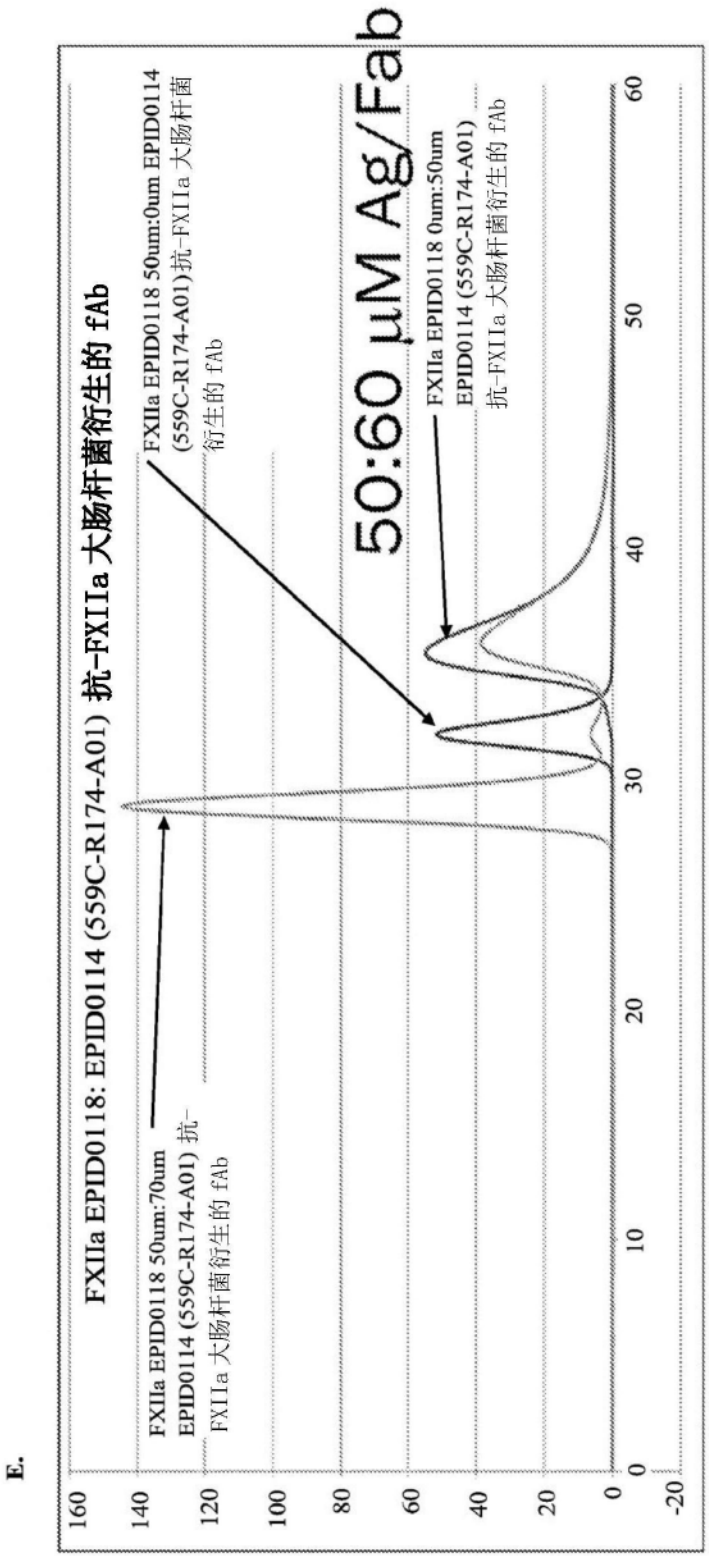

E.
FXIIa EPID0118: EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
50:60 μM Ag/Fab
FXIIa EPID0118 50um:70um EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 50um:0um EPID0114 (559C-R174-A01)抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
FXIIa EPID0118 0um:50um EPID0114 (559C-R174-A01) 抗-FXIIa 大肠杆菌衍生的 fAb
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
10
20
30
40
50
60

图20(续)

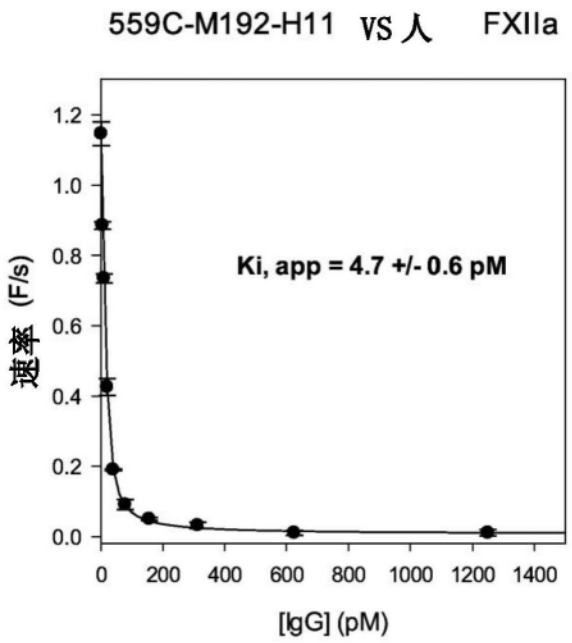
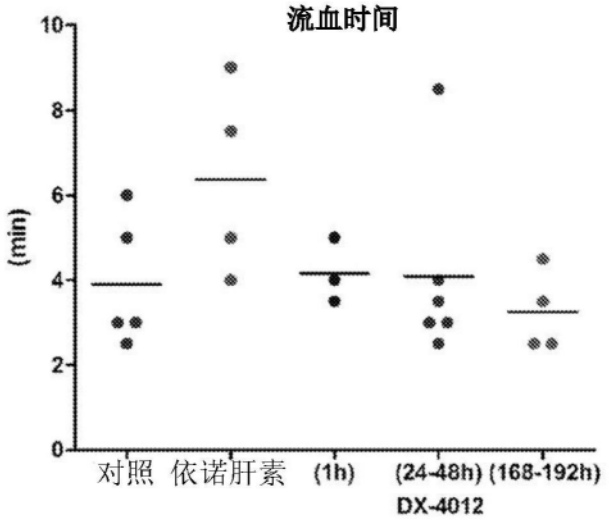

559C-M192-H11 vs 人 FXIIa
Ki, app = 4.7 +/- 0.6 pM
速率 (F/s)
[IgG] (pM)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
0
200
400
600
800
1000
1200
1400

图21

A.


流血时间
10
8
6
4
2
0
(min)
对照
依诺肝素
(1h)
(24-48h)
(168-192h)
DX-4012

B.

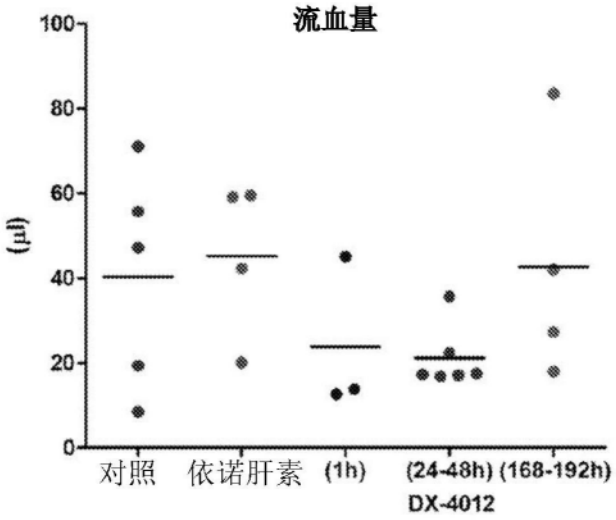

流血量
100
80
60
40
20
0
(μl)
对照
依诺肝素
(1h)
(24-48h)
(168-192h)
DX-4012

图22