



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107614532 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201680018200.7

D·J·塞克斯顿

(22)申请日 2016.03.30

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

(30)优先权数据

62/140,289 2015.03.30 US

62/140,277 2015.03.30 US

62/214,293 2015.09.04 US

代理人 王建秀 郝名悦

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/024921 2016.03.30

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/160926 EN 2016.10.06

(71)申请人 戴埃克斯有限公司

地址 美国马萨诸塞州

权利要求书2页 说明书32页

(72)发明人 Y·群 B·阿德尔曼

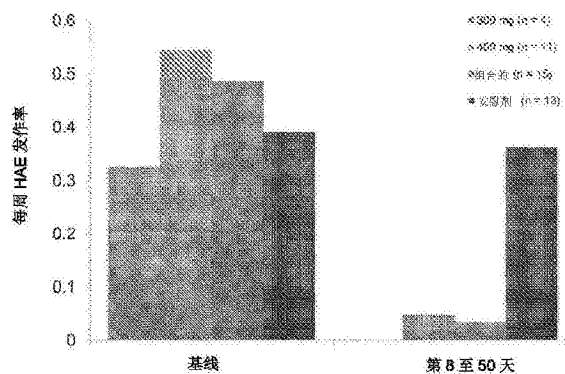
序列表6页 附图10页

(54)发明名称

血浆激肽释放酶抑制剂及其预防遗传性血管性水肿发作的用途

(57)摘要

本文提供的是结合活性血浆激肽释放酶的血浆激肽释放酶抗体以及使用此类抗体预防遗传性血管性水肿发作或降低遗传性血管性水肿发作率的方法。



1. 一种预防遗传性血管性水肿 (HAE) 发作或降低HAE发作的方法,所述方法包括:
向需要其的受试者施用约100mg至约400mg的抗体,所述抗体与DX-2930结合相同的表位或与DX-2930竞争结合活性血浆激肽释放酶,其中每两周至每四周施用所述抗体至少两次。
2. 权利要求1所述的方法,其中所述抗体包含与DX-2930相同的重链互补决定区 (CDR) 和轻链互补决定区 (CDR)。
3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述抗体是全长抗体或其抗原结合片段。
4. 权利要求3所述的方法,其中所述抗体是DX-2930。
5. 权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述抗体经皮下施用。
6. 权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述受试者是患有I型HAE或II型HAE的人患者。
7. 权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述受试者是在治疗前每年经历至少2次HAE发作的人患者。
8. 权利要求7所述的方法,其中所述人患者在第一次施用之前6个月内具有至少1次HAE发作。
9. 权利要求8所述的方法,其中所述人患者在所述第一次施用之前3个月内具有至少2次HAE发作。
10. 权利要求9所述的方法,其中所述人患者在所述第一次施用之前3个月内具有至少9次HAE发作。
11. 权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述抗体每两周一次至每四周一次以约100mg至约300mg被施用于所述受试者。
12. 权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述抗体每两周一次至每四周一次以300mg被施用于所述受试者。
13. 权利要求1至10中任一项所述的方法,其中所述抗体被施用于所述受试者至少两次,所述两次之间间隔为两周至四周,并且其中一次为300mg和另一次为400mg。
14. 权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述抗体每两周被施用于所述受试者。
15. 权利要求1至13中任一项所述的方法,其中所述抗体每四周被施用于所述受试者。
16. 权利要求1至15中任一项所述的方法,其中所述抗体的施用将所述受试者的切割的激肽原降低至与健康受试者相当的水平。
17. 权利要求1至16中任一项所述的方法,其中所述抗体被配制在包含药学上可接受的载体的药物组合物中。
18. 权利要求17所述的方法,其中所述组合物包含磷酸钠、柠檬酸、组氨酸、氯化钠和吐温80。
19. 权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述抗体被配制在30mM磷酸钠、8.6mM柠檬酸、50mM组氨酸、90mM氯化钠和0.01%吐温80中,pH6.0。
20. 一种治疗遗传性血管性水肿 (HAE) 的方法,所述方法包括:
向需要其的受试者施用抗体,所述抗体与DX-2930结合相同的表位或与DX-2930竞争结合活性血浆激肽释放酶,所述抗体首先施用于加载期,然后施用于维持期;
其中在所述加载期内,所述抗体每周被施用一次,和其中在所述维持期内,所述抗体每

两周至每四周被施用一次。

21. 权利要求20所述的方法, 所述抗体包含与DX-2930相同的CDR。

22. 权利要求20或21所述的方法, 其中所述抗体是全长抗体或其抗原结合片段。

23. 权利要求22所述的方法, 其中所述抗体是DX-2930。

24. 权利要求20-23中任一项所述的方法, 其中所述抗体经皮下施用。

25. 权利要求20-24中任一项所述的方法, 其中所述受试者是患有HAE、怀疑患有HAE或处于HAE风险的人患者。

26. 权利要求20-25中任一项所述的方法, 其中施用所述抗体用于预防HAE发作或降低HAE发作。

27. 权利要求20-26中任一项所述的方法, 其中所述受试者是在治疗前每年经历至少2次HAE发作的人患者。

28. 权利要求20-27中任一项所述的方法, 其中在所述加载期内, 所述抗体以100mg至300mg被施用于所述受试者。

29. 权利要求28所述的方法, 其中所述抗体以150mg或300mg被施用于所述受试者。

30. 权利要求20-29中任一项所述的方法, 其中所述加载期为两周, 并且所述抗体在第0天、第7天和第14天被施用。

31. 权利要求20-30中任一项所述的方法, 其中在所述维持期内, 所述抗体以100mg至300mg被施用于所述受试者。

32. 权利要求31所述的方法, 其中所述抗体以150mg或300mg被施用于所述受试者。

33. 权利要求20-32中任一项所述的方法, 其中所述维持期为10周, 并且所述抗体在第28天、第42天、第56天、第70天和第84天被施用。

34. 权利要求20-33中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包括在所述维持期后每两周一次至每四周一次向所述受试者施用所述抗体。

35. 权利要求34所述的方法, 其中所述抗体以100mg至300mg被施用。

36. 权利要求35所述的方法, 其中所述抗体以300mg被施用。

37. 权利要求20-36中任一项所述的方法, 其中所述受试者患有I型或II型HAE。

38. 权利要求20-37中任一项所述的方法, 其中所述受试者在第一次施用之前每四周具有至少1次发作。

39. 权利要求20-38中任一项所述的方法, 其中所述抗体被配制在包含药学上可接受的载体的药物组合物中。

40. 权利要求39所述的方法, 其中所述药物组合物包含磷酸钠、柠檬酸、组氨酸、氯化钠和吐温80。

41. 权利要求40所述的方法, 其中所述抗体被配制在30mM磷酸钠、8.6mM柠檬酸、50mM组氨酸、90mM氯化钠和0.01%吐温80中。

血浆激肽释放酶抑制剂及其预防遗传性血管性水肿发作的用途

[0001] 相关申请

[0002] 根据35U.S.C. §119(e), 本申请要求美国临时申请第62/140,277号(2015年3月30日提交)、美国临时申请第62/214,293号(2015年9月24日提交)和美国临时申请第62/140,289号(2015年3月30日提交)的权益,其每一篇的内容通过引用并入本文。

[0003] 发明背景

[0004] 血浆激肽释放酶是接触系统的丝氨酸蛋白酶组分,并且是不同炎症、心血管疾病、传染病(脓毒症)和肿瘤学疾病的潜在药物靶标(Sainz I.M.等,Thromb Haemost 98,77-83,2007)。接触系统在暴露于外源或带负电表面时通过因子XIIa而激活或在内皮细胞表面上通过脯氨酰羧肽酶而激活(Sainz I.M.等,Thromb Haemost 98,77-83,2007)。血浆激肽释放酶的激活经其因子XII的反馈激活增强了内源性凝血并且经促炎症性九肽缓激肽的产生而增强了炎症。作为循环中的主要激肽原酶,血浆激肽释放酶是脉管系统中缓激肽产生的主要原因。血浆激肽释放酶的主要天然抑制剂C1抑制蛋白(C1-INH)中的遗传缺陷导致遗传性血管性水肿(HAE)。患有HAE的患者遭受通常由未知引发物引起的疼痛性水肿的急性发作(Zuraw B.L.等,N Engl J Med 359,1027-1036,2008)。

[0005] 发明概述

[0006] 本公开部分基于来源于临床研究的结果,所述结果证明DX-2930(一种结合于人血浆激肽释放酶的活化型的抗体)的剂量(例如,每两周施用的30mg、100mg、300mg或400mg)在人患者中预防HAE发作或降低HAE发作率方面显示出意想不到的效果。此外,当施用于人时,DX-2930治疗没有显示剂量限制性毒性的证据。总体上,从本发明的研究获得的结果是意想不到的,因为DX-2930是首例在HAE治疗中表现出高效的完全特异性的血浆激肽释放酶抑制剂。这表明血浆激肽释放酶对疾病发病机制极其重要。

[0007] 因此,本公开的一个方面的特征在于一种预防HAE(例如I型、II型或III型HAE)发作或降低HAE发作率的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量(例如约30mg-400mg、约100mg-400mg、约100mg-300mg或约300mg-400mg)的结合于人血浆激肽释放酶的活化型的抗体(例如DX-2930)。在一些实施方案中,抗体每两周至每四周被施用至少两次。在一些实施方案中,抗体以300mg或400mg每两周至每四周(例如每两周或每四周)被施用。

[0008] 在本文所述的任何一种方法中,可以通过皮下施用来施用抗体。在一些实施方案中,受试者是每年经历至少两次HAE发作(例如,在第一次施用之前6个月内至少1次HAE发作、在第一次施用之前3个月内至少2次HAE发作、或在第一次施用之前3个月内至少9次HAE发作)的人患者。HAE可以是I型HAE或II型HAE。例如,本文所述的方法是用于HAE的预防性治疗。

[0009] 用于本文所述任何方法的抗体可以是与DX-2930结合相同的表位的抗体或与DX-2930竞争结合活性人血浆激肽释放酶的抗体(例如,全长抗体或抗原结合片段)。在一些实施方案中,抗体包含相同的重链CDR和轻链CDR。在一个实施例,抗体是DX-2930。本文所述的任何抗体(例如DX-2930)可被配制在药物组合物中,所述药物组合物包含药学上可接受

的载体。在一些实施例中,药物组合物包含磷酸钠、柠檬酸、组氨酸、氯化钠和吐温80。在一个实施例中,将抗体(例如DX-2930)配制在30mM磷酸钠、8.6mM柠檬酸、50mM组氨酸、90mM氯化钠和0.01%吐温80中,pH 6.0。

[0010] 在另一方面,本公开的特征在于一种治疗HAE(例如I型、II型或III型)的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用有效量(例如100-400mg、100-300mg、150mg或300mg)的结合于人血浆激肽释放酶的活化型的抗体(例如,DX-2930),其中DX-2930抗体以这样的剂量方案被施用:所述剂量方案具有加载期(loading period)(例如,首先每周被施用,诸如达至少一周)、维持期(maintenance period)(例如,随后每两周至每四周被施用)以及任选的随访期。

[0011] 在一些实施方案中,在加载期内将抗体以100至300mg(例如,150mg或300mg)施用于受试者。加载期可为两周。抗体可在第0天、第7天和第14天,以例如150mg或300mg被施用。

[0012] 可替代地或另外,在维持期内将抗体以100至300mg(例如,150mg或300mg)施用于受试者。维持期可持续10周。抗体可在第28天、第42天、第56天、第70天和第84天被施用。

[0013] 在本文所述的任何方法中,所述方法还可包括在维持期之后每两周至每四周(例如每两周或每四周)一次向受试者施用抗体。在一些实施例中,抗体以100至400mg(例如,100mg至300mg,例如150mg或300mg)被施用。

[0014] 在本文所述的任何一种方法的一些实施方案中,可以通过皮下施用来施用抗体。在一些实施方案中,受试者是遭受HAE发作、怀疑具有HAE发作或处于HAE发作风险的人患者。例如,本文所述的方法是用于HAE的预防性治疗。受试者可以是在治疗之前每年经历至少2次发作(例如每4周至少1次发作)的人患者。在一些实施方案中,抗体被施用,以预防HAE发作或降低HAE发作率。

[0015] 在一些实施方案中,抗体(例如DX-2930)首先每周被施用,达一周、两周或三周,随后每两周、三周或四周被施用。在一些实施方案中,抗体(例如DX-2930)随后每两周被施用,达十周。在一些实施方案中,受试者在第一次施用之前每四周具有至少一次发作。

[0016] 用于本文所述任何方法中的抗体可以是与DX-2930结合相同的表位的抗体或与DX-2930竞争结合活性人血浆激肽释放酶的抗体。在一些实施方案中,抗体包含相同的重链CDR和轻链CDR。在一个实施例中,抗体是DX-2930。

[0017] 也在本公开的范围内的(a)用于治疗HAE(例如,预防HAE发作或降低HAE发作率)的药物组合物,该药物组合物包含本文所述的任何抗激肽释放酶抗体和药学上可接受的载体,其中根据本文所述的任何治疗方案将药物组合物施用于受试者;和(b)该药物组合物在制备用于治疗HAE的药物中的用途。用于预期目的的抗体的使用可以按照本文所述的治疗方案进行。

[0018] 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。通过以下附图和对几个实施方案的详细说明,以及通过附加的权利要求书,本发明的其它特征或优点将是显而易见的。

[0019] 附图简述

[0020] 图1显示在1b期研究中,在HAE患者中皮下给药后的DX-2930血浆药物水平。

[0021] 图2显示来自1b期研究的HAE患者样本的荧光活性测定。

[0022] 图3是来自1b期研究的HAE患者的SCAT169血浆的蛋白印迹分析。

[0023] 图4是来自1b期研究的HAE患者的枸橼酸钠血浆(citrated plasma)的蛋白印迹分析。

[0024] 图5是来自1b期研究的HAE患者的、经FXIIa体外激活的枸橼酸钠血浆的蛋白印迹分析。

[0025] 图6显示不同给药队列中对患者的主要功效评估周期。A:300mg队列。B:400mg队列。红色柱显示对功效的评估间隔。

[0026] 图7显示用300mg、400mg、组合(300和400mg)或安慰剂治疗的患者中HAE发作率的降低。基线定义为给药之前过去3个月内的HAE发作史。数据包括在过去3个月中基线发作率 ≥ 2 次发作的患者。第8天至第50天的发作率未针对基线发作率进行调整。基于混合模型重复测量和方差分析(基线发作率为协变量)并假定泊松分布,计算HAE发作率相对于安慰剂的降低百分比和p值。

[0027] 图8显示在安慰剂治疗的受试者中HAE发作的发生率。X轴显示研究天数。

[0028] 图9显示30mg剂量后的平均DX-2930浓度和HAE发作发生率。

[0029] 图10显示100mg剂量后平均DX-2930浓度和HAE发作发生率。

[0030] 图11显示300mg剂量后的平均DX-2930浓度和HAE发作发生率。

[0031] 图12显示400mg剂量后的平均DX-2930浓度和HAE发作发生率。排除了仅接受一次剂量的的一名患者(以得出平均药代动力学曲线)。

[0032] 图13显示历史发作率 ≥ 9 次/3个月的患者中DX-2930浓度和HAE发作。A:安慰剂患者。B:用300mg治疗的患者。和C-F:用400mg治疗的患者。

[0033] 图14显示了一种示例性的给药方案,其包括加载期和维持期,随后可以是延长的治疗期或洗脱期(washout period)。

[0034] 发明详述

[0035] 定义

[0036] 为了方便起见,在进一步描述本发明之前,在本说明书、实施例和所附权利要求书中使用的某些术语在此定义。其它术语如它们在说明书中出现地被定义。

[0037] 单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数指代,除非上下文另外明确指出。

[0038] 术语“抗体”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域(可变区)或免疫球蛋白可变结构域(可变区)序列的蛋白质。例如,抗体可包含重(H)链可变区(本文缩写为VH或HV)和轻(L)链可变区(本文缩写为VL或LV)。在另一个实施例中,抗体包含两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段(例如,单链抗体、Fab和sFab片段、F(ab')₂、Fd片段、Fv片段、scFv和结构域抗体(dAb)片段(de Wildt等,Eur J Immunol.1996;26(3):629-39)以及完全抗体。抗体可具有IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(及其亚型)的结构特征。抗体可以来自任何来源,但优选灵长类动物(人和非人灵长类动物)和灵长类源化(primatized)抗体。

[0039] VH和VL区域可进一步细分成高变区域,称为“互补决定区”(“CDR”),其中散布更保守的称为“框架区”(“FR”)的区域。已经定义了框架区和CDR的范围(参见Kabat,E.A.,等,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242(美国卫生及公共服务部,

国家卫生研究院出版号91-3242)和Chothia,C.等,(1987)J.Mol.Biol.196:901-917)。本文使用Kabat定义。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR组成,其从氨基端至羧基端以下述顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0040] 如本文所用,“免疫球蛋白可变结构域序列”是指可以形成免疫球蛋白可变结构域的结构氨基酸序列,使得一个或多个CDR区以适于抗原结合位点的构象被布置。例如,序列可包含天然存在的可变结构域的全部或部分氨基酸序列。例如,序列可省略一个、两个或更多个N-末端或C-末端氨基酸、内部氨基酸,可包含一个或多个插入或另外的末端氨基酸,或者可包含其它改变。在一个实施方案中,包含免疫球蛋白可变结构域序列的多肽可与另一个免疫球蛋白可变结构域序列缔合,以形成抗原结合位点,例如优先与血浆激肽释放酶相互作用的结构。

[0041] 抗体的V_H或V_L链可进一步包含重链恒定区或轻链恒定区的全部或部分,从而分别形成重免疫球蛋白链或轻免疫球蛋白链。在一个实施方案中,抗体是两条重免疫球蛋白链和两条轻免疫球蛋白链的四聚物,其中重免疫球蛋白链和轻免疫球蛋白链通过例如二硫键相互连接。在IgG中,重链恒定区包含三个免疫球蛋白结构域:CH1、CH2和CH3。轻链恒定区包含CL结构域。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。免疫球蛋白的轻链可以是κ类型或λ类型。在一个实施方案中,抗体被糖基化。对于抗体依赖性细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性,抗体可以是有功能的。

[0042] 抗体的一个或多个区可以是人的或实际上是人的。例如,一个或多个可变区可以是人的或实际上是人的。例如,一个或多个CDR可以是人的,例如HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2和/或LC CDR3。每一个轻链(LC)和/或重链(HC)CDR都可以是人的。HC CDR3可以是人的。一个或多个框架区可以是人的,例如HC和/或LC的FR1、FR2、FR3和/或FR4。例如,Fc区可以是人的。在一个实施方案中,所有框架区都是人的,例如衍生自人体细胞,例如产生免疫球蛋白的造血细胞或非造血细胞。在一个实施方案中,人序列是种系序列,例如由种系核酸编码。在一个实施方案中,所选Fab的框架(FR)残基可被转化为最相似的灵长类动物种系基因,特别是人种系基因中相应残基的氨基酸类型。一个或多个恒定区可以是人的或实际上是人的。例如,至少70、75、80、85、90、92、95、98或100%的免疫球蛋白可变结构域、恒定区、恒定结构域(CH1、CH2、CH3和/或CL1)或整个抗体可以是人的或实际上是人的。

[0043] 抗体的全部或部分可以由免疫球蛋白基因或其片段编码。示例性的人免疫球蛋白基因包括κ、λ、α(IgA1和IgA2)、γ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、δ、ε和μ恒定区基因以及许多免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约25KDa或约214个氨基酸)由在NH₂末端的可变区基因(约110个氨基酸)和在C₀₀H末端的κ或λ恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”(约50KDa或约446个氨基酸)类似地由可变区基因(约116个氨基酸)和其它上述恒定区基因之一,例如γ(编码约330个氨基酸)编码。人HC的长度变化很大,因为HC CDR3从约3个氨基酸残基到超过35个氨基酸残基不等。

[0044] 术语全长抗体的“抗原结合片段”指保留特异性结合感兴趣靶标的能力的全长抗体的一个或多个片段。包含在术语全长抗体的“抗原结合片段”内并且保留功能的结合片段

的实例包括 (i) Fab 片段, 一种由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的单价片段; (ii) F(ab')₂ 片段, 一种包括由在铰链区的二硫桥连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段; (iv) 由抗体单臂的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段, (v) dAb 片段 (Ward 等, (1989) Nature 341:544-546), 其由 VH 结构域组成; 和 (vi) 分离的互补决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 VL 和 VH 由单独的基因编码, 但是它们可使用重组方法通过合成接头被接合, 所述合成接头使它们能够作为单蛋白质链被制备, 在所述单蛋白质链中, VL 和 VH 区配对形成称为单链 Fv (scFv) 的单价分子。参见例如美国专利号 5,260,203、4,946,778 和 4,881,175; Bird 等. (1988) Science 242:423-426; 和 Huston 等. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。

[0045] 可使用任何适当的技术, 包括本领域技术人员已知的常规的技术, 获得抗体片段。术语“单特异性抗体”指对特定的靶标, 例如表位, 显示单一结合特异性和亲和性的抗体。该术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”, 如本文所使用的, 其指具有单分子组分的抗体或其片段的制备物, 无论抗体是如何产生的。

[0046] 通过将框架区域中的一个或多个非种系氨基酸恢复成抗体的相应种系氨基酸来“种系化”抗体, 只要基本保留结合性质即可。

[0047] 抑制常数 (K_i) 提供了抑制剂效力的度量; 其是将酶活性降低一半所需的抑制剂浓度且不依赖于酶或底物浓度。通过测量不同浓度的抑制剂 (例如抑制性结合蛋白) 对反应 (例如酶活性) 程度的抑制作用, 以不同底物浓度获得表观 K_i (K_{i,app}); 将伪一阶速率常数的变化作为抑制剂浓度的函数拟合至 Morrison 方程 (方程式 1), 得到表观 K_i 值的估计。K_i 从 K_{i,app} 对底物浓度的图的线性回归分析中推出的 y 轴截距获得。

$$[0048] \quad v = v_0 - v_0 \left(\frac{(K_{i,app} + I + E) - \sqrt{(K_{i,app} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right) \quad \text{方程式 1}$$

[0049] 其中 v = 测量速率; v₀ = 不存在抑制剂时的速率; K_{i,app} = 表观抑制常数; I = 总抑制剂浓度; 和 E = 总酶浓度。

[0050] 如本文所用, “结合亲和力”是指表观缔合常数或 K_A。K_A 是解离常数 (K_D) 的倒数。结合抗体对于特定的靶分子例如血浆激肽释放酶可例如具有至少 10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰ 和 10¹¹ M⁻¹ 的结合亲和力。相对于第二靶标, 结合抗体与第一靶标的更高亲和性结合可以通过比结合第二靶标的 K_A (或数值 K_D) 更高的结合第一靶标的 K_A (或更小的数值 K_D) 来指示。在这种情况下, 相对于第二靶标 (例如, 处于第二构象的相同蛋白质或其模拟物; 或第二蛋白质), 结合抗体对于第一靶标 (例如, 处于第一构象的蛋白质或其模拟物) 具有特异性。结合亲和力的差异 (例如, 对于特异性或其它比较) 可至少为 1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000 或 105 倍。

[0051] 结合亲和力可以通过多种方法测定, 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作为结合蛋白 (或靶标) 浓度的函数的结合的和游离的结合蛋白的浓度。通过以下方程, 结合的结合蛋白的浓度 ([结合的]) 与游离的结合蛋白的浓度 ([游离的]) 和靶标上的结合蛋白的结合位点的浓度相关, 其中, (N) 是每个靶标分子的结合位点的

数量:

[0052] $[结合的] = N \cdot [游离的] / ((1/K_A) + [游离的])$ 。

[0053] 但并不总是需要对 K_A 进行精确测定,因为有时,例如使用ELISA或FACS分析等方法测定,足以获得对亲和力的定量测量,其是与 K_A 成比例的,因此可以用于比较,例如确定更高的亲和力是否例如是2倍高,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(例如体外或体内测定)中的活性。

[0054] 术语“结合抗体”(或本文中可互换使用的“结合蛋白”)是指可与靶分子相互作用的抗体。该术语可与“配体”互换使用。“血浆激肽释放酶结合抗体”是指可与血浆激肽释放酶相互作用(例如,结合)的抗体,其包括(尤其包括)优先或特异性地与血浆激肽释放酶相互作用和/或优先或特异性地抑制血浆激肽释放酶的抗体。如果在相同条件下与不存在抗体时的血浆激肽释放酶的活性相比,抗体引起血浆激肽释放酶的活性降低,则抗体抑制血浆激肽释放酶。

[0055] “保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。本领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有下述的氨基酸:碱性侧链(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如,天冬氨酸、谷氨酸)、不带电的极性侧链(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支链侧链(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0056] 相对于本文所述的结合蛋白,结合蛋白的一个或多个框架和/或CDR氨基酸残基可能包括一个或多个突变(例如,取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代)、插入或缺失)。相对于本文所述的结合蛋白,血浆激肽释放酶结合蛋白可具有突变(例如,取代(例如,保守取代或非必需氨基酸的取代)、插入或缺失)(例如,至少一个、两个、三个或四个,和/或小于15、12、10、9、8、7、6、5、4、3或2个突变),例如,对蛋白质功能没有实质影响的突变。突变可存在于框架区、CDR和/或恒定区中。在一些实施方案中,突变存在于框架区中。在一些实施方案中,突变存在于CDR中。在一些实施方案中,突变存在于恒定区中。具体的取代是否是耐受的,即,不会不利地影响生物学性能比如结合活性,可例如通过评估突变是否是保守的或通过Bowie,等(1990) *Science* 247:1306-1310的方法预测。

[0057] “实际上人的(effectively human)”免疫球蛋白可变区是包含足够数量的人框架氨基酸位置以便免疫球蛋白可变区不在正常人中引起免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。“实际上人的”抗体是包含足够数量的人氨基酸位置以便抗体不在正常人中引起免疫原性反应的抗体。

[0058] “表位(epitope)”指被结合蛋白(例如,抗体,比如Fab或全长抗体)结合的靶标化合物上的位点。在靶标化合物是蛋白质的情况下,位点可全部由氨基酸组分组成、全部由蛋白质的氨基酸的化学修饰(例如,糖基部分)组成、或由其组合组成。重叠表位包含至少一个共同的氨基酸残基、糖基、磷酸基、硫酸基或其它分子特征。

[0059] 如果第一结合抗体与第二结合抗体结合的靶化合物上的相同位点结合,或者与第二结合抗体结合的位点重叠(例如50%、60%、70%、80%、90%或100%的重叠,例如,根据氨基酸序列或其它分子特征(例如,糖基、磷酸基或硫酸基)的位点结合,那么第一结合抗体

与第二结合抗体“结合相同的表位”。

[0060] 如果第一结合抗体与其表位的结合降低(例如,降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多)了与其表位结合的第二结合抗体的量,则第一结合抗体与第二结合抗体“竞争结合”。竞争可以是直接的(例如,第一结合抗体结合与第二结合抗体结合的表位相同或重叠的表位)或间接的(例如,第一结合抗体与其表位的结合引起靶化化合物的空间变化,其降低第二结合抗体结合其表位的能力)。

[0061] 如下进行两个序列之间“同源性(homology)”或“序列同一性(sequence identity)”(该术语在本文中可互换使用)的计算。为了最佳比较目的,比对序列(例如,缺口可引入第一和第二氨基酸或核酸序列之一或二者中,以进行最佳比对,并且为了比较目的,可忽略非同源的序列)。使用具有Blossum 62评分矩阵的GCG软件包中的GAP程序确定最佳比对为最佳分数,其中缺口罚分为12、缺口延伸罚分为4,和移码缺口罚分为5。然后,比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中相应位置的氨基酸残基或核苷酸相同氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是相同的(如本文使用的氨基酸或核酸“同一性”相当于氨基酸或核酸“同源性”)。两条序列之间的同一性百分数是序列共有的相同位置的数量的函数。

[0062] 在优选的实施方案中,为了比较目的而比对的参考序列的长度为参考序列长度的至少30%,优选至少40%,更优选至少50%,甚至更优选至少60%,和甚至更优选至少70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%或100%。例如,参考序列可以是免疫球蛋白可变结构域序列的长度。

[0063] “人源化的(humanized)”免疫球蛋白可变区是被修饰以包含足够数量的人框架氨基酸位置以便免疫球蛋白可变区不在正常人中引起免疫原性反应的免疫球蛋白可变区。对“人源化的”免疫球蛋白的描述包括例如US 6,407,213和US 5,693,762。

[0064] “分离的”抗体是指从可获得分离的抗体的天然样品的至少一种组分的至少90%中除去的抗体。如果感兴趣的种类或种类群体按重量-重量计,是至少5%、10%、25%、50%、75%、80%、90%、92%、95%、98%或99%纯的,则抗体可以“具有至少”一定程度的纯度。

[0065] 由本发明方法治疗的“患者”、“受试者”或“宿主”(这些术语可互换使用)可以指人或非人动物。

[0066] 术语“前激肽释放酶(prekallikrein)”和“前血浆激肽释放酶(preplasma kallikrein)”在本文中可互换使用,其是指活性血浆激肽释放酶的酶原形式,其也称为前激肽释放酶。

[0067] 如本文所用,术语“基本上同一的(substantially identical)”(或“基本上同源的(substantially homologous)”)在本文用于指第一氨基酸或核酸序列,其包含足够数量的、与第二氨基酸或核酸序列相同或等价的(例如,具有类似的侧链,例如,保守的氨基酸取代)氨基酸残基或核苷酸,以便第一和第二氨基酸或核酸序列具有(或编码的蛋白具有)类似的活性,例如,结合活性,结合偏好或生物学活性。在抗体的情况下,第二抗体具有相同的特异性,并且相对于相同的抗原具有至少50%,至少25%,或至少10%的亲合力。

[0068] 与本文公开的序列相似或同源(例如,至少约85%序列同一性)的序列也是本申请的一部分。在一些实施方案中,序列同一性可以为约85%、90%、91%、92%、93%、94%、

95%、96%、97%、98%、99%或更高。在一些实施方案中,血浆激肽释放酶结合抗体与本文所述的抗体可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方案中,血浆激肽释放酶结合抗体与本文所述的抗体(例如,DX-2930)在HC和/或LC框架区(例如,HC和/或LC FR1、2、3和/或4)中可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方案中,血浆激肽释放酶结合抗体与本文所述的抗体(例如,DX-2930)在HC和/或LC CDR(例如,HC和/或LC CDR1、2和/或3)中可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方案中,血浆激肽释放酶结合抗体与本文所述的抗体(例如,DX-2930)在恒定区(例如,CH1、CH2、CH3和/或CL1)中可以具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0069] 此外,当核酸区段在选择性杂交条件(例如,高度严格杂交条件)下与链的补体杂交时,存在基本上的同一性。核酸可存在于全细胞中、细胞裂解物中或以部分纯化或基本上纯的形式存在。

[0070] 统计学显著性可通过任何现有技术已知的方法确定。示例性统计学检验包括:学生T检验、Mann Whitney U非参数检验和Wilcoxon非参数统计学检验。一些统计学上显著的关系的P值小于0.05或0.02。具体的结合蛋白,例如在特异性或结合方面,可显示统计学上显著的(例如,P值<0.05或0.02)的差异。指示两种状态之间可区分的定性或定量的差异的术语,例如“诱导”、“抑制”、“促进”、“升高”、“增加”、“减少”等,可指两种状态之间的差异例如,统计学上显著的差异。

[0071] “治疗有效剂量”优选以统计学显著程度或相对于未处理的受试者以至少约20%,更优选至少约40%,甚至更优选至少约60%,以及还更优选至少约80%调节可测量的参数,例如血浆激肽释放酶活性。可以在预测在人类病症和病况中的疗效的动物模型系统中评估化合物调节可测量参数(例如疾病相关参数)的能力。可替代地,可以通过检验化合物在体外调节参数的能力来评估组合物的这种性质。

[0072] 本文所用的术语“治疗(treating)”是指将包含一种或多种活性剂的组合物应用或施用于受试者,所述受试者患有变应性疾病、具有变应性疾病的症状或对变应性疾病的倾向,目的是治疗、治愈、减轻、缓解、改变、救治、改进、改善或影响疾病、疾病症状或对疾病的倾向。“预防性治疗(prophylactic treatment)”,也称为“预防疗法(preventive treatment)”,是指旨在保护人免于疾病或降低人对疾病的风险的治疗,对于所述疾病而言,他或她已经被暴露或可能被暴露。

[0073] 术语“预防(preventing)”受试者中的疾病是指使受试者进行药物治疗,例如施用药物,使得至少一种疾病的症状被预防,即在不期望的病况(例如,宿主动物的疾病或其它不期望的状态)的临床表现之前施用,从而保护宿主免于发展不期望的病况。“预防”疾病也可以称为“预防法(prophylaxis)”或“预防性治疗”。

[0074] “预防有效量(prophylactically effective amount)”是指在达到期望的预防结果所需的剂量和时间段内有效的量。通常,由于预防剂量在疾病之前或在疾病的较早阶段用于受试者,因此预防有效量将小于治疗有效量。

[0075] 对血浆激肽释放酶特异性的抗体

[0076] 用于本文所述方法的血浆激肽释放酶结合抗体可以是全长的(例如,IgG(例如,

IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(例如,IgA1、IgA2)、IgD和IgE)或可仅包含抗原结合片段(例如Fab、F(ab')₂或scFv片段)。结合抗体可包含两个重链免疫球蛋白和两个轻链免疫球蛋白,或可以是单链抗体。血浆激肽释放酶结合抗体可以是重组蛋白,例如人源化抗体、CDR移植抗体、嵌合抗体、去免疫化抗体或体外产生的抗体,并且可以任选地包含源自人种系免疫球蛋白序列的恒定区。在一个实施方案中,血浆激肽释放酶结合抗体是单克隆抗体。

[0077] 一方面,本公开的特征在于抗体(例如,分离的抗体),其结合于血浆激肽释放酶(例如人血浆激肽释放酶和/或鼠激肽释放酶)并且包含至少一个免疫球蛋白可变区。例如,抗体包含重链(HC)免疫球蛋白可变结构域序列和/或轻链(LC)免疫球蛋白可变结构域序列。在一个实施方案中,抗体结合并抑制血浆激肽释放酶,例如人血浆激肽释放酶和/或鼠激肽释放酶。

[0078] 抗体可包括一个或多个以下特征:(a)人CDR或人框架区;(b)HC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的HC可变结构域的CDR具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的一个或多个(例如,1、2或3个)CDR;(c)LC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的LC可变结构域的CDR具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%同一性的一个或多个(例如,1、2或3个)CDR;(d)LC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的LC可变结构域(例如,总体上或在框架区或CDR中)的同一性是至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%;(e)HC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的HC可变结构域(例如,总体上或在框架区或CDR中)的同一性是至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%;(f)抗体结合本文所述的抗体结合的表位,或与本文所述的抗体竞争结合;(g)灵长类动物CDR或灵长类动物框架区;(h)HC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的HC可变结构域的CDR1相差至少一个氨基酸但不超过2或3个氨基酸的CDR1;(i)HC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的HC可变结构域的CDR2相差至少一个氨基酸但不超过2、3、4、5、6、7或8个氨基酸的CDR2;(j)HC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的HC可变结构域的CDR3相差至少一个氨基酸但不超过2、3、4、5或6个氨基酸的CDR3;(k)LC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的LC可变结构域的CDR1相差至少一个氨基酸但不超过2、3、4或5个氨基酸的CDR1;(l)LC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的LC可变结构域的CDR2相差至少一个氨基酸但不超过2、3或4个氨基酸的CDR2;(m)LC免疫球蛋白可变结构域序列包含与本文所述的LC可变结构域的CDR3相差至少一个氨基酸但不超过2、3、4或5个氨基酸的CDR3;(n)LC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的LC可变结构域(例如,整体或在框架区或CDR中)相差至少一个氨基酸但不超过2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸;和(o)HC免疫球蛋白可变结构域序列与本文所述的HC可变结构域(例如,整体或在框架区或CDR中)相差至少一个氨基酸但不超过2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸。

[0079] 血浆激肽释放酶结合蛋白可以是分离的抗体(例如,至少70、80、90、95或99%不含其它蛋白质)。在一些实施方案中,将血浆激肽释放酶结合抗体或其组合物与相比血浆激肽释放酶结合抗体无活性或部分活性(例如,以5000nM或更大的K_{i,app}结合血浆激肽释放酶)的抗体切割(cleavage)片段(例如,DX-2930)分离。例如,血浆激肽释放酶结合抗体至少70%不含这种抗体切割片段;在其它实施方案中,结合抗体至少80%、至少90%、至少95%、至少99%或甚至100%不含无活性或部分活性的抗体切割片段。

[0080] 血浆激肽释放酶结合抗体可另外抑制血浆激肽释放酶,例如人血浆激肽释放酶。

[0081] 在一些实施方案中,血浆激肽释放酶结合抗体不结合前激肽释放酶(例如,人类前激肽释放酶和/或鼠前激肽释放酶),但与血浆激肽释放酶(例如人血浆激肽释放酶和/或鼠激肽释放酶)的活化型结合。

[0082] 在某些实施方案中,抗体在血浆激肽释放酶或其片段的催化结构域的活性位点处或其附近结合,或结合与血浆激肽释放酶的活性位点重叠的表位。

[0083] 在一些方面,抗体与本文所述的抗体结合相同的表位或与本文所述的抗体竞争结合。

[0084] 抗体可以以至少 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 和 $10^{11}M^{-1}$ 的结合亲和力结合血浆激肽释放酶,例如人血浆激肽释放酶。在一个实施方案中,抗体以慢于 1×10^{-3} 、 $5 \times 10^{-4}s^{-1}$ 或 $1 \times 10^{-4}s^{-1}$ 的 K_{off} 结合人血浆激肽释放酶。在一个实施方案中,抗体以快于 1×10^2 、 1×10^3 或 $5 \times 10^3M^{-1}s^{-1}$ 的 K_{on} 结合人血浆激肽释放酶。在一个实施方案中,抗体结合血浆激肽释放酶,但不结合组织激肽释放酶和/或血浆前激肽释放酶(例如,相对于其结合血浆激肽释放酶,该抗体较低效地结合组织激肽释放酶和/或血浆前激肽释放酶(例如,效力是五分之一、十分之一、50分之一、100分之一或1000分之一倍,或者根本不结合,例如,与阴性对照相比))。

[0085] 在一个实施方案中,抗体,例如,以小于 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 $10^{-10}M$ 的 K_i 抑制人血浆激肽释放酶活性。抗体可具有,例如,小于100nM、10nM、1nM、0.5nM或0.2nM的 IC_{50} 。例如,抗体可调节血浆激肽释放酶活性以及因子XIIa(例如,来自因子XII)和/或缓激肽(例如,来自高分子量激肽原(HMWK))的产生。抗体可抑制血浆激肽释放酶活性和/或因因子XIIa(例如,来自因子XII)和/或缓激肽(例如,来自高分子量激肽原(HMWK))的产生。抗体对人血浆激肽释放酶的亲和力可以通过小于100nm、小于10nM、小于5nM、小于1nM、小于0.5nM的 K_D 来表征。在一个实施方案中,抗体抑制血浆激肽释放酶,但不抑制组织激肽释放酶(例如,相对于其抑制血浆激肽释放酶,该抗体较低效地抑制组织激肽释放酶(例如,效力是五分之一、十分之一、50分之一、100分之一或1000分之一倍或甚至完全不抑制,例如,与阴性对照相比))。

[0086] 在一些实施方案中,抗体具有小于1000、500、100、5、1、0.5或0.2nM的表观抑制常数($K_{i,app}$)。

[0087] 血浆激肽释放酶结合抗体可以使其HC和LC可变结构域序列包含在单个多肽中(例如,scFv),或者在不同的多肽上(例如,IgG或Fab)。

[0088] 在一个实施方案中,HC和LC可变结构域序列是相同多肽链的组分。在另一个实施方案中,HC和LC可变结构域序列是不同多肽链的组分。例如,抗体是IgG,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。抗体可以是可溶性Fab。在其它实施中,抗体包括Fab2'、scFv、微型抗体(minibody)、scFv::Fc融合物、Fab::HSA融合物、HSA::Fab融合物、Fab::HSA::Fab融合物,或包含本文的其中一种结合蛋白的抗原结合位点的其它分子。这些Fab的VH和VL区可以作为IgG、Fab、Fab2、Fab2'、scFv、PEG化的Fab、PEG化的scFv、PEG化的Fab2、VH::CH1::HSA+LC、HSA::VH::CH1+LC、LC::HSA+VH::CH1、HSA::LC+VH::CH1或其它合适的结构被提供。

[0089] 在一个实施方案中,抗体是人抗体或人源化抗体,或在人中是非免疫原性的。例如,抗体包含一个或多个人抗体框架区,例如所有人框架区,或与人框架区具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一性的框架区。在一个实施方案中,抗体包含人

Fc结构域,或与人Fc结构域具有至少95、96、97、98或99%同一性的Fc结构域。

[0090] 在一个实施方案中,抗体是灵长类动物抗体或灵长类源化抗体或在人中是非免疫原性的。例如,抗体包含一个或多个灵长类动物抗体框架区,例如所有灵长类动物框架区,或与灵长类动物框架区具有至少85、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%同一性的框架区。在一个实施方案中,抗体包含灵长类动物Fc结构域,或与灵长类动物Fc结构域具有至少95、96、97、98或99%同一性的Fc结构域。“灵长类动物”包括人(智人(*Homo sapiens*))、黑猩猩(黑猩猩(*Pan troglodytes*)和倭黑猩猩(*Pan paniscus*)(倭黑猩猩))、大猩猩(*Gorilla gorilla*)、长臂猿、猴子、狐猴、狐猿(指猴(*Daubentonia madagascariensis*))和眼镜猴。

[0091] 在一些实施方案中,灵长类动物抗体对人血浆激肽释放酶的亲和力的特征在于K_D小于1000、500、100、10、5、1、0.5nM,例如小于10nM、小于1nM、或小于0.5nM。

[0092] 在某些实施方案中,抗体不包含来自小鼠或兔子的序列(例如,不是鼠或兔抗体)。

[0093] 在一些实施方案中,本文所述方法中使用的抗体可以是如本文所述的DX-2930或其功能变体,或与DX-2930结合相同表位的抗体或与DX-2930竞争结合活性血浆激肽释放酶的抗体。

[0094] 在一个实施例,DX-2930的功能变体包含与DX-2930相同的互补决定区(CDR),如通过相同方法测定的。在另一个实施例中,与DX-2930的V_H和V_L中的那些FR相比,DX-2930的功能变体可在V_H或V_L的FR中含有一个或多个突变(例如保守取代)。优选地,这类突变不会发生在被预测与一个或多个CDR相互作用的残基处,这可以通过常规技术来确定。在其它实施方案中,本文所述的功能变体在DX-2930的一个或多个CDR区内含有一个或多个突变(例如1、2或3个)。优选地,这样的功能变体保留与亲本相同的、负责抗原结合的区域/残基。在其它实施方案中,DX-2930的功能变体可包含V_H链和/或V_L链,所述V_H链包含与DX-2930的V_H的氨基酸序列具有至少85%(例如90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列,所述V_L链包含与DX-2930的V_L的氨基酸序列具有至少85%(例如,90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列。这些变体能够结合血浆激肽释放酶的活化型,优选不结合前激肽释放酶。

[0095] 使用Karlin和Altschul *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87:2264-68,1990的算法,在Karlin和Altschul *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*90:5873-77,1993中改良,确定两条氨基酸序列的“同一性百分比”。这样的算法被并入Altschul,等,*J.Mol.Biol.*215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)中。可以用XBLAST程序,得分=50,字长=3,进行BLAST蛋白检索,以获得与感兴趣的蛋白质分子同源的氨基酸序列。在两条序列之间存在缺口的情况下,可以利用如Altschul等,*Nucleic Acids Res.*25(17):3389-3402,1997描述的Gapped BLAST。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各自程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0096] 在一些实施方案中,本文所述的方法和组合物中使用的抗体可以是DX-2930抗体。以下提供了DX-2930的重链和轻链全序列和可变结构域序列,其中信号序列为斜体。CDR以粗体显示并加下划线(基于Kabat编号方案)。

[0097] DX-2930重链氨基酸序列(451个氨基酸,49439.02 Da)

[0098] *MGWSCILFLVATATGAHSEVQLLES*GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **HYIMM**

WVRQAPGKGLEWVS **GIYSSGGITVYADSVKG**RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAY
RRIGVPRRDEFDI

WGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS
KAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:1)

[0099] DX-2930轻链氨基酸序列(213个氨基酸,23419.08Da)

[0100] *MGWSCILFLVATATGAHS*DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITC **RASQSISSWLA**
WYQQKPGKAPKLLIY**KASTLES**GVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSSLQPDDFATYYC**QQ YNTYWT**
FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS
LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:2)

[0101] DX-2930重链可变结构域氨基酸序列

[0102] EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **HYIMM**WVRQAPGKGLEWVS **GI**
YSSGGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAY**RRIGV PRRDEFDI**
WGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:3)

[0103] DX-2930轻链可变结构域氨基酸序列

[0104] DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITC**RASQSISSWLA**WYQQKPGKAPKLLIY**KAST LES**
GVPSRFSGSGSGTEFTLTITSSSLQPDDFATYYC**QQYNTYWT**FGQGTKVEIK (SEQ ID NO:4)

[0105] 表1.DX-2930的CDR。

[0106]

CDR	氨基酸序列
重链CDR1	HYIMM (SEQ ID NO:5)
重链CDR2	GIYSSGGITVYADSVKG (SEQ ID NO:6)
重链CDR3	RRIGVPRRDEFDI (SEQ ID NO:7)
轻链CDR1	RASQSISSWLA (SEQ ID NO:8)
轻链CDR2	KASTLES (SEQ ID NO:9)
轻链CDR3	QQYNTYWT (SEQ ID NO:10)

[0107] 抗体制备

[0108] 本文所述的抗体(例如,DX-2930)可以通过本领域已知的任何方法制备。参见例如Harlow和Lane, (1988)《抗体:实验手册》,冷泉港实验室,纽约;和Greenfield, (2013)《抗体:实验手册》,第二版,冷泉港实验室出版社。

[0109] 编码感兴趣的抗体(例如DX-2930)的序列可以在宿主细胞中在载体中保持,然后可以扩增和冷冻宿主细胞以备将来使用。可选地,多核苷酸序列可用于遗传操作以使抗体“人源化”或改善抗体的亲和力(亲和力成熟)或其它特征。例如,如果抗体用于人的临床试验和治疗,则恒定区可被工程化,以更像人恒定区,从而避免免疫应答。遗传操纵抗体序列以获得对靶抗原的更大亲和力和在抑制PKA1活性方面更大的功效可能是期望的。对于本领域技术人员显而易见的是,可以对抗体进行一个或多个多核苷酸改变,并且仍然保持其与

靶抗原的结合特异性。

[0110] 在其它实施方案中,可以通过使用经工程化以表达特定人免疫球蛋白蛋白质的商业上可用的小鼠来获得完全人抗体。被设计来产生更理想(例如,完全人抗体)或更强健的免疫应答的转基因动物也可用于产生人源化抗体或人抗体。这类技术的实例是来自Amgen, Inc. (加利福尼亚州弗里蒙特)的Xenomouse^{RTM}和来自Medarex, Inc. (新泽西州普林斯顿)的HuMAb-Mouse^{RTM}和TC MouseTM。在另一个替代方案中,可以通过噬菌体展示技术或酵母技术经重组制备抗体。参见例如美国专利号5,565,332;5,580,717;5,733,743和6,265,150;和Winter等, (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455。可替代地,可以使用噬菌体展示技术(McCafferty等, (1990) *Nature* 348:552-553)从来自未经免疫供体的免疫球蛋白可变(V)结构域基因库中体外产生人抗体和抗体片段。

[0111] 可以通过常规方法制备完整抗体(全长抗体)的抗原结合片段。例如,可以通过胃蛋白酶消化抗体分子产生F(ab')₂片段,以及可通过还原F(ab')₂片段的二硫桥产生Fab片段。

[0112] 基因工程抗体,如人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体和双特异性抗体,可以通过例如常规重组技术产生。在一个实施例中,可以容易地分离或合成编码对靶抗原特异性的单克隆抗体的DNA。DNA可被放置在一个或多个表达载体中,然后将其转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或不以另外的方式产生免疫球蛋白蛋白质的骨髓瘤细胞中,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。参见例如PCT公开号WO 87/04462。然后可以修饰DNA,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鼠序列,Morrison等, (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851,或通过共价连接到免疫球蛋白编码序列,非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列。以这种方式,可以制备基因工程抗体,例如“嵌合”抗体或“杂合”抗体,其具有靶抗原的结合特异性。

[0113] 为生产“嵌合抗体”开发的技术是本领域熟知的。参见,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。

[0114] 构建人源化抗体的方法也是本领域熟知的。参见例如,Queen等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989)。在一个实施例中,根据本领域已知的方法对亲本非人抗体的VH和VL的可变区进行三维分子建模分析。接下来,使用相同的分子建模分析来鉴定被预测对于形成正确的CDR结构重要的框架氨基酸残基。同时,使用亲本VH和VL序列作为搜索查询,从任何抗体基因数据库鉴定具有与亲本非人抗体的氨基酸序列同源的氨基酸序列的人VH和VL链。然后选择人VH和VL受体基因。

[0115] 选择的人受体基因内的CDR区可用来自亲本非人抗体或其功能性变体的CDR区代替。当需要时,被预测在与CDR区相互作用中重要的亲本链框架区内的残基(见上文描述)可用于取代人受体基因中相应的残基。

[0116] 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,可以通过重组技术制备单链抗体。优选地,在两个可变区之间并入柔性连接体。可替代地,针对生产单链抗体而描述的技术(美国专利号4,946,778和4,704,692)可适用于产生噬菌体或酵母scFv文库,并且根据常规程序可以从文库鉴定对PKa1特异性的scFv克隆。可以对阳性克隆进行进一步筛选以鉴定抑制PKa1活性的那些阳性克隆。

[0117] 一些抗体,例如Fab可以在细菌细胞例如大肠杆菌细胞中产生(参见例如Nadkarni,A.等,2007Protein Expr Purif 52(1):219-29)。例如,如果Fab由在展示实体和噬菌体蛋白(或其片段)之间包含抑制性终止密码子的噬菌体展示载体中的序列编码,则可以将载体核酸转移到不能抑制终止密码子的细菌细胞中。在这种情况下,Fab不被融合到基因III蛋白中,并被分泌到周质和/或培养基中。

[0118] 抗体也可以在真核细胞中产生。在一个实施方案中,抗体(例如,scFv的)在酵母细胞如毕赤酵母属(*Pichia*)、(参见,例如Powers等,2001,J.Immunol.Methods.251:123-35; Schoonoghe S.等,2009BMC Biotechnol.9:70;Abdel-Salam,HA.等,2001Appl Microbiol Biotechnol56(1-2):157-64;Takahashi K.等,2000Biosci Biotechnol Biochem64(10):2138-44;Edqvist,J.等,1991J Biotechnol 20(3):291-300)、汉逊酵母属(*Hansenula*)或酵母菌属(*Saccharomyces*)中表达。本领域技术人员可以通过优化例如氧条件(参见例如Baumann K.,等,2010BMC Syst.Biol.4:141)、渗透度(参见例如Dragosits,M.等,2010BMC Genomics 11:207)、温度(参见例如Dragosits,M.等,2009J Proteome Res.8(3):1380-92)、发酵条件(参见例如Ning,D.等,2005J.Biochem.and Mol.Biol.38(3):294-299)、酵母菌株(参见例如Kozyr,AV等,2004Mol Biol (Mosk) 38(6):1067-75;Horwitz,AH.等,1988Proc Natl Acad Sci U S A 85(22):8678-82;Bowdish,K.等,1991J Biol Chem266(18):11901-8)、提高抗体产生的蛋白质的超表达(参见例如Gasser,B.等,2006Biotechnol.Bioeng.94(2):353-61)、培养物的酸度水平(参见例如,Kobayashi H.,等,1997FEMS Microbiol Lett 152(2):235-42)、底物和/或离子的浓度(参见例如Ko JH.等,2006Appl Biochem Biotechnol 60(1):41-8)来优化酵母中的抗体产生。此外,酵母系统可用于产生具有延长的半衰期的抗体(参见例如Smith,BJ.等,2001Bioconjug Chem 12(5):750-756)。

[0119] 在一个优选实施方案中,在哺乳动物细胞中产生抗体。用于表达克隆抗体或其抗原结合片段的优选哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dhfr-CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220,与DHFR选择性标记一起使用,例如,如Kaufman和Sharp,1982,Mol.Biol.159:601-621中所述)、淋巴细胞细胞系例如NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞、COS细胞、HEK293T细胞(J.Immunol.Methods(2004) 289(1-2):65-80)和来自转基因动物例如转基因哺乳动物的细胞。例如,细胞是乳腺上皮细胞。在一些实施方案中,在基于植物或无细胞的系统中产生血浆激肽释放酶结合抗体(参见例如,Galeffi,P.,等,2006J Transl Med 4:39)。

[0120] 除了编码多样化的免疫球蛋白结构域的核酸序列,重组表达载体还可携带另外的序列,比如调节宿主细胞中载体复制的序列(例如,复制起点)和选择性标记基因。选择性标记基因有助于选择其中已经引入载体的宿主细胞(见例如,美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,通常选择性标记基因赋予已经引入载体的宿主细胞对药物,比如G418、潮霉素或氨甲喋呤的抗性。优选的选择性标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于通过氨甲喋呤选择/扩增的dhfr⁻宿主细胞中)和neo基因(用于G418选择)。

[0121] 在用于抗体或其抗原结合部分的重组表达的示例性系统中,编码抗体重链和抗体轻链二者的重组表达载体通过磷酸钙介导的转染被引入dhfr⁻CHO细胞中。在重组表达载体内,抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至增强子/启动子调节元件(例如,源自SV40、

CMV、腺病毒等,比如CMV增强子/AdMLP启动子调节元件或SV40增强子/AdMLP启动子调节元件),以驱动基因的高水平的转录。重组表达载体也携带DHFR基因,其允许选择已经使用氨甲喋呤选择/扩增用载体转染的CHO细胞。培养选择的转化体宿主细胞,以允许抗体重链和轻链的表达并且从培养基回收完整的抗体。使用标准分子生物学技术制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化子、培养宿主细胞和从培养基回收抗体。例如,可通过亲和层析用蛋白A或蛋白G偶联基质分离一些抗体。

[0122] 对于包含Fc结构域的抗体,抗体生产系统可产生其中Fc区域被糖基化的抗体。例如,IgG分子的Fc结构域在CH2结构域中的天冬酰胺297处被糖基化。该天冬酰胺是用于经双触角型寡糖进行修饰的位点。已经表明该糖基化对于由Fcγ受体和补体C1q介导的效应子功能是必要的(Burton和Woof,1992,Adv.Immunol.51:1-84;Jefferis等,1998,Immunol.Rev.163:59-76)。在一个实施方案中,在使对应于天冬酰胺297的残基适当糖基化的哺乳动物表达系统中产生Fc结构域。Fc结构域可也包括其它真核翻译后修饰。

[0123] 抗体可也通过转基因动物产生。例如,美国专利号5,849,992描述了在转基因哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建转基因,其包括乳汁特异性(milk-specific)启动子和编码感兴趣的抗体的核酸以及用于分泌的信号序列。由这样的转基因哺乳动物的雌性产生的乳汁包括其中分泌的感兴趣的抗体。可从乳汁纯化抗体,或者,对于一些应用,可以直接使用。

[0124] 药物组合物

[0125] 本文所述的抗体(例如DX-2930)可以存在于组合物,例如药学上可接受的组合物或药物组合物中。本文所述的抗体(例如,DX-2930)可与药学上可接受的载体一起配制。在一些实施方案中,30mg-400mg DX-2930抗体存在于任选地具有药学上可接受的载体的组合物,例如药学上可接受的组合物或药物组合物中。在一些实施方案中,30mg、100mg、150mg、300mg或400mg DX-2930抗体存在于任选地具有药学上可接受的载体的组合物,例如药学上可接受的组合物或药物组合物中。

[0126] 药学上可接受的载体包括任何和所有生理学上相容的的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。优选地,载体适合于皮下、静脉内、肌肉、肠胃外、脊髓或表皮施用(例如通过注射或输注),但是也考虑适用于吸入和鼻内施用的载体。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是磷酸钠、柠檬酸、组氨酸、氯化钠和吐温80中的一种或多种。在一些实施方案中,药学上可接受的载体是磷酸钠、柠檬酸、组氨酸、氯化钠和吐温80。在一些实施方案中,将抗体如DX-2930配制在30mM磷酸钠、8.6mM柠檬酸、50mM组氨酸、90mM氯化钠、0.01%吐温80,pH 6.0中。在一些实施方案中,组合物包含每1ml的30mM磷酸钠、8.6mM柠檬酸、50mM组氨酸、90mM氯化钠、0.01%吐温80的溶液100mg DX-2930或组合物由每1ml的30mM磷酸钠、8.6mM柠檬酸、50mM组氨酸、90mM氯化钠、0.01%吐温80的溶液100mg DX-2930组成。

[0127] 药学上可接受的盐是保持化合物的期望的生物活性并且不赋予任何非期望的毒理效应的盐(见例如,Berge,S.M.,等,1977,J.Pharm.Sci.66:1-19)。这类盐的例子包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括源自非毒性无机酸,比如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸等的那些盐,以及源自非毒性有机酸,比如脂肪族单羧酸和二羧酸、苯基取代的链烷酸、羟基链烷酸、芳族酸、脂肪族和芳族磺酸等的那些盐。碱加成盐包括源自碱土

金属,比如钠、钾、镁、钙等的那些盐,以及源自非毒性有机胺,比如N,N'-二苄乙烯二胺、N-甲基葡萄糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、1,2-乙二胺、普鲁卡因等的那些。

[0128] 组合物可为各种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,比如液体溶液(例如,可注射的溶液和可输注的溶液)、分散体或悬液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。形式可取决于施用的期望模式和治疗性应用。许多组合物为可注射的溶液或可输注的溶液的形式,比如与用于为人施用抗体的组合物类似的组合物。施用的示例性模式是肠胃外(例如,静脉内、皮下、腹膜内、肌肉内)。在一个实施方案中,通过静脉内输注或注射而施用血浆激肽释放酶结合蛋白。在另一优选的实施方案中,通过肌肉内或皮下注射来施用血浆激肽释放酶结合蛋白。在另一优选的实施方案中,通过腹膜内注射来施用血浆激肽释放酶结合蛋白。

[0129] 如本文使用的短语“肠胃外施用(parenteral administration)”和“经肠胃外施用的(administered parenterally)”意思是肠和局部施用之外的施用模式,通常通过注射,并且包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眼眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内注射和输注。

[0130] 组合物可配制为溶液、微乳液、分散体、脂质体或适于高药物浓度的其它有序结构。可通过将在合适溶剂中的需要的量的结合蛋白质在需要时与上述列举的一种成分或成分的组合合并,随后过滤消毒,制备无菌可注射的溶液。一般而言,通过将活性化合物并入包含基本分散媒介和上面列举的其它必要的成分的无菌媒介物中来制备分散体。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备的优选的方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加上来自其先前无菌-过滤溶液的任何另外期望的成分的粉末。例如,通过使用比如卵磷脂的包衣、通过在分散体的情况下保持所需的颗粒大小和通过使用表面活性剂,可保持溶液适当的流动性。可通过在组合物中包括延迟吸收的试剂,例如,单硬脂酸盐和明胶,使得可注射的组合物吸收延长。

[0131] 本文所述的抗体(例如DX-2930)可以通过各种方法施用,包括静脉内注射或输注。例如,对于一些治疗应用,抗体可以以小于30、20、10、5或1mg/min的速率通过静脉内输注被施用,以达到约1至100mg/m²或7至25mg/m²的剂量。施用途径和/或方式将根据期望结果而变化。在某些实施方案中,可用使保护化合物避免快速释放的载体制备活性化合物,比如控制释放制剂,包括植入物和微胶囊化的递送系统。可使用生物可降解的、生物相容的聚合物,比如乙烯乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备这种制剂的许多方法是可用的。参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson编辑,1978,Marcel Dekker,Inc.,New York。

[0132] 药物组合物可以使用医疗装置施用。例如,在一个实施方案中,本文公开的药物组合物可使用诸如无针皮下注射装置、泵或植入物的装置施用。

[0133] 在某些实施方案中,本文所述的抗体(例如DX-2930)可被配制以确保在体内适当的分布。例如,血脑屏障(BBB)排除了许多高亲水化合物。为了确保本文公开的治疗性化合物跨越BBB(如果需要的话),它们可以以脂质体被配制。对于制造脂质体的方法,参见例如美国专利号4,522,811;5,374,548和5,399,331。脂质体可包含被选择性运输至特定细胞或器官的一个或多个部分,因此增强了靶向药物递送(参见例如V.V.Ranade,1989, J.Clin.Pharmacol.29:685)。

[0134] 调整剂量方案,以提供最佳期望的应答(例如,治疗性应答)。例如,可施用单个丸

剂,随着时间的推移可施用若干分割的剂量或可根据治疗性条件的紧急情况的指示按比例减小或增加剂量。尤其有利地,以剂量单位形式配制肠胃外组合物,以易于剂量的施用和均匀性。如本文使用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗受试者的单一剂量的物理上分开的单位;每个单位包含计算为结合必要的药学载体产生期望的疗效的预定量的活性化合物。剂量单位形式的规格可由下述各项规定并且直接取决于下述各项:(a) 活性化合物的独特的特征和待实现的具体疗效,和(b) 在复合这类用于治疗个体敏感性的活性化合物的领域中固有的限制。

[0135] 治疗或预防有效量的本文所述的抗体(例如DX-2930)的示例性非限制性范围为30mg至400mg,或介于例如100-400mg、100-300mg或300-400mg之间的任何整数。在一些实施方案中,治疗或预防有效量为30mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg或400mg。

[0136] 在一些实施方案中,本文所述的抗体(例如DX-2930)的治疗或预防有效量为30mg、100mg、150mg、300mg或400mg。在一些实施方案中,治疗或预防有效量为150mg。在一些实施方案中,治疗或预防有效量为300mg。在一些实施方案中,治疗或预防有效量为400mg。

[0137] 在一些实施方案中,治疗或预防有效量被施用至少两次、至少三次、至少四次、至少五次、至少六次、至少七次、至少八次、至少九次、至少十次或以上。在一些实施方案中,治疗或预防有效量每隔一周(即每两周)被施用。在一些实施方案中,治疗或预防有效量为300mg或400mg,并且每两周施用所述量。在一些实施方案中,治疗或预防有效量为300mg,并且每两周施用所述量的抗体。在一些实施方案中,治疗或预防有效量为400mg,并且每两周施用所述量的抗体。

[0138] 在一些实施方案中,任何抗pKa1抗体如DX-2930的治疗涉及至少包括加载期和维持期的治疗方案。在一些实施方案中,对于加载期,抗体的治疗或预防有效量为每次施用100至300mg(例如,150mg或300mg)。在此期间,抗体可以被每周施用(例如每周被施用,长达一周、两周或三周)。在一个实施例,加载期为2周,抗体在第0天、第7天和第14天被施用。

[0139] 可替代地或另外,对于维持期,治疗或预防有效量为每次施用约100至300mg(例如,150mg或300mg)。在此期间,抗体可以每隔一周(即每两周)、每三周或每四周被施用(例如,每两周被施用,长达十周,结果是共递送5剂量)。在一个实施例,维持期可长达10周并且抗体在第28天、第42天、第56天、第70天和第84天被施用。

[0140] 在一些实施方案中,抗-pKa1抗体如DX-2930以150mg或300mg被施用,并且所述量首先每周被施用,达一段适当的时间(例如,每周被施用,长达一周、两周或三周),随后每两到四周(例如每两周、每三周或每四周)被施用,达一段适当的时间。

[0141] 在本文所述的任何方法中,治疗方案可以进一步包括维持期后的随访期。在随访期中,抗体如DX-2930可以以100-300mg,例如300mg每2-4周被施用。在一些情况下,在加载期,维持期和随访期的一个或多个中,剂量可增加至400mg。

[0142] 本文公开的药物组合物可包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本文所述的抗体(例如DX-2930)。

[0143] 试剂盒

[0144] 本文所述的抗体(例如DX-2930)可以在试剂盒中提供,例如作为试剂盒的组分。例如,试剂盒包括(a) DX-2930抗体,例如包含抗体的组合物(例如,药物组合物),和任选的(b) 信息材料。该信息材料可以是涉及本文所述的方法和/或本文所述的抗体(例如,DX-2930)

的用途(例如,用于本文所述的方法)的描述性、指导性、市场营销或其它材料。在一些实施方案中,试剂盒包含一个或多个剂量的DX-2930。在一些实施方案中,一个或多个剂量为30mg、100mg、150mg、300mg或400mg。

[0145] 不限制试剂盒的信息材料的形式。在一个实施方案中,信息材料可包括有关化合物产生、化合物的分子量、浓度、过期日期、批次或生产地点信息等的信息。在一个实施方案中,信息材料涉及使用抗体治疗、预防或诊断疾病和病况,例如,血浆激肽释放酶相关的疾病或病况。

[0146] 在一个实施方案中,信息材料可包括以适于执行本文所述的方法的方式施用本文所述的抗体(例如DX-2930),所述方式例如,以适当的剂量、给药形式、施用模式或给药方案(例如,本文所述的剂量、剂型、给药方案或施用模式)。在另一实施方案中,信息材料可包括将本文所述的抗体(例如DX-2930)施用至适当的受试者,例如人(例如,患有或处在血浆激肽释放酶相关疾病或病况风险中人),的说明。例如,材料可包括将本文所述的抗体(例如DX-2930)施用至患本文所述的病症或病况(例如,血浆激肽释放酶相关的疾病)的患者的说明,例如,根据本文所述的给药方案。不限制试剂盒的信息材料的形式。在许多情况下,信息材料,例如,以印刷形式提供说明,但是也可以是其它形式,比如计算机可读的材料。

[0147] 本文所述的抗体(例如DX-2930)可以以任何形式提供,例如液体、干燥或冻干形式。优选抗体基本上是纯的和/或无菌的。当在液体溶液中提供抗体时,液体溶液优选为水溶液,优选无菌水溶液。当以干燥的形式提供抗体时,通常通过加入合适的溶剂进行重构。可任选地在试剂盒中提供溶剂,例如无菌水或缓冲液。

[0148] 试剂盒可包括用于包含本文所述的抗体(例如DX-2930)的组合物的一个或多个容器。在一些实施方案中,试剂盒包含用于组合物的分开的容器、分隔器或隔间以及信息材料。例如,组合物可包含在瓶子、小瓶或注射器中,并且信息材料可结合容器被包括在内。在其它实施方案中,试剂盒的分开要素包含在单个未分隔的容器中。例如,组合物包含在以标签形式附着信息材料的瓶子、小瓶或注射器中。在一些实施方案中,试剂盒包括多个(例如,一包)单个容器,每个包含本文所述的抗体(例如DX-2930)的一个或多个单位剂量形式(例如,本文所述的剂型)。例如,试剂盒包括多个注射器、安瓿、箔包装或薄膜包装,每个包含单个单位剂量的本文所述的抗体(例如DX-2930)。试剂盒的容器可以是气密的、防水的(例如,对于水分或蒸发的改变不可渗透)和/或避光的。

[0149] 试剂盒任选地包括适于施用组合物的装置,例如,注射器或任何这类递送装置。在一个实施方案中,装置是可植入装置,其分配计量剂量的抗体。本公开的特征也在于例如通过结合本文所述的组分提供试剂盒的方法。

[0150] 治疗

[0151] 在一些方面,本公开提供了本文所述的抗体(例如DX-2930)在治疗HAE中的用途。

[0152] 遗传性血管性水肿

[0153] 遗传性血管性水肿(HAE)也称为“Quincke水肿”、C1酯酶抑制剂缺陷、C1抑制剂缺陷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。

[0154] 气管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。

[0155] 创伤或紧张,例如,牙科手术、疾病(例如,病毒性疾病比如感冒和流感)、月经和外科手术可触发血管性水肿的发作。为了防止HAE的急性发作,患者可尝试避免先前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。

[0156] 有三种类型的HAE,称为I型、II型和III型,所有这些都可以通过本文所述的方法进行治疗。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。患有I型或II型HAE的患者通常缺乏C1-INH。这类患者具有缺陷的C1-INH基因,因此不产生C1-INH,或产生非典型的C1-INH蛋白。III型是最新描述的形式,最初被认为只发生在女性身上,但已确定有受影响男性的家族。III型HAE被认为与C1-INH无关。患有III型HAE的患者可具有正常的C1-INH蛋白。

[0157] 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。

[0158] SERPING1基因的突变造成I型和II型遗传性血管性水肿。SERPING1基因提供了制备对于控制炎症重要的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。

[0159] F12基因中的突变与一些III型遗传性血管性水肿病例相关。F12基因提供了制备凝固因子XII的指导。除了在血液凝结(凝聚)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。

[0160] 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。

[0161] C1抑制剂疗法以及用于HAE的其它疗法描述在Kaplan,A.P.,J Allergy Clin Immunol,2010,126(5):918-925中。

[0162] 提供HAE发作的应急治疗,以尽可能快速停止水肿的发展。来自供体血液的静脉内施用的C1抑制剂浓缩物是一种应急治疗;但是,该治疗在许多国家中不可用。在C1抑制剂浓缩物不可用的紧急情况下,新鲜冷冻的血浆(FFP)可用作替代物,因为其也包含C1抑制剂。

[0163] 自从1979年源自人血液的纯化的C1抑制剂已经在欧洲使用。若干C1抑制剂治疗现可在美国使用并且两种C1抑制剂产品现可在加拿大使用。巴氏消毒的Berinert P (CSL Behring) 于2009年被F.D.A.批准用于急性发作。纳米过滤的Cinryze (ViroPharma) 于2008年被F.D.A.批准用于预防。Rhucin (Pharming) 是处在开发阶段的重组C1抑制剂,其不具有由于人血源性病原体而造成的传染病传染的风险。

[0164] 急性HAE发作的治疗也可包括用于疼痛缓解的药物和/或IV流体。

[0165] 其它治疗形式可刺激C1抑制剂的合成,或降低C1抑制剂消耗。雄激素药物,比如达那唑(danazol),可通过刺激C1抑制剂的产生而降低发作的频率和严重程度。

[0166] 幽门螺旋杆菌(*Helicobacter pylori*)可触发腹部发作。治疗幽门螺杆菌的抗生素将减少腹部发作。

[0167] 较新的治疗攻击接触级联。艾卡拉肽(Ecallantide) (**KALBITOR®**, DX-88, Dyax) 抑制血浆激肽释放酶并且已经在美国被批准。艾替班特(Icatibant) (**FIRAZYR®**, Shire) 抑制缓激肽B2受体,并且已经在欧洲和美国被批准。

[0168] HAE的诊断可依赖于,例如,家族历史和/或血液测试。与I、II和III型HAE相关的实验室发现描述在,例如,Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126 (5) :918-925中。在I型HAE中,如C4的水平, C1抑制剂的水平下降,而C1q水平是正常的。在II型HAE中, C1抑制剂的水平是正常的或增加;但是, C1抑制剂功能异常。C4水平下降和C1q水平是正常的。在III型中, C1抑制剂、C4和C1q的水平都可是正常的。

[0169] 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。

[0170] 用抗PKa1抗体治疗HAE

[0171] 本公开提供了例如根据本文所述的给药方案通过向患有或怀疑患有HAE的受试者施用本文所述的抗体(例如,治疗有效量的本文所述的抗体)治疗(例如,减轻、稳定或消除一个或多个症状)遗传性血管性水肿(HAE)的方法。另外提供了通过例如,根据本文所述的给药方案或结合第二疗法(例如,本文所述的一种其它试剂)施用本文所述的抗体(例如,治疗有效量的本文所述的抗体)治疗HAE的方法。本公开也提供了通过向处于发展HAE风险的受试者(例如,具有患HAE的家族成员的受试者或对于HAE具有遗传倾向的受试者),例如,根据本文所述的给药方案,施用本文所述的抗体(例如,本文所述的预防有效量的抗体)来预防HAE或其症状的方法。在一些例子中,受试者可以是在治疗时没有HAE症状的人患者。

[0172] 治疗包括施用有效缓解、缓和、改变、修复、减轻、改善或影响病症、病症的症状或对病症倾向的量。治疗也可延缓发病,例如预防发病,或预防疾病或病况的恶化。

[0173] 施用DX-2930抗体的方法也描述在“药物组合物”中。所用抗体的合适剂量可取决于受试者的年龄和体重以及使用的具体药物。抗体可以用作竞争剂以抑制、减少不期望的相互作用,例如在血浆激肽释放酶和其底物(例如因子XII或HMWK)之间的相互作用。抗体的剂量可以是足以阻断患者血浆激肽释放酶活性的90%、95%、99%或99.9%的量,尤其是在

疾病部位。这可能需要例如每两周施用的30mg、100mg、300mg或400mg。

[0174] 在一个实施方案中,抗体用于抑制例如体内血浆激肽释放酶的活性(例如,抑制血浆激肽释放酶的至少一种活性,例如减少因子XIIa和/或缓激肽产生)。结合蛋白可独自或与试剂例如细胞毒性药物、细胞毒性酶或放射性同位素缀合使用。

[0175] 经天然补体依赖性细胞毒性(CDC)或抗体依赖性细胞毒性(ADCC),抗体可直接体内用于消除表达抗原的细胞。本文所述的抗体可包括补体结合效应子结构域,比如来自IgG1、IgG2或IgG3的Fc部分或结合补体的IgM相应部分。在一个实施方案中,用本文所述的抗体和适当的效应细胞离体处理靶细胞的群体。可通过添加补体或包含补体的血清补充治疗。此外,可通过补体蛋白质的结合来改善包被本文所述的抗体的靶细胞的吞噬。在另一实施方案中,靶标,包被有包括补体结合效应子结构域的抗体的细胞,通过补体被裂解。

[0176] 施用DX-2930抗体的方法描述于“药物组合物”中。所用分子的合适剂量将取决于受试者的年龄和体重以及所使用的具体药物。抗体可以用作竞争剂以抑制或减少不期望的相互作用,例如在天然试剂或病理学试剂与血浆激肽释放酶之间的相互作用。

[0177] 治疗有效量的本文所述的抗体可被施用于患有HAE、怀疑患有HAE或具有HAE风险的受试者,从而治疗(例如,减轻或改善病症的症状或特征、减缓、稳定和/或停止疾病进展)病症。

[0178] 本文所述的抗体可以以治疗有效量施用。抗体的治疗有效量是在单个或多个剂量施用至受试者后有效治疗受试者(例如治愈、缓解、减轻或改善受试者病症的至少一种症状)以达到超过在没有这种治疗的情况下预期的程度的量

[0179] 在对受试者施用单次剂量或多次剂量时治疗受试者的有效量,例如,治愈、缓解、减轻或改善受试者中的病症的至少一种症状超出在没有这种治疗的预期程度。

[0180] 可调整剂量方案,以提供最佳的期望应答(例如,治疗性应答)。例如,可施用单个丸剂,随着时间的推移可施用若干分割的剂量或可根据治疗性条件的紧急情况的指示按比例减小或增加剂量。尤其有利地,以剂量单位形式配制肠胃外组合物,以易于剂量的施用和均匀性。如本文使用的剂量单位形式指适合作为用于待治疗受试者的单一剂量的物理上分开的单位;每个单位包含计算为结合必要的药学载体产生期望的疗效的预定量的活性化合物。

[0181] 在一些实施方案中,DX-2930抗体通过多剂量被施用,例如每2周一次、每3周一次、每4周一次、每6周一次、每8周一次或更低频率。多剂量中的每一个可以是30mg、100mg、150mg、300mg、350mg或400mg。在某些情况下,可以每2周一次给予患者多剂量,达一段适当时间的。在一些实施方案中,DX-2930可以以300mg或400mg每两周被施用。在其它实施方案中,DX-2930可以以300mg或400mg每四周被施用。在其它实施方案中,DX-2930可以以150mg每四周被施用。在本文所述的任何方法中,通过本文所述的多剂量的DX-2930治疗的受试者可以随后进行维持治疗。

[0182] 在本文所述的任何方法中,受试者可以在加载期通过用于多剂量的DX-2930治疗,然后进行维持期治疗。在加载期中,受试者可以用约100mg至约400mg(例如100-300mg或150-300mg,例如100mg、150mg、200mg、300mg或400mg)的DX-2930治疗,每2-4周(例如,每2周、每3周或每4周)一次,达一段适当的时间。在加载期中,受试者可以用约100mg至约300mg(例如100-300mg或150-300mg,例如100mg、150mg、200mg或300mg)的DX-2930治疗,每2-4周

(例如,每2周、每3周或每4周)一次,达一段适当的时间。

[0183] 在一些实施方案中,在治疗之前或之后或治疗疗程期间,可监测患者经由抗体引起的副作用(例如,肌酸磷酸酶水平的升高)和/或pKa1的抑制水平(例如,抗体的血清或血浆浓度或pKa1活性水平)。如果观察到副作用,可减少抗体的剂量或可能终止治疗。如果抑制水平低于最小治疗性水平,则可向患者施用另外的抗体的剂量。

[0184] 在一些实施方案中,可在治疗疗程期间(例如,初始剂量之后)测量抗体(例如,DX-2930)的血浆或血清浓度,用于评估治疗的效力。如果抗体的血浆或血清浓度小于约80nM,可能需要随访剂量(follow-up dosage),其可以与初始剂量相同或大于初始剂量。可通过测定获得自受试者的血浆或血清样品中抗体的蛋白质水平,例如,通过免疫测定或MS测定,测量抗体的血浆或血清浓度。也可通过测定在获得自用抗体治疗的受试者的血浆或血清样品中pKa1的抑制水平,测量抗体的血浆或血清浓度。这类测定可包括合成底物测定或蛋白质印记测定,用于测量如本文所描述的切割激肽原。

[0185] 可替代地或另外,可在治疗疗程期间监测肌酸激酶的血浆或血清水平。如果发现肌酸激酶的血浆或血清水平在治疗期间升高,则可降低抗体的剂量或可终止治疗。

[0186] 可以在治疗过程中监测肌酸激酶的血浆或血清水平。如果在治疗过程中发现肌酸激酶的血浆或血清水平升高,则可降低抗体的剂量或可终止治疗。

[0187] 在一些实施方案中,可以如下测定抗体(例如,DX-2930)的最佳剂量(例如,最佳预防剂量或最佳治疗剂量)。以初始剂量将抗体给予需要进行治疗的受试者。测量受试者中抗体的血浆浓度。如果血浆浓度低于80nM,则在随后的施用中增加抗体的剂量。可以选择维持抗体血浆浓度高于约80nM的抗体的剂量作为受试者的最佳剂量。可以在治疗过程中监测受试者的肌酸磷酸酶水平,并且可以基于肌酸磷酸酶水平进一步调整该受试者的最佳剂量,例如,如果在治疗期间观察到肌酸磷酸酶升高,则可降低抗体的剂量。在一些实施方案中,施用抗体如DX-2930以将切割的激肽原的水平降低至与健康受试者相当的水平。

[0188] 在一些实施方案中,本文公开的任何抗体,例如DX-2930及其功能性变体,可用于预防HAE发作或降低具有HAE发作史的人患者的HAE发作率。在一些实施例中,人患者每年至少经历两次HAE发作,并且在治疗前6个月内任选地至少有一次发作。在其它实施例中,人患者在治疗前3个月内至少经历两次HAE发作。在其它其它实施例中,人患者在治疗前3个月内至少具有9次HAE发作,并且在治疗前12个月内任选地具有至少25次发作(例如36次发作)。

[0189] 联合疗法

[0190] 本文所述的抗体(例如,DX-2930)可以与用于治疗与血浆激肽释放酶活性相关的疾病或病况(例如本文所述的疾病或病况)的一种或多种其它疗法联合施用。例如,本文所述的抗体(例如,DX-2930)可以治疗性地或预防性地与手术、另一种抗血浆激肽释放酶Fab或IgG(例如本文所述的另一种Fab或IgG)、另一种血浆激肽释放酶抑制剂、肽抑制剂或小分子抑制剂一起使用。可与本文所述的血浆激肽释放酶结合抗体一起用于联合疗法血浆激肽释放酶抑制剂的实例包括例如WO 95/21601或WO 2003/103475中所述的血浆激肽释放酶抑制剂。

[0191] 一种或多种血浆激肽释放酶抑制剂可与本文所述的抗体(例如DX-2930)联合使用。例如,联合可导致需要较低剂量的抑制剂,使得副作用降低。

[0192] 本文所述的抗体(例如DX-2930)可与一种或多种目前用于治疗HAE的疗法联合施

用。例如,DX-2930抗体可以与第二抗HAE治疗剂,如艾卡拉肽、C1酯酶抑制剂(例如CINRYZE™)、抑肽酶(TRASYLOL®)和/或缓激肽B2受体抑制剂(例如,艾替班特(FIRAZYR®))共使用。

[0193] 术语“联合(combination)”指使用两种或更多种试剂或疗法治疗相同的患者,其中试剂或疗法的使用或用途在时间上重叠。试剂或疗法可同时施用(例如,作为施用至患者的单个制剂或作为同时施用的两个分开的制剂)或以任何顺序相继施用。相继施用是在不同时间给药的施用。施用一种试剂和另一试剂之间的时间可以是数分钟、数小时、数天或数周。本文所述的血浆激肽释放酶结合抗体的使用也可用于减少另一疗法的剂量,例如,以减少与施用的另一试剂相关的副作用。因此,联合可包括,以比在没有血浆激肽释放酶结合抗体的情况下使用的剂量低至少10、20、30或50%的剂量施用第二剂。

[0194] 联合治疗可包括施用减少其他疗法的副作用的试剂。试剂可以是减少血浆激肽释放酶相关的疾病治疗的副作用的试剂。

[0195] 不必进一步阐释,相信本领域技术人员基于上面的说明可充分使用本发明。所以,下述具体的实施方式仅仅解释为示意性的,并且决不以任何方式限制本公开的剩余部分。本文引用的所有出版物为了本文提及的目的或主题通过参考并入本文。

实施例

[0196] 实施例1:评估DX-2930在遗传性血管性水肿受试者中的安全性、耐受性和药代动力学的1b期双盲法多剂量递增研究

[0197] 进行1b期试验以评估在遗传性血管性水肿(HAE)受试者中不同剂量水平的多次皮下施用的DX-2930的安全性和耐受性。在研究中纳入的HAE患者包括根据以下所有标准有文件记录的诊断为HAE(I型或II型)的患者:与HAE一致的文件记录的临床病史(皮下或粘膜非瘙痒肿胀发作,不伴随荨麻疹)、C1抑制剂(C1-INH)抗原或功能性水平<正常水平的40%(如果受试者的抗原或功能性C1-INH水平为正常水平的40-50%并且他们的C4水平也低于正常范围且具有与I型或II型HAE一致的家族史,则该受试者被登记)、报告发生首次血管性水肿症状的年龄≤30岁或与I型或II型HAE一致的家族史,并且每年经历≥2次HAE发作,其中在由受试者报告的过去6个月内至少1次发作。登记的HAE患者以活性药物与安慰剂比例为2:1被随机化,并以30mg(n=4)、100mg(n=4)、300mg(n=5)和400mg(n=11)的剂量皮下施用DX-2930或安慰剂(n=13)两次剂量,该两次剂量间隔14天。400mg组中的一名患者仅接受一个剂量,然后不能接受第二剂量,其被替换。由于与研究无关的原因,替换患者也无法完成研究,导致总共10名患者完成400mg剂量并被纳入评估。除了在接受400mg剂量的组(其中可以获得数据直到第50天)中,在施用后的时间点收集血浆,直到第120天(15周)。分析包括安全性、药代动力学、药效学(生物标记)和功效。尽管在DX-2930组(67%)中存在的女性比安慰剂组(54%)中略高,仍根据年龄、人种、种族和BMI打包为药物组和安慰剂组。

[0198] DX-2930的药代动力学

[0199] 通过使用针对DX-2930的抗独特型抗体(M293-D02)的验证的免疫测定法在血浆中测量DX-2930药物水平。根据每个剂量组的平均血浆药物水平相对于DX-2930施用后的天数的图,明显的是,药物水平是剂量依赖性的,并且表现出延长的半衰期,这对于人单克隆抗体是典型的。关键的药代动力学观察结果总结在表2和图1中。首先,C_{max}药物水平随着剂量

的增加而增加,如预期的那样。此外,第二剂量后的 $T_{\max}$ 约为20天,半衰期约为14天。这些参数与在健康志愿者的1a期研究中获得的值一致,并且支持每月一次或两次给药。

[0200] 表2药代动力学观察

[0201]

剂量	$C_{\max}$ (ng/ml)	$T_{\max}$ (天数)	$t^{1/2}$ (天数)
30mg	3895.0 (2159.8)	17.9 (1.1)	14.2 (0.8)
100mg	7890.0 (2058.4)	18.0 (0.5)	14.6 (3.4)
300mg	27460.0 (14542.5)	18.2 (1.5)	13.8 (3.3)
400mg	45322.2 (8704.6)	17.7 (1.0)	15.0 (2.4)

[0202] 所给出的值是评估的患者的平均值,其中括号中的是标准偏差

[0203] DX-2930的药效学活性:荧光活性测定

[0204] 使用两种不同的生物标志物测定来研究DX-2930在HAE患者血浆中的药效学(PD)活性。第一PD测定被称为荧光活性测定,它提供DX-2930在枸橼酸钠血浆中生物活性的测量,所述枸橼酸钠血浆在用于确定DX-2930的药代动力学性质的剂量后的相同时间点从治疗的患者获得。该测定测量了在激活接触途径之后在稀释血浆中产生的活性血浆激肽释放酶的量。具体来说,稀释的血浆掺有促进接触途径的酶促级联的活性因子XIIa (FXIIa),2分钟后,加入FXIIa抑制剂玉米胰蛋白酶抑制剂以停止反应,并且通过其水解前荧光(pro-fluorescent)合成肽底物的能力来测量样品中存在的活性血浆激肽释放酶的量。在治疗的健康志愿者(1a期研究)或HAE患者(1b期研究)的血浆中存在的增加水平的DX-2930与观察到的血浆激肽释放酶酶促率(enzymatic rate)的剂量依赖性降低相关(图2)。相对于每个患者的剂量前样品中的血浆激肽释放酶活性的量计算在每个时间点观察到的抑制百分比。在图2中观察到的生物活性与图1中DX-2930的药代动力学性质良好相关。在给药后,在300和400mg剂量中观察到显著的抑制。在100mg剂量中观察到中等抑制,在30mg剂量中显然没有明显的抑制。

[0205] DX-2930的药效学活性:蛋白印迹测定

[0206] HAE患者缺乏C1抑制剂,其是血浆激肽释放酶的一种内源性抑制剂。结果,这些患者具有升高的活性血浆激肽释放酶,其将其1-链高分子量激肽原底物转化为2-链和缓激肽,而缓激肽是HAE中的疼痛和水肿的关键介质。DX-2930是一种非常高效的活性血浆激肽释放酶抑制剂,其阻断2-链和缓激肽的产生。

[0207] 开发了蛋白印迹测定法来测量不同血浆抗凝血剂和治疗条件下血浆中1-链和2-链高分子量激肽原的相对量。图3显示在蛋白酶抑制剂存在下收集的HAE患者血浆(SCAT169血浆)中观察到的2-链%。SCAT169血浆的存在阻止了在血液收集和对血浆处理过程中可发生的接触系统的激活和随后的2-链产生。因此,该2-链的水平预期与1b期试验的HAE患者(27%)和健康志愿者(12%)中的2-链的内源性水平密切匹配。DX-2930治疗的HAE患者显示较低的2-链水平,如在给药后8或22天收集的样品中所测量的。

[0208] 在图4中,在1b期试验中从HAE患者获得的剂量前枸橼酸钠血浆含有约52%的2-链。相比之下,在1a期研究中从健康志愿者获得的枸橼酸钠血浆样品含有约8%的2-链。还研究了在第8天和第22天收集的1b期受试者血浆中平均2-链水平,并显示在图4中。相对于剂量前水平,在300和400mg剂量组中2-链水平的统计学显著降低证明了DX-2930的药效学

活性。

[0209] 图5显示来自被给与DX-2930的HAE患者的枸橼酸钠血浆在凝血因子XIIa (FXIIa) 的离体激活后显示较少的2-链。300和400mg剂量组将2-链的量降低到低于在健康志愿者中观察到的水平。这种离体激活可以被看作是严重HAE发作的体外模型。

[0210] 这两种PD生物标志物测定均支持会达到在300和400mg剂量组获得的药物水平的剂量选择。

[0211] 安全性

[0212] 不良事件的总结如下表3所示。在治疗意外不良事件 (TEAE) 中没有失衡, 表明DX-2930的安全问题。大多数常见的AE是HAE发作、注射部位疼痛和头痛。有3例严重的TEAE (注射部位疼痛持续1分钟、恶化头痛持续1分钟和夜间盗汗)。对于临床实验室异常或基线、生命体征或身体检查的变化或心电图 (ECG) 异常或变化, 没有鉴定到安全信号。这些结果表明DX-2930在高达400mg的剂量, 在HAE患者中似乎是良好耐受的。

[0213] 表3治疗不良事件的总结

[0214]

	DX-2930 30 mg (N = 4)	DX-2930 100 mg (N = 4)	DX-2930 300 mg (N = 5)	DX-2930 400 mg (N = 11)	所有 DX-2930 治疗的 (N = 24)	安慰剂 (N = 13)
TEAE*	1	3	2	8	14 (58%)	10 (77%)
死亡或受试者中止	0	0	0	0	0	0
严重的不良事件	0	0	0	0	0	1 (8%)
严重的TEAEs	1	0	2	2	5 (21%)	5 (39%)
相关的TEAEs**	1	2	0	4	7 (29%)	5 (39%)

[0215] *TEAE: 治疗意外不良事件。如果发病时间是在施用研究药物直到第120天剂量后最终随访后, 或者在发病时间先于研究药物施用, 在120天剂量后随访期内AE的严重性增加的情况下, 则AE是治疗意外。**治疗相关的AE: AE与研究药物的相关性由不知情的研究者评估。

[0216] 免疫原性

[0217] 5例患者为抗药物抗体阳性 (5例中2例有间歇性、波动结果)。然而, 没有阳性样品中和, 没有超敏反应的临床证据, 并且对药代动力学或生物标志物没有明显的影响。

[0218] 功效评估

[0219] 进行了前瞻性主要功效分析 (prospective primary efficacy analysis), 其专注于与安慰剂相比, 单独的和组合的300和400mg剂量的DX-2930。

[0220] 使用六周主要评估期 (第8天至第50天) (图6A和6B), 因为从1a期的PK建模显示出

在该时间间隔期间显著的药物暴露。主要分析集中在过去3个月内具有至少2次发作的最低基线历史的受试者。大多数受试者在过去3个月中达到了至少2次发作的最低要求的基线历史。在13例安慰剂受试者中,11例满足这一要求。在用300或400mg DX-2930治疗的16例受试者中,15例满足这一要求。在安慰剂、300mg和400mg组中的基线HAE发作率分别为每周0.39、0.33和0.55次发作。在组合的300和400mg组中的基线率为每周0.49次发作。

[0221] 主要方法是意向治疗(ITT)分析。使用重复测量的模型,其中方差分析(ANOVA)采用基线发作率作为协变量。读数被表示为与安慰剂发作率相比通过DX-2930导致的HAE发作降低的百分比,并计算p值。

[0222] 功效评估的结果显示在表4和表5以及图7中,它们都显示与安慰剂相比,通过单独和组合的300和400mg剂量的DX-2930,HAE发作率降低。尤其地,在研究期间内,用300或400mg治疗的15例DX-2930受试者中的13例是无发作的,而对于安慰剂组,11例受试者中只有3例是无发作的。

[0223] 表4从第8天至第50天HAE发作率的降低

[0224]

	DX-2930 300 mg (N = 4)	DX-2930 400 mg (N = 11)	DX-2930 组合的 300和400 mg (N = 15)
相对于安慰剂的降低%	100	88	91
相对于安慰剂的P值*	<0.0001	0.005	0.0012

[0225] 注:仅包括在过去3个月内具有至少2次发作的基线发作率的受试者。

[0226] *具有方差分析(基线发作频率作为协变量)并假定泊松分布的混合模型重复测量。

[0227] 表5无发作的受试者的比例

[0228]

	DX-2930 300 mg (N = 4)	DX-2930 400 mg (N = 11)	DX-2930 组合的 300和400 mg (N = 15)	安慰剂 (N = 11)
无发作的受试者 (第8至50天)	4/4 (100%) p = 0.026	9/11 (82%) p = 0.030	13/15 (87%) p = 0.004	3/11 (27%)

[0229] 在安慰剂受试者中,在主要功效评估期间共有24次发作。在这24次发作中,主要发作部位为其中的13次腹部发作和1次喉部发作。10次发作是严重的,6次是中度的。在24次发作中,22次接受了发作的急性治疗。

[0230] 在用300或400mg DX-2930治疗的受试者中,用400mg治疗的一例受试者具有单次HAE发作。这种发作是外周的(peripheral)、轻度的、持续了8小时,且不需要任何急性治疗。

经历发作的其它400mg DX-2930治疗的受试者具有两次外周发作。一次发作中度,另一次严重;两次发作都用急性疗法治疗。HAE发作特征的总结如表6所示。

[0231] 表6 HAE发作的特征 (第8至50天)

[0232]

	DX-2930 300 mg (N = 4)	DX-2930 400 mg (N = 11)	安慰剂 (N = 11)
发作	0	3	24
主要发作部位			
外围	0	3	10
腹部	0	0	13
喉部	0	0	1
发作严重程度			
轻度	0	1	8
中度	0	1	6
严重	0	1	10
需要治疗的急性发作	0	2	22

[0233] 接下来,进行了改良的意向治疗(mITT)事后分析(post-hoc analysis)。除了2例受试者被排除(1例不接受2次施用的受试者和1例不具有1型或2型HAE的受试者)外,ITT群体被使用。改良的分析的结果如表7所示。在该改良的意向治疗分析中,与安慰剂相比,从第8天至第50天,300mg DX-2930组的发作降低了100%,其中p值小于0.0001。400mg DX-2930组的发作降低了95%,其中p值为0.0022。组合的300和400mg DX-2930组的HAE发作降低了97%,其中p值为0.0007。

[0234] 表7主要功效分析(第8至50天)(改良的意向治疗分析)

[0235]

	DX-2930 300 mg (N = 4)	DX-2930 400 mg (N = 9)	DX-2930 组合的 300和400 mg (N = 13)
相对于安慰剂的降低%	100	95	97
相对于安慰剂的P值*	<0.0001	0.0022	0.0007

[0236] 注:仅包括在过去3个月内具有至少2次发作的基线发作率的受试者。MITT群体不

包括2例受试者,一例受试者没有I或II型HAE,另一例受试者仅接受一次DX-2930施用。

[0237] *具有方差分析(基线发作频率作为协变量)并假定泊松分布的混合模型重复测量。

[0238] 还评估了随着时间的推移与药物暴露有关的HAE发作的发生率。不希望受理论束缚,假设是较高的药物水平应与HAE发作的预防相关,其意味着(a)在给药前以及给药后几天内,应该观察到发作,(b)随着药物水平的积累,发作应该变得稀少甚至不存在,和(c)随着药物水平的下降,发作应该重新出现。评估结果如图8-13所示。

[0239] 在安慰剂组中,发作的高发生率是明显的(图8)。这些事件遍及整个研究期间分布,没有任何特定的模式。

[0240] 在30和100mg DX-2930组中,从第8天到第50天没有发生发作(图9和10)。然而,这些组的基线发作率相对较低,并且30mg组的药效学效果与安慰剂组的相比没有显著差异。在300mg DX-2930组中,在给药前发生发作。随着药物水平的上升,受试者变得无发作,并且随着药物水平的下降,发作重新出现(图11)。在400mg DX-2930组中也观察到类似的模式(图12)。在显著的药物暴露期间,尤其是在第8至第50天的时间间隔内,发作发生率大幅度下降。这个时期被发生在药物积累之前或随着药物水平衰退的较低药物暴露时的发作所排除(bracketed)。这些结果表明,DX-2930药物暴露与HAE发作的预防之间存在明显的相关关系。

[0241] 为了进一步评估DX-2930的功效,在具有探究的高基线发作率的HAE患者中也观察了DX-2930的治疗效果。鉴定并评估在给药之前过去3个月内具有至少9次发作的受试者。有6例此类受试者-1例用安慰剂治疗,1例用300mg DX-2930治疗,4例用400mg DX-2930治疗。

[0242] 在安慰剂受试者中,在整个观察期间发作以高速率发生(图13,图板A)。相比之下,当药物水平高时,用300mg DX-2930治疗的受试者无发作(图13,图板B)。

[0243] 在用400mg DX-2930治疗的、基线发作率高的四例受试者中,所有这四例受试者在第8至第50天的时间间隔内无发作(图13,图板C-F)。这包括一例在过去3个月内具有36次发作的非常高基线率的受试者。这些DX-2930治疗的受试者的发作模式与在300和400mg组中整体观察到的一致。当药物水平高时,这些个体没有经历任何发作。只有在有意义的药物积累之前或药物水平下降之后的低药物水平时,才发生发作。

[0244] 从这些数据可以看出,在具有高基线发作率的HAE患者中,DX-2930的治疗效果也很明显。

[0245] 总而言之,本研究显示(a)对于DX-2930没有明显的安全信号,(b)PK曲线与单克隆抗体总体上一致,并支持每2周一次,甚至更低频率的给药方案,(c)药效学数据表明,DX-2930至少在激肽原生物标志物测定的情况下,正常化HAE血浆的异常不稳定性,和(d)观察到DX-2930预防HAE发作的高度统计上显著地发现。具体来说,与安慰剂相比,300和400mg DX-2930治疗组的发作分别降低了100%和88%。这种临床效果逻辑上与药物随着时间的暴露相关,并且在具有高基线发作率的患者的子组中也观察到这种临床效果。

[0246] 这些数据证明DX-2930长期预防HAE发作的概念验证。

[0247] 实施例2:DX-2930在遗传性血管性水肿患者中对血浆激肽释放酶的药效学影响

[0248] 遗传性血管性水肿(HAE)的发作是由不受控制的接触系统激活造成的,所述接触系统激活产生切割高分子量激肽原(HMWK)以产生2-链HMWK和诱导水肿的肽(缓激肽)的大

量的血浆激肽释放酶 (pKa1)。DX-2930是用于预防HAE发作的处于开发中的pKa1的人单克隆抗体抑制剂。在患有HAE的受试者中评估DX-2930的药效学生物活性。

[0249] 如上述实施例1所述,1b期多中心、双盲研究将具有1型或2型HAE的受试者随机化,从而以剂量组为30、100、300或400mg (n=4、4、5、11) 接受2次皮下剂量的DX-2930或安慰剂 (n=13)。在施用研究药物之前和之后 (第1、8、82、64、92、120天) 获得血液样品。使用蛋白印迹法,针对2-链HMWK,评估DX-2930在基础的 (basal) 和FXIIA激活的枸橼酸钠血浆中抑制pKa1的能力。

[0250] 从该研究获得的结果显示,与安慰剂治疗的受试者相比,在300和400mg剂量组中平均2-链HMWK水平分别在第8天和第22天以及在第8天、第22天和第50天显著降低并基本正常化。通过300或400mg DX-2930的治疗也可以将2-链产生的爆发减弱至在健康个体的FXIIA激活的样品中观察到的水平或该水平以下。2-链HMWK的水平与DX-2930之后第64、92或120天 (相当于低药物暴露期) 收集的激活或失活样品中的剂量前血浆样品的没有差异。

[0251] 总之,本研究表明,DX-2930在HAE患者中以剂量和时间依赖的方式抑制pKa1。

[0252] 实施例3:在具有遗传性血管性水肿的受试者中的DX-2930的1b期研究中观察到的药物暴露与临床反应之间的关系

[0253] DX-2930是处于开发中的、用于预防遗传性血管性水肿 (HAE) 发作的血浆激肽释放酶的人单克隆抗体抑制剂。分析如上述实施例1所述的HAE受试者中DX-2930的1b期研究的数据,以表征药物暴露与临床反应之间的关系。

[0254] 该1b期多中心、双盲研究将具有1型或2型HAE的受试者随机化,以剂量组为30、100、300或400mg (n=4、4、5、11) 接受2次皮下剂量的DX-2930或安慰剂 (n=13)。在该事后分析中,随着时间的推移,评估与药物暴露有关的HAE发作的发生率。此外,进行了事后改良的意向治疗功效分析 (MITT),以评估受试者在接受DX-2930全剂量方案的情况下的临床效果。

[0255] 安慰剂治疗的受试者在整个研究中报告了HAE发作 (9例受试者,65次HAE发作)。在300和400mg剂量组中,在初始剂量之前或刚在初始剂量之后报告了HAE发作。当药物水平高时 (第8至50天),除1例受试者之外,所有受试者均无发作。随着药物水平的衰退,发作重新出现。在MITT功效分析中,与安慰剂相比,从第8天到第50天,300和400mg DX-2930组的发作分别降低了100% ($P<0.0001$) 和95% ($P=0.0022$)。

[0256] 因此,这项研究表明,在显著的药物暴露阶段期间,HAE发作大幅度降低或消除,这与较高药物水平与HAE发作预防相关的建议一致。

[0257] 实施例4:鉴定用于长期预防遗传性血管性水肿的DX-2930的潜在给药方案的建模和分析

[0258] DX-2930是处于开发中的、用于预防遗传性血管性水肿 (HAE) 发作的血浆激肽释放酶的人单克隆抗体抑制剂。对来自上述实施例1中所述的DX-2930的1期研究的数据进行建模和分析,以鉴定潜在的给药方案。

[0259] 检验来自1期临床研究的药代动力学、药效学和功效数据。评估HAE发作相对于血浆药物浓度的发生率,以估计预防发作所需的稳态谷药物水平。

[0260] 对于关键功效研究,考虑每2 (q2) 或4 (q4) 周300mg DX-2930的给药方案和每q4周150mg的给药方案。药代动力学建模预测的稳态谷血浆浓度分别为27,000、9500和4,750ng/mL。在1b期研究中,在27,000ng/mL (相当于300mg DX-2930在第22天的近似药物水平),2-链

高分子量激肽原收到抑制,达到接近在健康受试者中观察到的水平。因此,预测300mg q2能使稳态中的HAE血浆的不稳定性正常化。由于成功的HAE预防可能不需要如此高水平的药效学效应,因此对与血浆药物浓度相关的临床效果也进行分析。在DX-2930治疗后的1b期研究中,24/25发作(96%)、21/25(84%)和18/25发作(72%)分别在低于27,000、9500和4,750ng/mL的血浆浓度发生,表明有意义的临床反应范围与该范围的药物暴露有关。

[0261] 在该分析中,鉴定了DX-2930的潜在给药方案,以在关键功效研究中用于进一步临床研究。

[0262] 实施例5:在健康分析声明数据库(Health Analytics Claims Database)的分析中,遗传性血管性水肿与神经性疼痛、系统性红斑狼疮和系统性肥大细胞增多症有关

[0263] 除了作为遗传性血管性水肿(HAE)的关键介质之外,血浆激肽释放酶激肽系统(KKS)还已经与各种疾病相关联。本研究探讨了HAE患者是否易于患有以下这些KKS相关疾病:腹主动脉瘤、过敏反应、心脏血管麻痹综合征(cardiac vasoplegia syndrome)、克罗恩病、糖尿病性黄斑水肿、特发性过敏反应、神经性疼痛、牛皮癣、牛皮癣关节炎、视网膜病变、类风湿关节炎、系统性红斑狼疮(SLE)、系统肥大细胞增多症、系统性血管炎、血栓性脑血管意外和溃疡性结肠炎。

[0264] 本研究采用了Truven MarketScan数据库,该数据库包含来自医疗付款人以及从2010年1月至2014年7月期间在美国为8000万人口提供的医疗保险补充计划的个体水平声明数据(claims data)。在该数据集内,使用ICD-9和处方药代码的组合定义HAE群体(n=1063)和2个对照群体:血管性水肿群体(n=138,851)和不包括HAE患者的一般群体(n=79,971,098)。通过计算的比值比(odds ratio)和95%的置信区间(CI),鉴定并比较了在各群体中对并发症(comorbid)的声明。

[0265] 如下表8所示,在HAE群体中,观察到SLE是血管性水肿对照群体的2.3倍(OR 2.30, 95%CI:1.47-3.59)。观察到神经性疼痛是血管性水肿对照群体的1.45倍(OR 1.45, 95%CI:1.01-2.09)和系统性肥大细胞增多症是血管性水肿对照群体的4.79倍(OR 4.79, 95%CI:1.51-15.18)。

[0266] 表8 HAE和其它KSS相关的疾病之间的关联

[0267]

相关疾病	HAE 群体		血管性水肿对照		比值比(95% CI)
	N=1063	%	N=138,851	%	
异常动脉瘤(AAA)	6	0.56	583	0.42	1.35 (0.60, 3.02)
过敏反应	86	8.09	15,293	11.01	0.72 (0.57, 0.89)
心脏血管麻痹综合症	2	0.19	88	0.06	2.97 (0.73, 12.09)
克罗恩病	6	0.56	848	0.61	0.92 (0.41, 2.07)
糖尿病性黄斑水肿	2	0.19	140	0.10	1.87 (0.46, 7.55)
特发性过敏性反应	59	5.55	8,442	6.08	0.91 (0.70, 1.18)
神经性头痛	30	2.82	2,726	1.96	1.45 (1.01, 2.09)

[0268]	牛皮癣	14	1.32	2,182	1.57	0.84 (0.49, 1.42)
	牛皮癣关节炎	4	0.38	382	0.28	1.37 (0.51, 3.67)
	视网膜病变	2	0.19	85	0.06	3.08 (0.76, 12.52)
	类风湿关节炎	30	2.82	3,093	2.23	1.27 (0.89, 1.84)
	系统性红斑狼疮	20	1.88	1,148	0.83	2.30 (1.47, 3.59)
	系统性肥大细胞增多症	3	0.28	82	0.06	4.79 (1.51, 15.18)
	系统性血管炎	2	0.19	189	0.14	1.38 (0.34, 5.58)
	血栓脑血管意外(CVA)	2	0.19	375	0.27	0.70 (0.17, 2.80)
	溃疡性结肠炎	9	0.85	902	0.65	1.31 (0.68, 2.53)

[0269] 总之,对大型纵向声明数据库的分析显示,与其它类型的血管性水肿相比,SLE、神经性疼痛和系统性肥大细胞增多症的并发症在HAE患者中的表现地更多,表明KKS的活性可能有助于这些疾病的表现。因此,患有HAE或处于HAE风险的患者可能易患KKS相关疾病,包括神经性疼痛、系统性红斑狼疮和系统性肥大细胞增多症。因此,使用pKa1抑制剂如DX-2930的治疗可降低患有这类KKS相关疾病的风险。

[0270] 实施例6:包括加载期和维持期的双盲研究

[0271] 进行随机、双盲、安慰剂对照的平行组 (arm) 研究。选择患有I型或II型HAE的患者,所述患者每4周至少1次发作。使用导入期 (run-in period) 来评估基线HAE发作率。将患者进行1:1:1的随机化分成3个不同治疗组 (300mg DX-2930、150mg DX-2930或安慰剂),其通过皮下注射施用。该研究设计有加载期和维持期(图14)。受试者在加载期期间的第0、7和14天接受治疗,然后在维持期期间接受每2周给药(第28、42、56、70和84天)。

[0272] 其它实施方案

[0273] 本说明书中公开的所有特征可以任何组合而联合。在本说明书中公开的每种特征均可被用于相同、等同或类似目的的可选特征替换。因此,除非另外明确指出,否则公开的每个特征仅仅是一系列等同或类似特征的例子。

[0274] 通过上面的描述,本领域技术人员可容易确定本发明的本质特征,并且在不背离其精神和范围的情况下,可对本发明做出各种改变和修饰,以使其适应各种用途和条件。因此,其它实施方式也在权利要求的范围内。

[0275] 等等原则

[0276] 尽管本文已经描述和阐释了若干发明的实施方式,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式的范围内。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式的许多等同方案。因此,应理解,前述实施方式仅作为例子提供,并且在所附的权利要求和其等同范围内,本发明实施方式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式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。

[0277] 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。

[0278] 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”。

[0279] 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,在一个实施方式中,可仅仅指A(任选地包括B之外的要素);在另一实施方式中,仅仅指B(任选地包括A之外的要素);在仍另一实施方式中,指A和B二者(任选地包括其它要素)等。

[0280] 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,“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。

[0281] 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”),在一个实施方式中,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);在另一实施方式中,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);在仍另一实施方式中,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。

[0282] 也应理解,除非清楚地相反指出,在本文要求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。

[0283] 在权利要求书以及上面说明书中,所有过渡短语比如“包括(comprising)”、“包括(including)”、“携带”、“具有”、“包含”、“涉及”、“保持”、“由……组成”等理解为开放式的,即,意思是包括但不限于。仅仅“由……组成”和“基本上由……组成”的过渡短语应分别解释为封闭式的或半封闭式的短语,如在美国专利局专利审查程序手册,2111.03节中阐释的。

序列表

<110> 戴埃克斯有限公司
 <120> 血浆激肽释放酶抑制剂及其预防遗传性血管性水肿发作的用途
 <130> D0617.70107W000
 <140> 未分配
 <141> 2016-03-30
 <150> US 62/214,293
 <151> 2015-09-24
 <150> US 62/140,277
 <151> 2015-03-30
 <150> US 62/140,289
 <151> 2015-03-30
 <160> 10
 <170> PatentIn 版本 3.5
 <210> 1
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 1
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 35 40 45
 His Tyr Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60
 Trp Val Ser Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp
 65 70 75 80
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Tyr Arg Arg Ile Gly Val Pro Arg Arg Asp Glu Phe Asp
 115 120 125
 Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130	135	140
Gly Pro Ser Val Phe	Pro Leu Ala Pro Ser Ser	Lys Ser Thr Ser Gly
145	150	155
Gly Thr Ala Ala Leu	Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe	Pro Glu Pro
165	170	175
Val Thr Val Ser Trp	Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly	Val His Thr
180	185	190
Phe Pro Ala Val Leu	Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	Ser Ser Val
195	200	205
Val Thr Val Pro Ser	Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile	Cys Asn
210	215	220
Val Asn His Lys Pro	Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val	Glu Pro
225	230	235
Lys Ser Cys Asp Lys	Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala	Pro Glu
245	250	255
Leu Leu Gly Gly Pro	Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro	Lys Asp
260	265	270
Thr Leu Met Ile Ser	Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val	Val Asp
275	280	285
Val Ser His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val	Asp Gly
290	295	300
Val Glu Val His Asn	Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln	Tyr Asn
305	310	315
Ser Thr Tyr Arg Val	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln	Asp Trp
325	330	335
Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala	Leu Pro
340	345	350
Ala Pro Ile Glu Lys	Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro	Arg Glu
355	360	365
Pro Gln Val Tyr Thr	Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr	Lys Asn
370	375	380
Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser	Asp Ile
385	390	395
Ala Val Glu Trp Glu	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr
405	410	415
Thr Pro Pro Val Leu	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	Ser Lys
420	425	430
Leu Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe	Ser Cys
435	440	445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 450 455 460
 Ser Leu Ser Pro Gly
 465
 <210> 2
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 2
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly Ala
 1 5 10 15
 His Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser
 20 25 30
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 35 40 45
 Ser Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 50 55 60
 Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 85 90 95
 Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr
 100 105 110
 Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 115 120 125
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 145 150 155 160
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 165 170 175
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 195 200 205
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 210 215 220

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr

20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Tyr Arg Arg Ile Gly Val Pro Arg Arg Asp Glu Phe Asp Ile Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 4

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Trp Thr		
	85	90
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		95
	100	105

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 5

His Tyr Ile Met Met

1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 6

Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 7

Arg Arg Ile Gly Val Pro Arg Arg Asp Glu Phe Asp Ile

1 5 10

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 9

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

1 5

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 10

Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Trp Thr

1 5

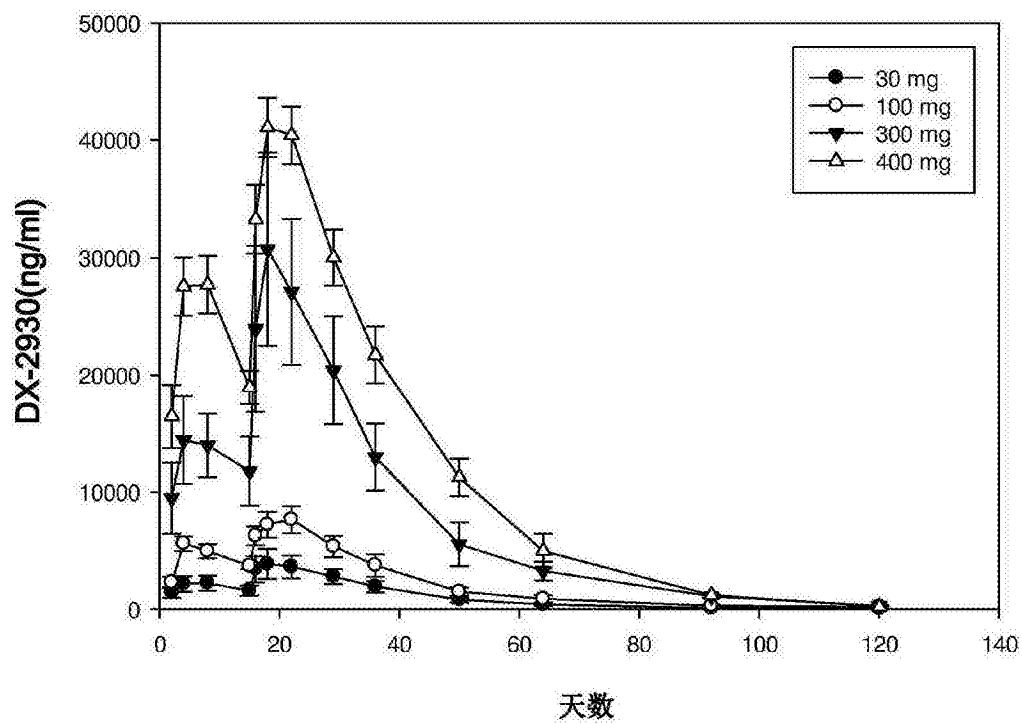


图1

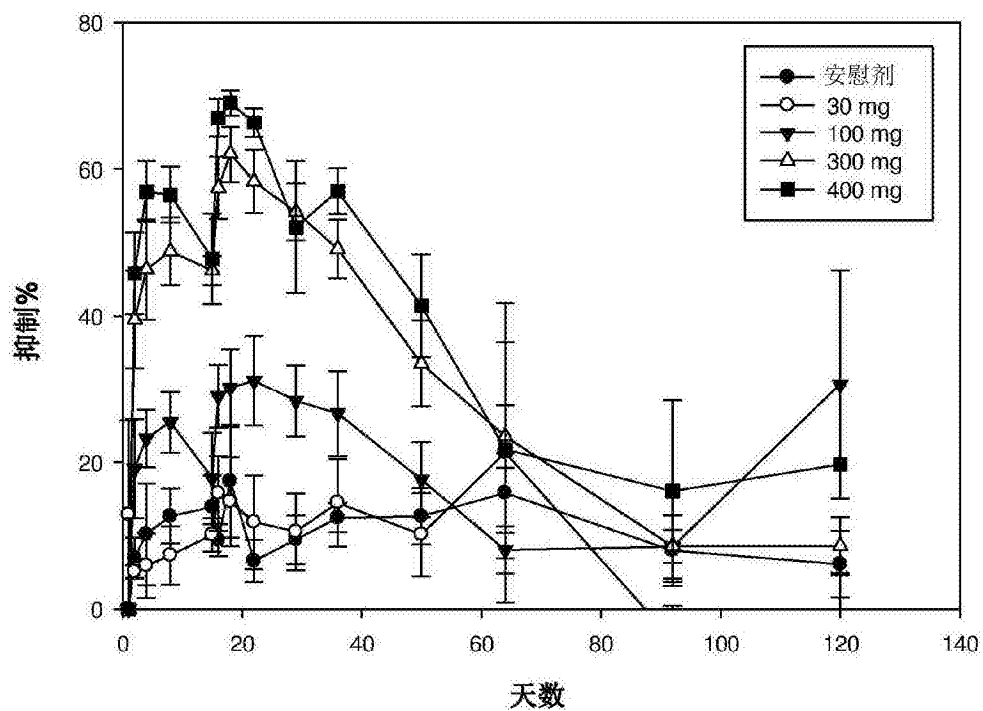


图2

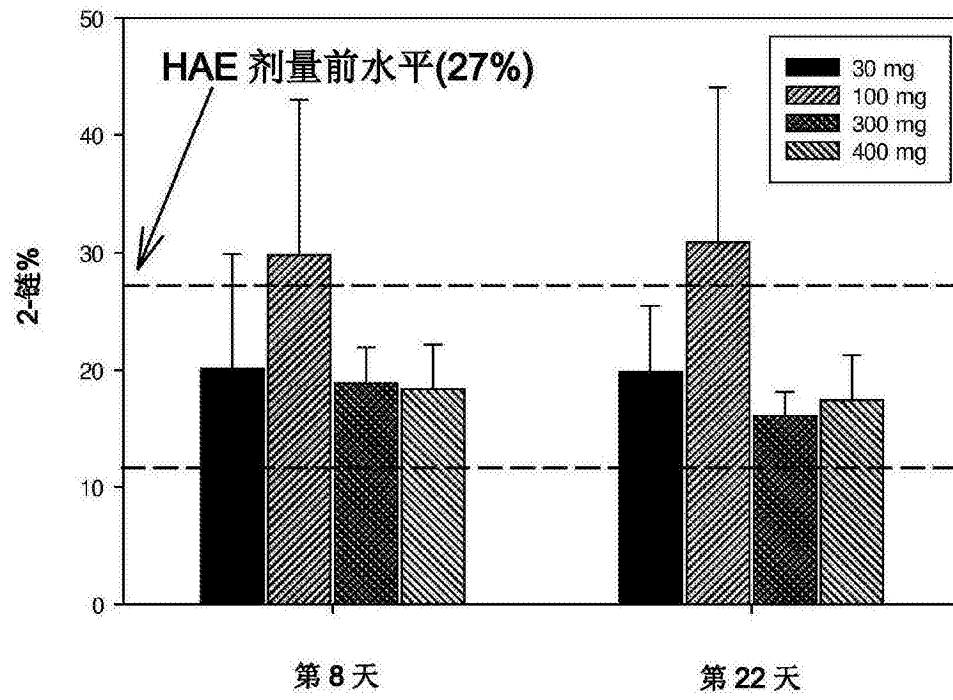


图3

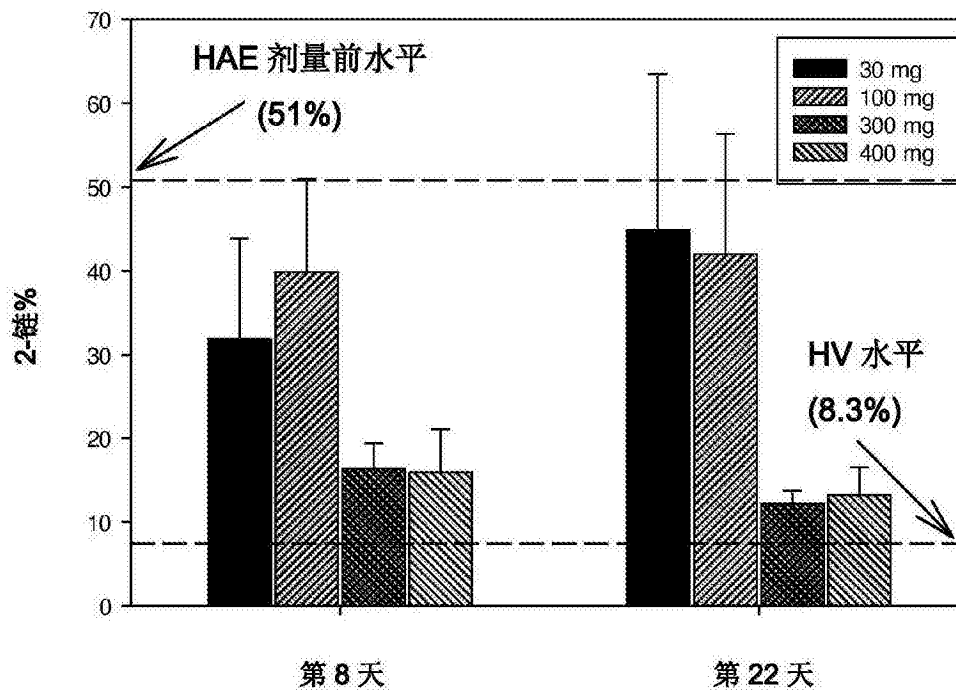


图4

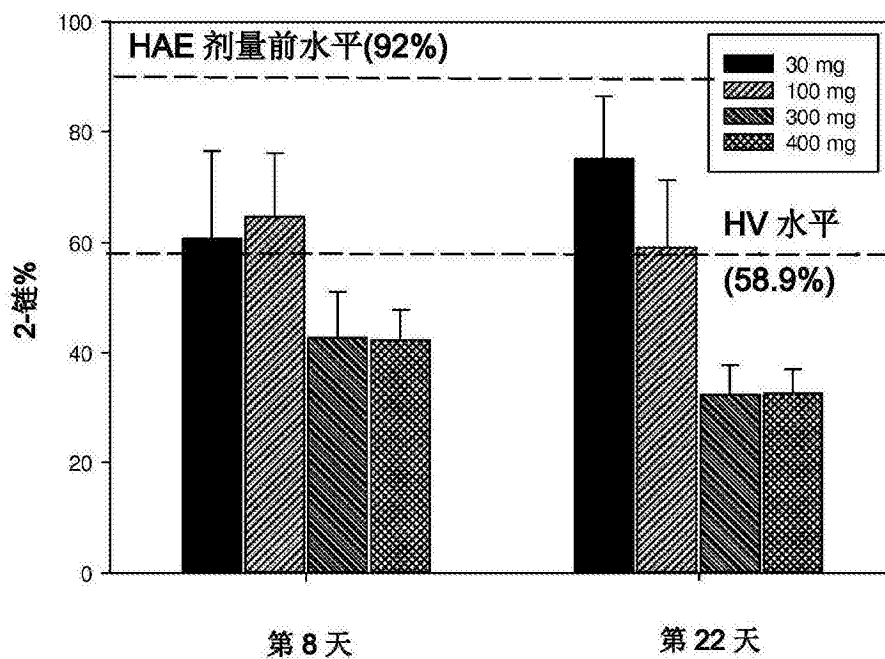


图5

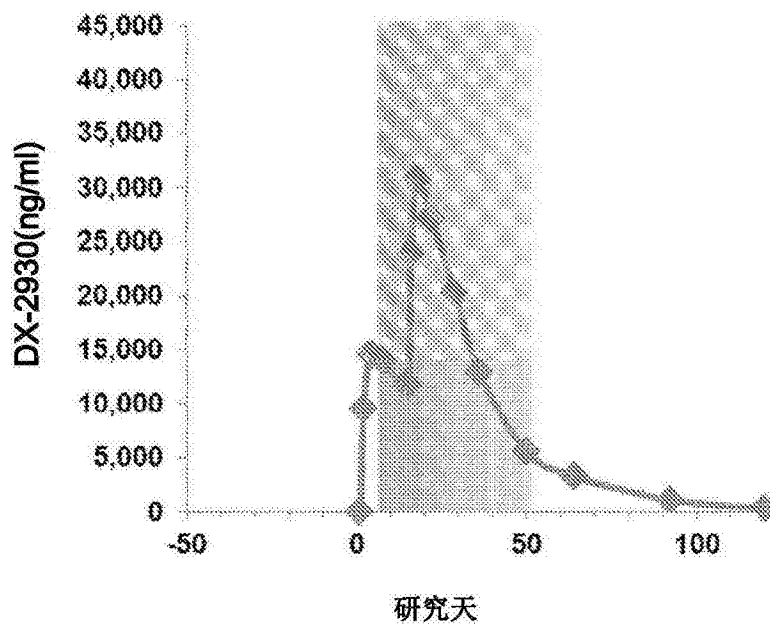


图6A

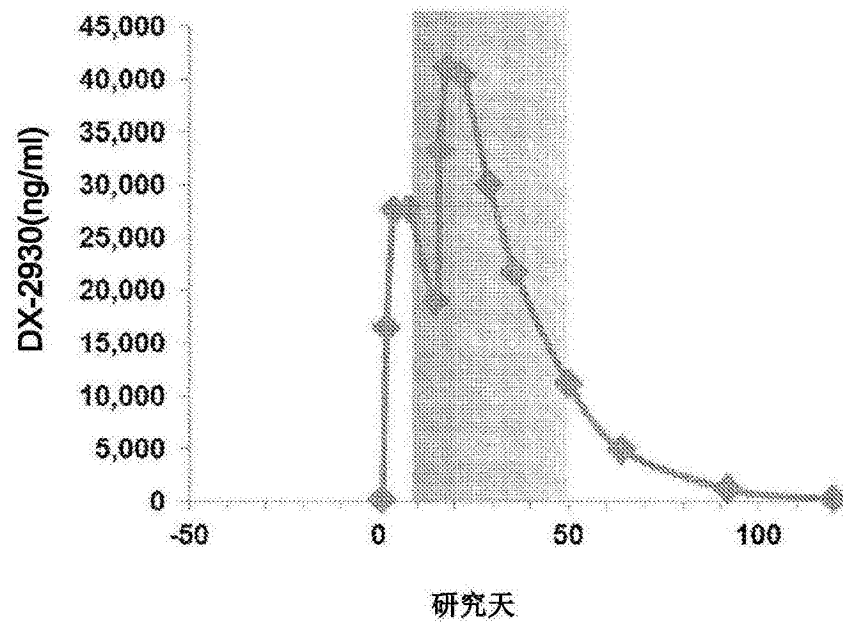


图6B

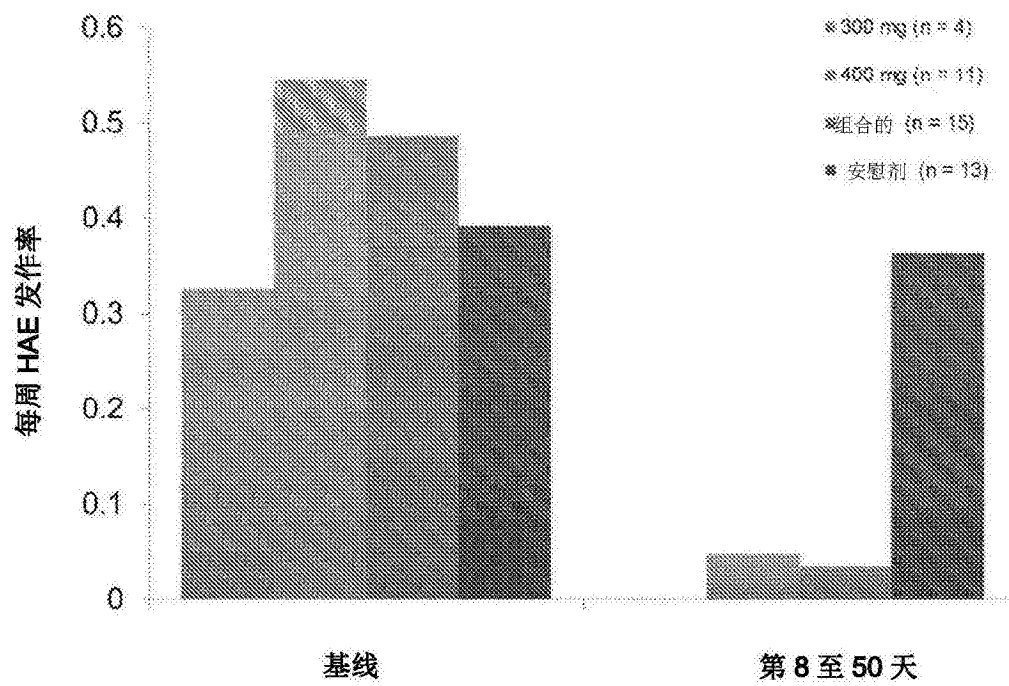


图7

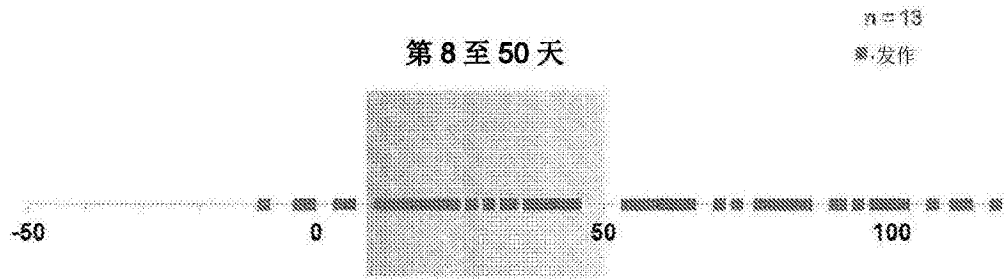


图8

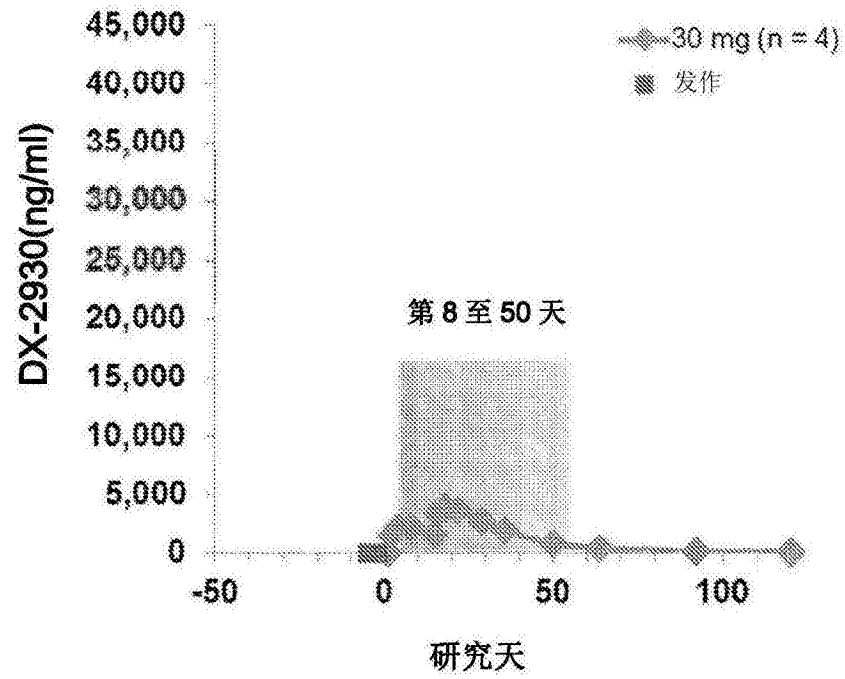


图9

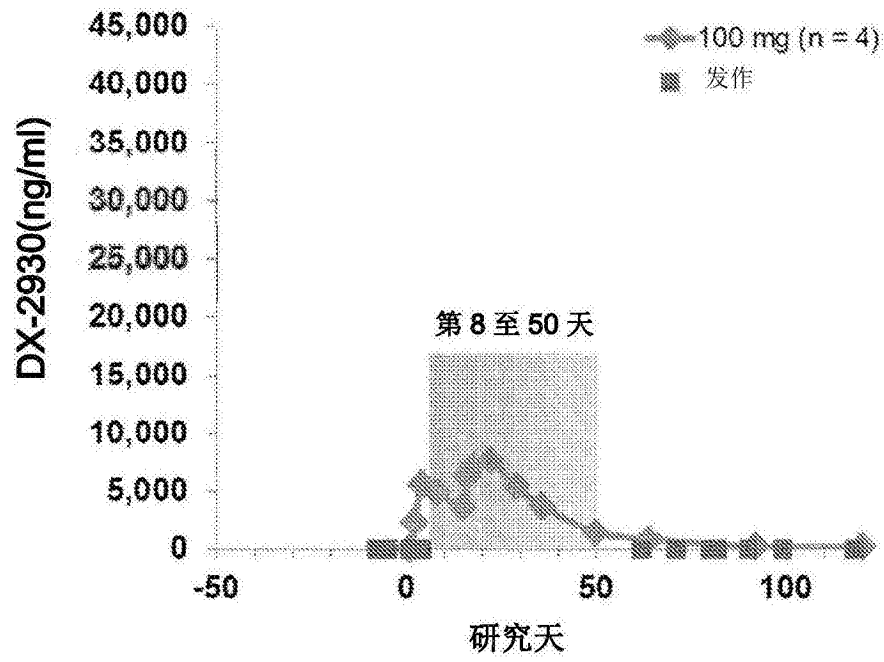


图10

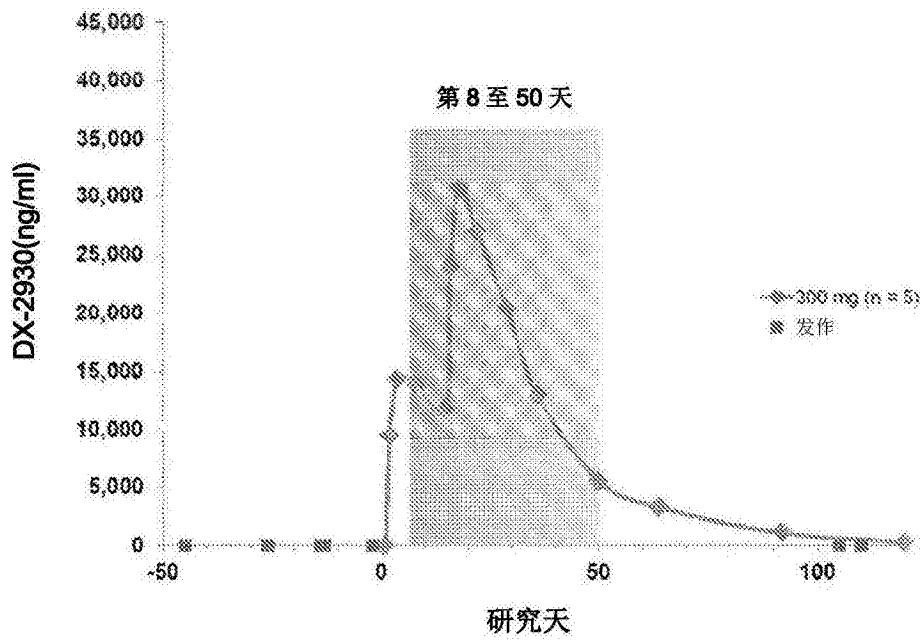


图11

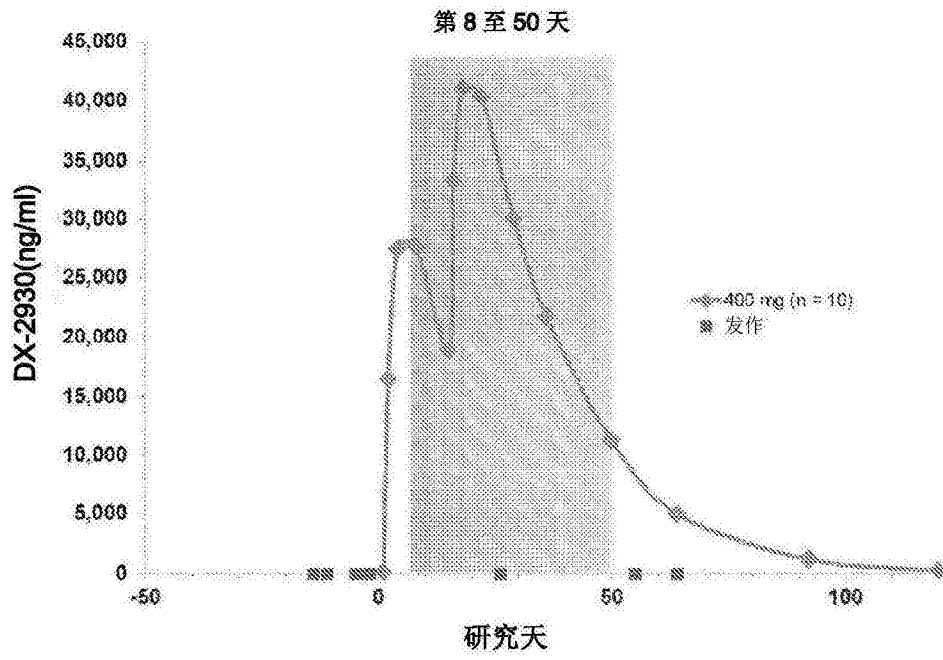


图12

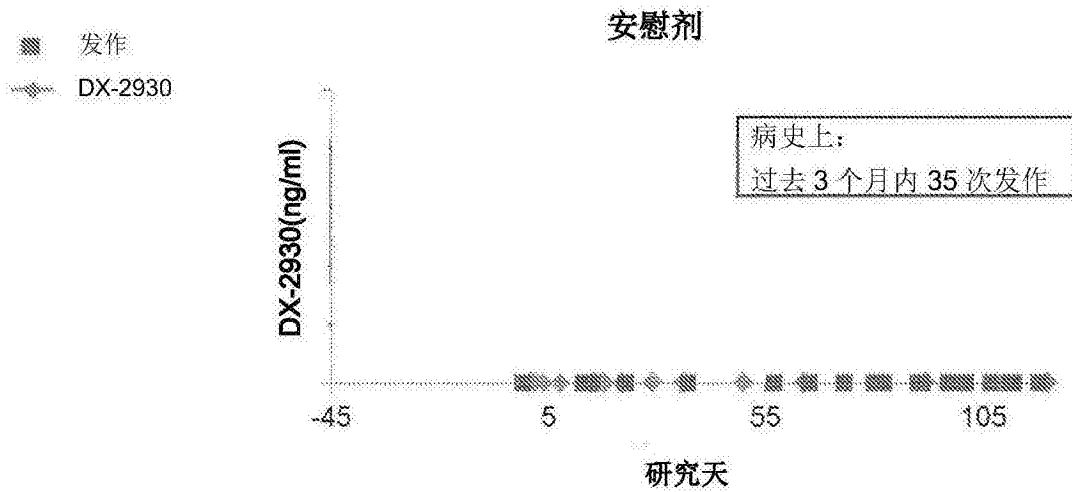


图13A

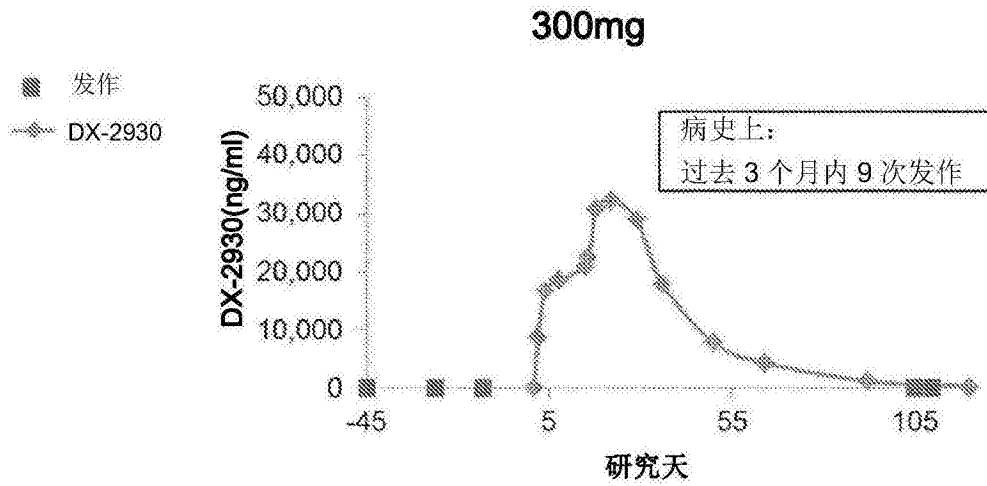


图13B

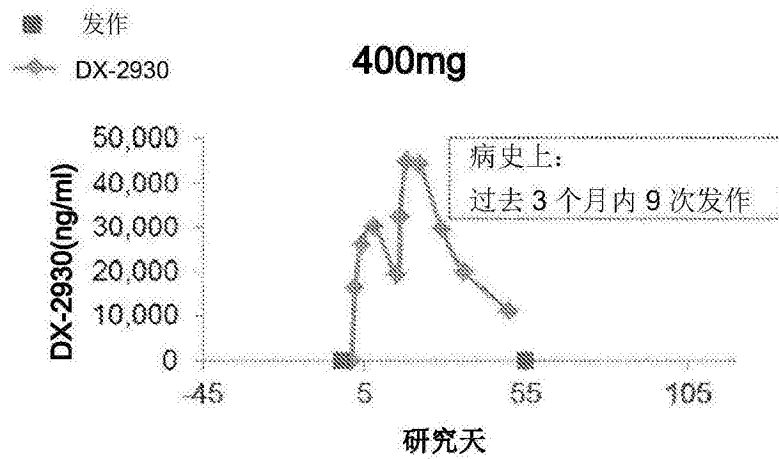


图13C

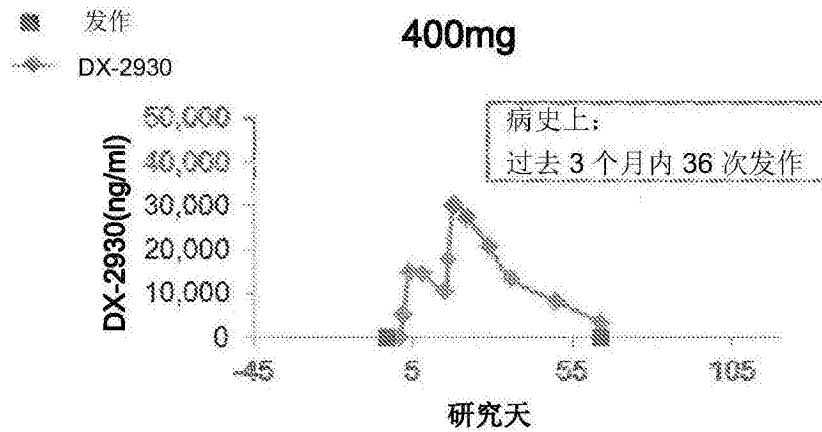


图13D

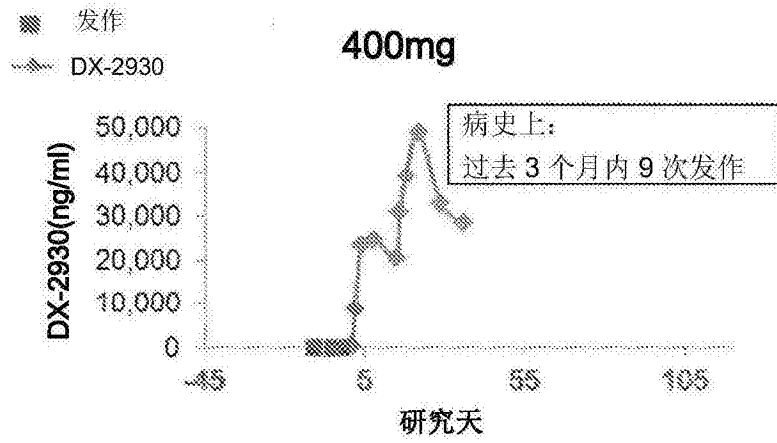


图13E

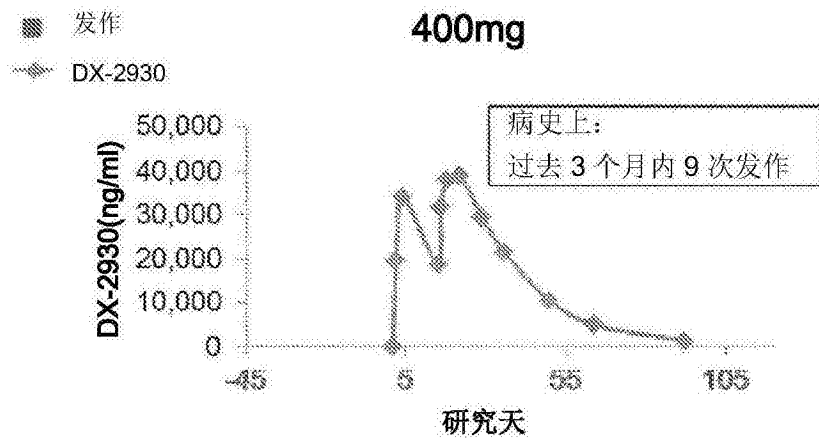


图13F

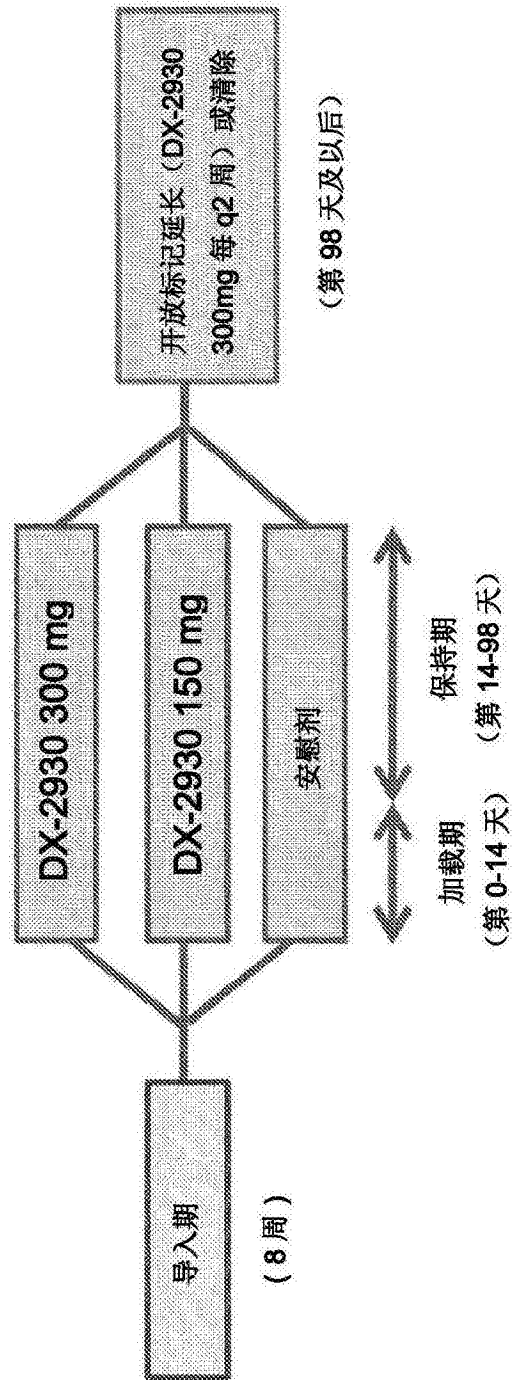


图14