

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 408**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2014 PCT/US2014/012107**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14113712**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014 E 14740444 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2948479**

54 Título: **Evaluación y tratamiento de trastornos mediados por bradiquinina**

30 Prioridad:

**20.01.2013 US 201361754607 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**03.12.2018**

73 Titular/es:

**DYAX CORP. (100.0%)  
300 Shire Way  
Lexington, MA 02421, US**

72 Inventor/es:

**SEXTON, DANIEL, J.;  
FAUCETTE, RYAN;  
KENNISTON, JON, A.;  
CONLEY, GREG;  
NIXON, ANDREW;  
TENHOOR, CHRISTOPHER;  
ADELMAN, BURT y  
CHYUNG, YUNG**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 692 408 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Evaluación y tratamiento de trastornos mediados por bradiquinina

**5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES DE PATENTE RELACIONADAS****ANTECEDENTES**

10 La calicreína plasmática (pKal) es la principal enzima generadora de bradiquinina en la circulación. La activación de pKal se produce por medio del sistema de contacto que se ha vinculado a la patología de la enfermedad asociada con angioedema hereditario (HAE). La bradiquinina es un mediador clave del dolor, de la inflamación, del edema y de la angiogénesis.

15 Los quinínógenos son precursores de quinina, tales como la bradiquinina y la calicreína. Existen dos tipos de quinínógenos humanos, quinínógeno de alto peso molecular (HMWK) y quinínógeno de bajo peso molecular (LMWK), que son variantes de corte y empalme. El HMWK actúa principalmente como cofactor en la coagulación y la inflamación y es el sustrato preferido para la generación de bradiquinina mediada por pKal. Tanto los HMWK como los LMWK son inhibidores de la cisteína proteasa.

20 Phipps *et al.* (Hypertension. 2009 Feb; 53(2):175-81) afirman que la calicreína plasmática media la permeabilidad vascular retinal estimulada por el receptor de angiotensina II de tipo 1. Zhang *et al.* (FASEB J. 2000 Dec; 14(15):2589-600) explican que la porción de cadena pesada de HMWK escindido está también presente en LMWK.

**SUMARIO DE LA INVENCIÓN**

25 La invención proporciona un procedimiento para identificar a un sujeto en riesgo de padecer o que padece un trastorno mediado por calicreína plasmática (pKal), comprendiendo el procedimiento:

30 medir un nivel de un quinínógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido y, opcionalmente, un nivel de un HMWK intacto en una muestra de un sujeto;

determinar un valor del HMWK escindido; y

35 establecer que el sujeto está en riesgo de padecer o que padece un trastorno mediado por pKal si el valor del HMWK escindido es superior a un valor de referencia,

en el que el valor de referencia se refiere al valor de HMWK escindido en un sujeto sano;

40 y en el que el trastorno mediado por pKal es angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

La invención también proporciona un procedimiento para evaluar un tratamiento de un trastorno mediado por pKal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

45 medir niveles de un HMWK escindido y opcionalmente niveles de un HMWK intacto en muestras recogidas de un sujeto antes y después del tratamiento o durante el transcurso del tratamiento;

50 determinar un valor de HMWK escindido en cada muestra basándose en los niveles de HMWK escindido y, opcionalmente, intacto en la misma muestra y

evaluar la eficacia del tratamiento basándose en los cambios en los valores de HMWK escindido en las muestras antes y después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento,

55 en el que el trastorno mediado por pKal es angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

60 La invención también proporciona una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de una enfermedad mediada por pKal en un sujeto, comprendiendo la composición un inhibidor de pKal y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el sujeto tiene un valor de quinínógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido que es superior a un valor de referencia, que se refiere al valor de HMWK escindido en un sujeto sano; y en la que la enfermedad mediada por pKal es angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

65 La calicreína plasmática (pKal) es un componente de tipo serina proteasa del sistema de contacto y es la principal enzima generadora de bradiquinina en la circulación. El sistema de contacto se activa o bien mediante el factor XIIa después de exposición a superficies extrañas o cargadas negativamente o bien en superficies celulares endoteliales

mediante proilcarboxipeptidasas (Sainz I.M. *et al.*, *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). La activación de la calicreína plasmática amplifica la coagulación intrínseca por medio de su activación por retroalimentación del factor XII y fomenta la inflamación por medio de la producción del nonapéptido proinflamatorio bradiquinina. Como la principal quininogenasa en circulación, la pKal es ampliamente responsable de la generación de bradiquinina en la vasculatura. Una deficiencia genética en la proteína inhibidora C1 (C1-INH), el principal inhibidor natural de la calicreína plasmática, desemboca en un angioedema hereditario (HAE). Los pacientes con HAE padecen ataques agudos de edema doloroso frecuentemente precipitados por desencadenantes desconocidos (Zuraw B.L. *et al.*, *N Engl J Med* 359, 1027-1036, 2008). Mediante el uso de agentes farmacológicos o de estudios genéticos en modelos animales, el sistema calicreína-quinina plasmático (KKS plasmático) ha sido involucrado en diversas enfermedades.

Como se describe en el presente documento, se desarrolló un ensayo de inmunotransferencia Western para la detección de quininógeno de alto peso molecular (HMWK) intacto (monocatenario) y escindido (bicatenario), utilizando un reactivo de detección (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente (por ejemplo, preferentemente) o bien al quininógeno intacto o bien al quininógeno escindido, y opcionalmente, no se une a LMWK. Dicho reactivo de detección puede utilizarse para supervisar cantidades relativas de HMWK monocatenario y bicatenario en el plasma de pacientes. Aplicando este procedimiento se encontró que el nivel (por ejemplo, el porcentaje) de quininógeno escindido en una muestra del paciente se incrementa en estados de enfermedad que se sabe que están mediados por un exceso de activación de pKal, tales como ataques de HAE edematosos. El porcentaje de quininógeno escindido en el plasma de pacientes con otras enfermedades puede analizarse subsiguientemente para determinar si el pKal activo está asociado con la enfermedad. Otras enfermedades que se han estudiado y que se ha mostrado que presentan aumentos de quininógeno, con respecto al plasma sano, incluyen artritis reumatoide (RA), colitis ulcerosa (UC) y enfermedad de Crohn.

En consecuencia, un aspecto de la presente divulgación se refiere a un procedimiento para identificar a un sujeto en riesgo de padecer o que padece un trastorno mediado por pKal, comprendiendo el procedimiento: (a) medir un nivel de un quininógeno (por ejemplo, HMWK) escindido y un nivel de un quininógeno (por ejemplo, HMWK) intacto en una muestra de un sujeto (por ejemplo, una muestra de sangre o una muestra de plasma) mediante, por ejemplo, un ensayo de inmunotransferencia Western; (b) determinar un valor (por ejemplo, un porcentaje) del quininógeno escindido, un valor del quininógeno intacto (por ejemplo, un porcentaje), o ambos, en la muestra y (c) establecer que el sujeto está en riesgo de padecer o padece un trastorno mediado por pKal si el valor del quininógeno escindido, el valor del quininógeno intacto, o ambos, se desvían de un valor de referencia. En algunos ejemplos, se determina el porcentaje de quininógeno escindido y se establece que el sujeto está en riesgo de padecer o padece la enfermedad diana si el porcentaje de quininógeno escindido en la muestra es igual o superior a un valor de referencia.

En algunas formas de realización, los niveles del quininógeno escindido y del quininógeno intacto se miden mediante un agente de detección (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente (por ejemplo, preferentemente) o bien al quininógeno escindido o bien al intacto. Dicho agente de detección (por ejemplo, un anticuerpo) puede unirse tanto al quininógeno intacto como al escindido, pero no se une a LMWK. En otras formas de realización, los niveles del quininógeno escindido y del quininógeno intacto se miden mediante un agente de detección (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a quininógeno escindido en comparación con quininógeno intacto, o se une específicamente a quininógeno intacto en comparación con quininógeno escindido. En un ejemplo, el reactivo de detección es un anticuerpo que se une específicamente a quininógeno escindido en comparación con quininógeno intacto. En otro ejemplo, el agente de detección es un anticuerpo que se une al extremo C-terminal de la cadena ligera del quininógeno escindido, que no está presente en LMWK.

El trastorno mediado por pKal puede ser angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn. Si se establece que el sujeto está en riesgo de padecer o padece un trastorno mediado por pKal, el procedimiento tal como se describe en el presente documento puede comprender adicionalmente administrar una cantidad eficaz de un inhibidor de pKal al sujeto. En algunos ejemplos, el inhibidor de pKal es DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

En algunas formas de realización, la muestra es de un sujeto que presenta un síntoma de un trastorno mediado por pKal, incluidos, pero sin limitación, edema, ataques recurrentes de inflamación, inflamación, siendo dicha inflamación completamente o predominantemente periférica, urticaria, enrojecimiento, dolor e inflamación en ausencia de evidencias de infección; o edema no mediado por histamina. En otras formas de realización, la muestra es de un sujeto que no presenta síntomas de un trastorno mediado por pKal en el momento de recoger la muestra, no tiene antecedentes de un síntoma de un trastorno mediado por pKal o no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal. Como alternativa o adicionalmente, el sujeto es resistente a un tratamiento antihistamínico, un tratamiento con corticosteroides, o a ambos.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar si un trastorno es susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal, comprendiendo el procedimiento: (a) medir un nivel de un quininógeno (por ejemplo, HMWK) escindido y un nivel de un quininógeno (por ejemplo, HMWK) intacto en una muestra de un sujeto (por ejemplo, una muestra de sangre o una muestra de plasma) que padece el trastorno; (b) determinar un valor (por ejemplo, un porcentaje) del quininógeno escindido, un valor (por ejemplo, un porcentaje) del quininógeno intacto, o ambos, en la muestra y (c) establecer que el trastorno es susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal si el

valor del quinínógeno escindido, el valor del quinínógeno intacto, o ambos, se desvían de un valor de referencia. En un ejemplo, se determina el porcentaje de quinínógeno escindido y se constata que la enfermedad es susceptible de tratamiento si el porcentaje de quinínógeno escindido es igual o superior a un valor de referencia.

5 En algunas formas de realización, los niveles del quinínógeno escindido y del quinínógeno intacto se miden mediante un agente de detección (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a quinínógeno escindido en comparación con quinínógeno intacto, o se une específicamente a quinínógeno intacto en comparación con quinínógeno escindido. En algunos ejemplos, el reactivo de detección es un anticuerpo que se une específicamente a quinínógeno escindido en comparación con quinínógeno intacto. En otros ejemplos, el reactivo de detección es un anticuerpo que se une al extremo C-terminal de la cadena ligera de quinínógeno escindido. En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los niveles del quinínógeno intacto y del quinínógeno escindido pueden medirse mediante ensayo de inmunotransferencia Western.

15 Si se constata que el trastorno es susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal, el procedimiento puede comprender adicionalmente administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de pKal, que incluye, pero sin limitación, DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

20 En otro aspecto más, la presente invención también proporciona un procedimiento para evaluar un tratamiento de un trastorno mediado por pKal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento: (a) medir niveles de un quinínógeno (por ejemplo, HMWK) escindido y niveles de un quinínógeno (por ejemplo, HMWK) intacto en muestras (por ejemplo, muestras de sangre o muestras de plasma) recogidas del sujeto antes y después del tratamiento o durante el transcurso del tratamiento; (b) determinar un valor (por ejemplo, un porcentaje) de quinínógeno escindido, un valor (por ejemplo, un porcentaje) de quinínógeno intacto, o ambos, en cada muestra basándose en los niveles de quinínógeno escindido e intacto en la misma muestra y (c) evaluar la eficacia del tratamiento basándose en los cambios en el valor de quinínógeno escindido y/o intacto antes y después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento. Por ejemplo, una reducción del porcentaje de quinínógeno escindido después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento indica que el tratamiento es eficaz sobre el sujeto. En algunas formas de realización, el tratamiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un inhibidor de pKal, por ejemplo DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

30 En cualquiera de los procedimientos de evaluación descritos en el presente documento, los niveles del quinínógeno escindido y del quinínógeno intacto pueden medirse por medio de un agente de detección (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a quinínógeno escindido en comparación con quinínógeno intacto, o se une específicamente a quinínógeno intacto en comparación con quinínógeno escindido. En algunos ejemplos, el reactivo de detección es un anticuerpo que se une específicamente a quinínógeno escindido en comparación con quinínógeno intacto. En otros ejemplos, el agente de detección es un anticuerpo que se une al extremo C-terminal de la cadena ligera de quinínógeno escindido. En cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los niveles del quinínógeno intacto y del quinínógeno escindido pueden medirse mediante ensayo de inmunotransferencia Western.

40 En algunas formas de realización, el trastorno mediado por pKal es angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

45 Además, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar un valor de quinínógeno escindido, un valor de quinínógeno intacto, o ambos, en una muestra, que comprende (a) poner en contacto una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre o una muestra de plasma) que contiene quinínógeno intacto y escindido con un reactivo de detección en condiciones que permitan la interacción entre el agente de detección y el quinínógeno intacto y escindido, en el que el agente de detección se une específicamente a quinínógeno escindido en comparación con quinínógeno intacto, o se une específicamente a quinínógeno intacto en comparación con quinínógeno escindido; (b) medir el nivel de quinínógeno escindido y/o quinínógeno intacto en la muestra basándose en su interacción con el reactivo de detección y (c) determinar un valor (por ejemplo, un porcentaje) del quinínógeno escindido, un valor (por ejemplo, un porcentaje) del quinínógeno intacto, o ambos, en la muestra basándose en los niveles del quinínógeno escindido y del quinínógeno intacto. En algunas formas de realización, el reactivo de detección es un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se une específicamente a quinínógeno escindido en comparación con quinínógeno intacto, o un anticuerpo que se une al extremo C-terminal de la cadena ligera de quinínógeno escindido. En algunas formas de realización, las cantidades del quinínógeno intacto y del quinínógeno escindido se miden mediante ensayo de inmunotransferencia Western.

60 También dentro del alcance de la presente divulgación se encuentran (i) un procedimiento para tratar una enfermedad mediada por pKal, que comprende administrar a un sujeto con necesidad de ello una cantidad eficaz de un inhibidor de pKal tal como se describe en el presente documento, en el que el sujeto tiene un valor (por ejemplo, un porcentaje) de quinínógeno escindido, un valor (por ejemplo, un porcentaje) de quinínógeno intacto, o ambos, que se desvía del valor de referencia, (ii) una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por pKal en un sujeto, comprendiendo la composición un inhibidor de pKal y un vehículo farmacéuticamente aceptable y en la que el sujeto presenta un valor desviado de quinínógeno escindido y/o quinínógeno intacto, en comparación con un valor de referencia, y (iii) el uso de la composición farmacéutica para la

fabricación de un medicamento para su utilización en el tratamiento de una enfermedad mediada por pKal, por ejemplo HAE. En algunas formas de realización, el valor de quinínogeno escindido y/o intacto es el porcentaje de quinínogeno escindido y/o intacto en la muestra.

5 Las formas de realización siguientes también se encuentran dentro del alcance de la presente divulgación:

En el presente documento se proporcionan procedimientos para evaluar un sujeto, por ejemplo un sujeto en riesgo de padecer o que padece un trastorno mediado por pKal o mediado por bradiquinina. Los procedimientos proporcionados permiten el análisis de pacientes con angioedema mediado por calicreína plasmática (KMA), u otras enfermedades mediadas por pKal útiles en la evaluación y el tratamiento.

Las formas de realización de la presente divulgación proporcionan un biomarcador y el uso del mismo en la identificación y el tratamiento de pacientes, por ejemplo de pacientes que padecen un edema provocado por bradiquinina que se ha generado por medio de calicreína plasmática. Los procedimientos, las composiciones y los dispositivos divulgados por el presente documento son útiles de una serie de maneras. Por ejemplo, los niveles de un marcador pKal pueden usarse para identificar trastornos asociados con una activación del sistema de contacto elevada. El cribado inicial puede venir seguido de un análisis *in vitro* o *in vivo* con inhibidores de calicreína plasmática (por ejemplo DX-88, EPIKAL2 o DX-2930), por ejemplo en modelos preclínicos de enfermedad. También puede usarse un marcador divulgado en el presente documento como biomarcador farmacodinámico o para supervisar de otra forma la respuesta de un sujeto a un inhibidor de calicreína. Un marcador divulgado en el presente documento puede utilizarse en un diagnóstico complementario para permitir el tratamiento de enfermedades mediadas por calicreína plasmática, controlar la dosificación durante el tratamiento preventivo de un trastorno mediado por pKal o mediado por bradiquinina, por ejemplo, HAE, angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemadura, lesión por isquemia/reperfusión cerebral, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis, trombosis arterial o venosa, trombosis asociada con dispositivos de asistencia ventricular o endoprótesis vasculares, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad espinal degenerativa, íleo postoperatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolismo pulmonar, apoplejía, traumatismo craneal o edema cerebral peritumoral, sepsis, evento isquémico de la arteria cerebral media (MCA) agudo (apoplejía), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con un plegamiento proteico incorrecto, una enfermedad asociada con angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (por ejemplo, anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, rinitis persistente) y lesiones hísticas (por ejemplo, lesión por quemadura o por producto químico).

La presente divulgación proporciona un procedimiento de evaluación o de tratamiento de un sujeto, en el que, por ejemplo, se distingue un trastorno mediado por pKal, por ejemplo angioedema mediado por bradiquinina, a partir de un trastorno mediado por histamina, o se predice un ataque futuro de un trastorno mediado por pKal, que comprende adquirir, por ejemplo determinar, el nivel de uno o más marcadores correlacionados con la activación de pKal (un marcador pKal), divulgado en el presente documento, por ejemplo, quinínogeno intacto, y quinínogeno escindido, evaluando o tratando, de esta forma, a dicho sujeto. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende adquirir, por ejemplo detectar, el nivel de uno o más marcadores correlacionados con una respuesta inflamatoria mediada por histamina (un marcador H), por ejemplo, tripsasa.

En algunas formas de realización, dicho trastorno mediado por pKal es HAE (angioedema hereditario), IAE (encefalopatía asociada a la gripe), IBD (enfermedad inflamatoria intestinal) o IBS (síndrome del intestino irritable). En algunas formas de realización, dicho trastorno mediado por pKal se selecciona de entre angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemadura, lesión por isquemia/reperfusión cerebral, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis, trombosis arterial o venosa, trombosis asociada con dispositivos de asistencia ventricular o endoprótesis vasculares, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad espinal degenerativa, íleo postoperatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolismo pulmonar, apoplejía, traumatismo craneal o edema cerebral peritumoral, sepsis, evento isquémico de la arteria cerebral media (MCA) agudo (apoplejía), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con un plegamiento proteico incorrecto, una enfermedad asociada con angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (por ejemplo, anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, rinitis persistente) y lesiones hísticas (por ejemplo, lesión por quemadura o por producto químico).

La presente divulgación también proporciona un procedimiento de evaluación o de tratamiento de un sujeto, presentando dicho sujeto un síntoma consecuente con un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, angioedema mediado por bradiquinina, y un trastorno relacionado con histamina, que comprende a) opcionalmente, determinar que dicho sujeto tiene un síntoma, por ejemplo edema o malestar abdominal, consecuente con uno de entre un trastorno mediado por pKal o un trastorno relacionado con histamina, o con ambos; b) si dicho sujeto no se ha tratado con un tratamiento antihistamínico para dicho síntoma, tratar entonces dicho sujeto con un tratamiento antihistamínico; c) adquirir, por ejemplo detectar, el nivel de uno o más marcadores correlacionados con la activación de pKal (un marcador pKal), por ejemplo, quinínogeno intacto y quinínogeno escindido; d) si dicho nivel cumple un determinado criterio, por ejemplo, si es igual o superior a un nivel de referencia: seleccionar al sujeto para el tratamiento inhibidor de la calicreína; o administrar un inhibidor de calicreína a dicho sujeto, evaluando o tratando, de esta forma, a dicho sujeto. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende seleccionar al sujeto para el tratamiento inhibidor de calicreína. En determinadas formas de realización, el procedimiento comprende administrar un inhibidor de calicreína a dicho sujeto. En formas de realización particulares, la selección de sujetos para el tratamiento inhibidor de calicreína; o la administración de un inhibidor de calicreína a dicho sujeto, tiene lugar antes de determinar que el sujeto no responde a dicho tratamiento antihistamínico, por ejemplo tiene lugar dentro de un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 horas de dicho tratamiento con un tratamiento antihistamínico. En algunas formas de realización, la determinación de que dicho sujeto tiene un síntoma consecuente con un trastorno mediado por pKal y un trastorno relacionado con histamina y la adquisición de una muestra de dicho paciente para determinar el nivel de un marcador pKal tiene lugar: dentro de un periodo de 30 minutos, 1, 2 o 3 horas una de otra, o en la misma visita a un centro de salud.

En algunas formas de realización, dicho inhibidor de pKal se selecciona de entre DX-88, DX-2930 o EpiKal-2.

En algunas formas de realización, el procedimiento comprende adquirir, por ejemplo, determinar, el nivel de uno o más marcadores correlacionados con una respuesta inflamatoria mediada por histamina (un marcador H). En determinadas formas de realización, dicho sujeto se evalúa para determinar su susceptibilidad a un trastorno mediado por pKal. En determinadas formas de realización, dicho sujeto presenta un síntoma de, por ejemplo edema, por ejemplo HAE. En determinadas formas de realización, dicho sujeto presenta un síntoma de un trastorno caracterizado por la activación no deseada de pKal y a dicho sujeto se le ha administrado un tratamiento antihistamínico. En formas de realización particulares, dicho tratamiento antihistamínico se administra dentro de un periodo de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8 o 10 horas antes o después de una etapa de determinación tal como se divulga en el presente documento. En formas de realización particulares, el procedimiento comprende además administrar un tratamiento antihistamínico a dicho sujeto, por ejemplo antes, después o durante la evaluación o las determinaciones tal como se divulgan en el presente documento.

En algunas formas de realización, en respuesta a dicha determinación o evaluación, se administra un inhibidor de calicreína a dicho sujeto. En determinadas formas de realización, dicho sujeto tiene uno o más o todos los síntomas o propiedades siguientes: ataques recurrentes de inflamación; inflamación, siendo dicha inflamación completamente o predominantemente periférica, por ejemplo, el sujeto no padece inflamación abdominal o de las vías respiratorias significativa; urticaria; enrojecimiento, dolor e inflamación en ausencia de evidencias de infección; no responde al tratamiento antihistamínico o con corticosteroides, o padece un edema no mediado por histamina. En determinadas formas de realización, dicho sujeto padece edema persistente o recurrente y no responde a uno de entre tratamiento antihistamínico y tratamiento con esteroides, o ambos. En determinadas formas de realización, el sujeto no tiene antecedentes de trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS; el sujeto tiene antecedentes de trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS, el sujeto no tiene antecedentes de HAE; el sujeto tiene antecedentes de HAE; el sujeto no tiene antecedentes de IAE; el sujeto tiene antecedentes de IAE; el sujeto no tiene antecedentes de IBD o IBS; el sujeto tiene antecedentes de IBD o IBS; el sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; el sujeto tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; el sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y no tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; o el sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria: el sujeto tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y no tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; o el sujeto tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria.

En algunas formas de realización, el sujeto se ha tratado con un inhibidor de calicreína, por ejemplo, en tratamiento preventivo, por ejemplo, contra HAE, y la respuesta del sujeto al inhibidor de calicreína se evalúa o se supervisa, y opcionalmente, en respuesta a dicha supervisión, se selecciona o se administra un tratamiento, por ejemplo en respuesta a la determinación se ajusta la dosificación del inhibidor de calicreína. En algunas formas de realización, se realiza la determinación de un marcador pKal en el contexto de un diagnóstico complementario, y opcionalmente, se proporciona o se deniega la administración de un producto terapéutico basándose en la determinación. En determinadas formas de realización, la respuesta a dicho tratamiento consiste en identificar un ataque agudo inminente, por ejemplo, un ataque de HAE o de IEA. En formas de realización particulares, dicho sujeto se evalúa para determinar su susceptibilidad a angioedema idiopático. En formas de realización particulares, dicha evaluación

comprende determinar si dicho sujeto padece un trastorno mediado por pKal, por ejemplo un trastorno mediado por bradiquinina, por ejemplo un angioedema mediado por pKal, o un trastorno mediado por histamina, por ejemplo una reacción alérgica alimentaria.

5 En algunas formas de realización, el sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo HAE o IAE. En algunas formas de realización, el sujeto tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo HAE o IAE. En algunas formas de realización, el sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS; el sujeto tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS, el sujeto no tiene antecedentes de HAE; el sujeto tiene antecedentes de HAE; el sujeto no  
10 tiene antecedentes de IAE; el sujeto tiene antecedentes de IAE; el sujeto no tiene antecedentes de IBD o IBS; el sujeto tiene antecedentes de IBD o IBS; el sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; el sujeto tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; el sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y no tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; o el  
15 sujeto no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria: el sujeto tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y no tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria; o el sujeto tiene antecedentes de un trastorno  
20 mediado por pKal, por ejemplo, HAE, IAE, IBD o IBS y tiene antecedentes de un trastorno mediado por histamina, por ejemplo, una alergia alimentaria.

En algunas formas de realización, se detecta un marcador pka, por ejemplo un marcador pKal divulgado en el presente documento, con un reactivo basado en anticuerpos. En determinadas formas de realización, un marcador pKal se detecta con un inmunoensayo de tipo sándwich. En determinadas formas de realización, el procedimiento  
25 comprende adquirir, por ejemplo detectar, el nivel de quinínogeno, por ejemplo un quinínogeno intacto o un quinínogeno escindido, o ambos, por ejemplo mediante un ensayo de separación electroforética, por ejemplo, un análisis de inmunotransferencia Western. En algunas formas de realización, se detecta un marcador pKal, por ejemplo, un quinínogeno, en un ensayo que consiste en la separación, por ejemplo la separación electroforética, por ejemplo por inmunotransferencia Western, del analito de otros productos.

30 En algunas formas de realización, un marcador pKal se detecta con un inmunoensayo de tipo sándwich y un segundo marcador pKal, por ejemplo, un quinínogeno, se detecta en un ensayo que consiste en la separación, por ejemplo la separación electroforética, por ejemplo por inmunotransferencia Western, del analito de otros productos. En determinadas formas de realización, la detección de un marcador pKal es cualitativa. En determinadas formas de  
35 realización, la detección de un marcador pKal es cuantitativa. En formas de realización particulares, se detecta cada uno de un nivel de quinínogeno intacto y de quinínogeno escindido.

En algunas formas de realización, el procedimiento comprende comparar el nivel de un marcador pKal, por ejemplo quinínogeno intacto o quinínogeno escindido, con un valor de referencia. En determinadas formas de realización, dicho valor de referencia es una función del nivel de dicho marcador pKal en un sujeto con HAE, por ejemplo en uno o más sujetos con HAE. En determinadas formas de realización, dicho valor de referencia es una función del nivel de dicho marcador pKal en un sujeto con HAE durante un ataque, por ejemplo, en uno o más sujetos con HAE durante un ataque. En determinadas formas de realización, dicho valor de referencia es una función del nivel de un marcador pKal en un sujeto con IAE, por ejemplo, en uno o más sujetos con IAE. En determinadas formas de realización, dicho valor de referencia es una función del nivel de dicho marcador pKal en un sujeto con IAE durante un ataque agudo, por ejemplo, en uno o más sujetos con IAE durante un ataque agudo. En determinadas formas de  
40 realización, dicho valor de referencia es una función del nivel de un marcador pKal en ausencia de HAE o IAE, por ejemplo, en uno o más sujetos que no tienen antecedentes de HAE o IAE.

50 En formas de realización particulares, el procedimiento comprende, por ejemplo, en respuesta a una comparación, clasificar el sujeto, por ejemplo clasificar el sujeto por riesgo de padecer un trastorno mediado por pKal, o administrar o denegar un tratamiento a dicho sujeto. En determinadas formas de realización, el procedimiento comprende, por ejemplo, en respuesta a una comparación, seleccionar un tratamiento para dicho sujeto. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende, por ejemplo, en respuesta a una comparación, administración o denegar  
55 un tratamiento a dicho sujeto, por ejemplo con un agente de unión a calicreína; un antagonista del receptor de bradiquinina B2 o un agente de reemplazo de C1-INH. En formas de realización particulares, dicho tratamiento es la administración de un inhibidor de pKal, por ejemplo un inhibidor de pKal seleccionado de entre DX-88; EpiKal-2 y DX-2930.

60 En algunas formas de realización, una muestra de dicho sujeto se pone en contacto con un sustrato que comprende un agente de captura para dos o más marcadores, por ejemplo de: un marcador pKal o un marcador H, por ejemplo un anticuerpo anti-marcaador H; opcionalmente, en el que por lo menos un agente de captura es un agente de captura para un marcador pKal.

65 En algunas formas de realización, el procedimiento comprende adquirir una muestra, por ejemplo una muestra de sangre o de plasma de dicho sujeto.

En algunas formas de realización, un primer agente de captura (para un primer marcador) y un segundo agente de captura (para un segundo marcador) se disponen sobre un sustrato de forma que puede distinguirse una señal para la presencia del primer marcador de una señal para la presencia del segundo marcador. En determinadas formas de realización, dicho primer agente de captura (para un primer marcador) se ubica en la primera ubicación o localización y dicho segundo agente de captura (para un segundo marcador) se ubica en una segunda ubicación o localización. En formas de realización particulares, dicha primera ubicación o localización y dicha segunda ubicación o localización no se solapan en dicho sustrato. En determinadas formas de realización, dicho primer agente de captura es para un primer marcador pKal. En determinadas formas de realización, dicho primer agente de captura es para un primer marcador pKal y dicho segundo agente de captura es para un segundo marcador pKal. En determinadas formas de realización, dicho primer agente de captura es para un marcador pKal y dicho segundo agente de captura es para un marcador H.

En determinadas formas de realización, el procedimiento comprende poner en contacto un sustrato con, por ejemplo, un anticuerpo detectable, para determinar la presencia o la cantidad de un marcador pKal. En determinadas formas de realización, dichos anticuerpos se marcan con un resto que produce un producto coloreado, emite un fotón, absorbe un fotón, altera un sustrato o altera la conductividad del sustrato. En determinadas formas de realización, dichos anticuerpos se marcan con un resto que utiliza electroquimioluminiscencia. En determinadas formas de realización, dichos anticuerpos se marcan con resinium. En formas de realización particulares, dicho sustrato se proporciona en un dispositivo de Meso Scale Discovery. En formas de realización particulares, dicho sustrato se proporciona como un dispositivo de varilla de inmersión, adecuado para su uso con sangre o plasma o con ambos. En formas de realización particulares, dicho primer agente de captura y dicho segundo agente de captura se disponen en una cámara común o conectada mediante fluido, por ejemplo una cámara, por ejemplo un pocillo o una depresión, en un dispositivo de varias cámaras, por ejemplo una placa de múltiples pocillos. En formas de realización particulares, dicho primer agente de captura y dicho segundo agente de captura están impresos sobre un sustrato.

En algunas formas de realización, dicho agente de captura para un primer marcador pKal se encuentra en una primera ubicación sobre dicho sustrato y dicho agente de captura para un segundo marcador pKal se encuentra en una segunda ubicación sobre dicho sustrato, y dichas primera y segunda ubicaciones se disponen sobre dicho sustrato de forma que una señal para la presencia del primer marcador pKal puede distinguirse de una señal para un segundo marcador pKal. En determinadas formas de realización, dicho sustrato comprende un agente de captura para un tercer marcador en una tercera ubicación, y la tercera ubicación se dispone sobre dicho sustrato de forma que una señal para la presencia del tercer marcador puede distinguirse de una señal para dichos primer y segundo marcadores.

En algunas formas de realización, puede realizarse la determinación del nivel de un marcador pKal en una muestra dentro de un periodo de 1, 2, 3, 4 o 5 horas de contacto del sustrato con dicha muestra. En algunas formas de realización, la determinación del nivel de dos marcadores pKal en una muestra puede realizarse dentro de un periodo de 1, 2, 3, 4 o 5 horas de contacto del sustrato con dicha muestra. En algunas formas de realización, la determinación del nivel de dos marcadores pKal se realiza en ensayos realizados simultáneamente, por ejemplo la incubación u otros intervalos para los ensayos se solapan uno o con otro.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un sustrato que comprende agentes de captura para una pluralidad de marcadores pKal, por ejemplo tal como se describen en el presente documento.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar si un trastorno es susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal que comprende: evaluar los niveles de uno o de una pluralidad de marcadores pKal, por ejemplo tal como se describen en el presente documento, en, por ejemplo, un sujeto que padece dicho trastorno, o un modelo animal para dicho trastorno, en comparación con el nivel determinado con una referencia, en el que un nivel que cumple un criterio predeterminado, por ejemplo, si es igual o superior a un nivel de referencia, es indicativo de un trastorno susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende evaluar el efecto de un inhibidor de calicreína, *in vitro* o *in vivo*, o en un modelo animal de dicho trastorno.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para tratar un sujeto que padece un trastorno mediado por pKal, por ejemplo un trastorno mediado por bradiquinina, que comprende evaluar el nivel de un marcador pKal descrito en el presente documento, por ejemplo, mediante un procedimiento descrito en el presente documento, determinar, y en respuesta a dicha evaluación, seleccionar un tratamiento, por ejemplo, seleccionar una de entre la cantidad de dosificación o la frecuencia de dosificación, o ambas, de un inhibidor de calicreína. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende administrar un inhibidor de calicreína a dicho sujeto. En algunas formas de realización, se ha administrado a dicho paciente un inhibidor de calicreína antes de dicha evaluación. En determinadas formas de realización, el procedimiento comprende administrar un inhibidor de calicreína en dicha dosificación o frecuencia seleccionada.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para determinar si un trastorno es susceptible

de tratamiento con un inhibidor de pKal que comprende: evaluar los niveles de uno o de una pluralidad de marcadores pKal, por ejemplo, tal como se describen en el presente documento, en, por ejemplo, un sujeto que padece dicho trastorno, o un modelo animal para dicho trastorno, en comparación con el nivel determinado con una referencia, en el que un nivel que cumple un criterio predeterminado, por ejemplo, si es igual o superior a un nivel de referencia, es indicativo de un trastorno susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal. En algunas formas de realización, el procedimiento comprende evaluar el efecto de un inhibidor de calicreína, *in vitro* o *in vivo*, o en un modelo animal de dicho trastorno.

En otro aspecto la divulgación presenta procedimientos y dispositivos para la recogida de una muestra, por ejemplo sangre, con una activación de contacto mínima. En una forma de realización, la divulgación presenta un recipiente, que tiene dispuesto en el mismo un reactivo de captura descrito en el presente documento, por ejemplo un inhibidor de calicreína, por ejemplo un polipéptido que es similar en secuencia a DX-88, por ejemplo uno que difiere de DX-88 en no más de 1, 2 o 5 residuos de aminoácidos, EPIKAL-2. El recipiente se configura, por ejemplo, con una apertura, una abertura, un tabique, etc., de forma que permita la recogida de una muestra, por ejemplo sangre, de un sujeto y la unión de un marcador relacionado con pKal en la muestra, por ejemplo pKal, con el reactivo de captura, en el mismo recipiente. Puede llevarse a cabo una medición de las especies unidas, por ejemplo pKal, en el mismo recipiente o en formas de realización, el sustrato se retira del recipiente anterior para su medición, por ejemplo, la medición puede realizarse en otro o sobre otro dispositivo. En formas de realización, el volumen del recipiente es de 0,5-100, 0,5-50, 0,5-10, 1-100, 1-50, 1-25 ml. En una forma de realización, el reactivo de captura, por ejemplo, un reactivo de captura de pKal, se dispone en la superficie interior del recipiente. El reactivo de captura puede acoplarse a la superficie con un primer asociado de unión específico unido a la superficie y un segundo asociado de unión específico acoplado al reactivo de captura. Los ejemplos de asociados de unión específico son biotina y avidina. En una forma de realización, el reactivo de captura biotinilado, por ejemplo, un reactivo de captura de pKal, por ejemplo, un inhibidor de calicreína, por ejemplo, un polipéptido que es similar en secuencia a DX-88, por ejemplo uno que difiere de DX-88 en no más de 1, 2 o 5 residuos de aminoácidos, por ejemplo, Epikal-2, se dispone sobre una superficie del recipiente que está recubierta con avidina.

La presente divulgación proporciona biomarcadores capaces de identificar pacientes con angioedema mediado por calicreína plasmática (KMA), u otras enfermedades mediadas por pKal útiles en la evaluación y el tratamiento.

Los pacientes que se mostró que presentaban activación de pKal por medio de un biomarcador son candidatos para el tratamiento con un inhibidor de pKal, tal como DX-88, un inhibidor de proteína pequeña de pKal aprobado para el tratamiento de ataques edematosos agudos asociados a HAE. Otros inhibidores de pKal incluyen DX-2930, que es un inhibidor de anticuerpo totalmente humano. En algunas formas de realización, los pacientes que se mostró que presentaban la activación de pKal a través de un biomarcador son candidatos para el tratamiento con un antagonista del receptor de bradiquinina B2, por ejemplo, incatibant (Firazyr®). En algunas formas de realización, los pacientes que se mostró que presentaban activación de pKal a través de un biomarcador son candidatos para el tratamiento con un agente de reemplazo de C1-INH, por ejemplo un concentrado de C1-INH nanofiltrado pasteurizado humano purificado (Berinert®).

Algunas formas de realización de la divulgación proporcionan un biomarcador y el uso del mismo en la identificación y el tratamiento de pacientes, por ejemplo de pacientes que padecen un edema provocado por bradiquinina que se ha generado mediante calicreína plasmática. Los procedimientos, las composiciones y los dispositivos divulgados por el presente documento son útiles en una serie de maneras. Por ejemplo, los niveles de un marcador pKal pueden usarse para identificar trastornos asociados con una activación del sistema de contacto elevada. El cribado inicial puede venir seguido de un análisis *in vitro* o *in vivo* con inhibidores de calicreína plasmática (por ejemplo, DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930), por ejemplo en modelos preclínicos de enfermedad. También puede usarse un marcador divulgado en el presente documento como biomarcador farmacodinámico o para supervisar de otra forma la respuesta de un sujeto a un inhibidor de calicreína. Un marcador divulgado en el presente documento puede usarse en un diagnóstico complementario para permitir el tratamiento de enfermedades mediadas por calicreína plasmática, gestionar la dosificación durante el tratamiento preventivo de HAE o identificar un ataque de HAE agudo inminente.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 es una descripción de elementos implicados en la activación del sistema de contacto de calicreína plasmática.

La figura 2 muestra la detección de quinínogeno escindido mediante análisis por inmunotransferencia Western. Las muestras se analizaron usando SDS-PAGE (tris-acetato al 3-8 %) en condiciones reductoras, operación seguida de transferencia a membrana PVDF e inmunotransferencia. Carril 1: quinínogeno intacto 50 nM; Carril 2: quinínogeno escindido 50 nM; Carril 3: quinínogeno de bajo peso molecular 50 nM; Carril 4: 1:20 Plasma humano con citrato de sodio (tubo de recogida de vidrio); Carril 5: 1:20 Plasma humano con citrato de sodio (plástico) tratado con calicreína; Carril 6: 1:20 Plasma humano con citrato de sodio (plástico); Carril 7: 1:20 Plasma humano con citrato de sodio (plástico) al que se ha añadido quinínogeno bicatenario 20 nM.

La figura 3 muestra la detección de quinínogeno intacto (es decir, monocatenario) en una muestra de paciente

obtenida durante un ataque. La muestra de plasma de paciente se recogió en tubos de plasma con citrato que contenían un cóctel de antiproteasas.

5 La figura 4 muestra un esquema de la estructura del dominio de HMWK monocatenario y HMWK bicatenario tras la escisión por pKal y una inmunotransferencia Western para detectar HMWK monocatenario y bicatenario utilizando un anticuerpo que se une a la cadena ligera de quinínogeno escindido. C1 = HMWK monocatenario, C2 = HMWK bicatenario, G = vidrio, P= plástico.

10 La figura 5 muestra la detección LI-COR de HMWK purificado como un ensayo semicuantitativo. Se valoraron HMWK humano purificado y HMWK escindido desde 9 0 µg/ml a 5,6 µg/ml en plasma humano deficiente en HMWK. Las muestras se diluyeron 1:20 en TBS y tampón de carga de muestra (con DTT). Las muestras diluidas se procesaron sobre un gel de bis-tris al 4-12 % y, después de la electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Después del bloqueo, la mancha se visualizó utilizando un anticuerpo anti-HMWK humano de ratón (clon N° 11H05), que es específico de la cadena ligera de HMWK, y un IRDye 680 antirratón de cabra. Se realizó un barrido sobre los geles utilizando el detector IR de LI-COR Odyssey, que es capaz de detectar la señal de excitación de IRDye 680.

20 La figura 6 muestra una inmunotransferencia Western y un análisis LI-COR de una muestra de paciente con HAE y demuestra que las muestras de paciente con HAE muestran niveles endógenos más elevados de HMWK escindido. El plasma de paciente con HAE tanto basal como de ataque tenía porcentajes más elevados de HMWK escindido en comparación con plasma de un estado no de enfermedad mediante análisis Li-cor. Las muestras de plasma analizadas se recogieron en una solución de antiproteasa que, en comparación con muestras de plasma con citrato de sodio de los mismos pacientes en el mismo momento de la recogida, protegió el plasma del paciente con HAE de una activación de contacto adicional. Las barras de error en el gráfico representan la desviación típica.

25 La figura 7 muestra una inmunotransferencia Western y un gráfico que representa la evaluación de condiciones de activación por FXIIa. Figura 7A: inmunotransferencia Western y detección por Li-cor de plasma humano normal activado con diferentes concentraciones de FXIIa a diferentes temperaturas (hielo frente a 37 °C) y tiempos de incubación (10 frente a 30 minutos). Carril 1: marcadores de peso molecular; Carril 2: HMWK monocatenario y bicatenario purificado; Carril 3: plasma humano normal; Carril 4: plasma humano normal + FXIIa 2,5 nM durante 10 minutos a 37°C; Carril 5: plasma humano normal + FXIIa 2,5 nM durante 30 minutos a 37°C; Carril 6: plasma humano normal + FXIIa 2,5 nM durante 10 minutos en hielo; Carril 7: plasma humano normal + FXIIa 2,5 nM durante 30 minutos en hielo; Carril 8: plasma humano normal + FXIIa 5 nM durante 10 minutos a 37°C; Carril 9: plasma humano normal + FXIIa 5 nM durante 30 minutos a 37°C; Carril 10: plasma humano normal + FXIIa 5 nM durante 10 minutos en hielo; Carril 11: plasma humano normal + FXIIa 5 nM durante 30 minutos en hielo; Carril 12: plasma humano normal + FXIIa 7,5 nM durante 10 minutos a 37°C; Carril 13: plasma humano normal + FXIIa 7,5 nM durante 30 minutos a 37°C; Carril 14: plasma humano normal + FXIIa 7,5 nM durante 10 minutos en hielo; Carril 15: plasma humano normal + FXIIa 7,5 nM durante 30 minutos en hielo. Figura 7B: Porcentaje de HMWK bicatenario en cada carril determinado usando intensidades de señal Li-cor [% de HMWK bicatenario = (señal de 46 kDa + señal de 56 kDa)/(señal de 46 kDa + señal de 56 kDa + señal de 110 kDa)].

45 La figura 8 muestra una inmunotransferencia Western y un gráfico que representa los efectos inhibidores de DX-88 y DX-2930 sobre la activación por FXIIa de la actividad de pKal. Figura 8A: Análisis por inmunotransferencia Western que representa que la ecalantida y DX-2930 inhiben la escisión de HMWK por pKAL cuando se añaden a plasma humano *ex vivo*. Figura 8B: un diagrama que muestra los efectos de DX-88 y DX-2930 sobre la producción de HMWK escindido en presencia de FXIIa. El plasma humano con citrato de sodio reunido se pretrató con DX-2930 o ecalantida a concentraciones que varían de 1370 a 34,3 nM. Todas las muestras (incluida una muestra no tratada) se activaron mediante la adición de FXIIa 2,5 nM. Las enzimas se inhibieron después mediante la adición de un cóctel inhibidor de proteasas. Concentraciones molares iguales de ecalantida y DX-2930 reducen la cantidad de HMWK escindido de forma equivalente en plasma humano reunido en comparación con la muestra de plasma no tratada. C = HMWK monocatenario y bicatenario 25 nM; N = plasma normal; + = plasma humano activado (sin fármaco).

55 La figura 9 muestra un análisis de inmunotransferencia Western de activación del sistema de contacto en pacientes con colitis ulcerosa (UC) y artritis reumatoide (RA). Carril 1: marcadores de peso molecular; Carril 2: HMWK monocatenario y bicatenario purificado; Carriles 3 a 5: plasma humano normal; Carriles 6 a 10: plasma de pacientes con UC; Carriles 11 a 15: plasma de pacientes con RA. En la tabla 3 se proporcionan detalles adicionales con respecto a las muestras de cada carril.

60 La figura 10 muestra un análisis por inmunotransferencia Western de la activación del sistema de contacto en pacientes con enfermedad de Crohn (CD). Carril 1: marcadores de peso molecular; Carril 2: HMWK monocatenario y bicatenario purificado; Carriles 3 a 5: plasma humano normal; Carriles 6 a 10: plasma de pacientes con CD. En la tabla 4 se proporcionan detalles adicionales con respecto a las muestras de cada carril.

65 **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

**Definiciones**

Por conveniencia, antes de la descripción adicional de la presente invención, se definen a continuación determinados términos empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. Otros términos se definen cuando aparezcan en la memoria descriptiva.

Las formas del singular "un", "uno/a" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, "adquiere" o "adquirir" se refiere a obtener la posesión de una entidad física, o un valor, por ejemplo un valor numérico, "adquiriendo directamente" o "adquiriendo indirectamente" la entidad física o el valor. "Adquirir directamente" significa realizar un proceso (por ejemplo realizar un ensayo o prueba sobre una muestra o "analizar una muestra" tal como se define la expresión en el presente documento) para obtener la entidad física o el valor. "Adquirir indirectamente" se refiere a recibir la entidad física o el valor de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de una tercera parte que adquiere directamente la entidad física o el valor). Adquirir directamente una entidad física incluye realizar un proceso, por ejemplo analizar una muestra, que incluye un cambio físico en una sustancia física, por ejemplo un material de partida. Los cambios ejemplares incluyen producir una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, someter a cizallamiento o fragmentar una sustancia, separar o purificar la sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una muestra, realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. Adquirir directamente un valor incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, por ejemplo una muestra, un analito o un reactivo (a veces denominado en el presente documento "análisis físico"), realizar un procedimiento analítico, por ejemplo un procedimiento que incluye uno o varios de los siguientes: separar o purificar una sustancia, por ejemplo un analito, o un fragmento u otro derivado de la misma, de otra sustancia; combinar un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, por ejemplo un tampón, un disolvente o un reactante; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo, rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiar la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

Tal como se usa en el presente documento, "analizar" una muestra incluye realizar un proceso que implica un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo un material de partida. Los cambios ejemplares incluyen producir una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, someter a cizallamiento o fragmentar una sustancia, separar o purificar la sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una muestra, realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. Analizar una muestra puede incluir realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, por ejemplo una muestra, un analito o un reactivo (a veces denominado en el presente documento "análisis físico"), realizar un procedimiento analítico, por ejemplo un procedimiento que incluya uno o más de lo siguiente: separar o purificar una sustancia, por ejemplo un analito, o un fragmento u otro derivado de la misma, de otra sustancia; combinar un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, por ejemplo un tampón, un disolvente o un reactante; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo, rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiar la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado del mismo, por ejemplo rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

El término "agonista", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente que imita o regula al alza (por ejemplo potencia o complementa) la bioactividad de una proteína. Un agonista puede ser una proteína de tipo silvestre o un derivado de la misma que tenga por lo menos una bioactividad de la proteína de tipo silvestre. Un agonista también puede ser un compuesto que aumenta por lo menos una bioactividad de una proteína. Un agonista también puede ser un compuesto que aumenta la interacción de un polipéptido con otra molécula, por ejemplo un péptido diana o un ácido nucleico.

El término "antagonista", tal como se usa en el presente documento, se pretende que se refiera a un agente que regula a la baja (por ejemplo suprime o inhibe) por lo menos una bioactividad de una proteína. Un antagonista puede ser un compuesto que inhibe o reduce la interacción entre una proteína y otra molécula, por ejemplo un péptido diana o un sustrato enzimático. Un antagonista puede ser también un compuesto que reduce o inhibe la cantidad de proteína expresada presente. Normalmente, inhibir una proteína o un gen se refiere a reducir la expresión o una actividad relevante de la proteína o el gen en por lo menos el 10 % o más, por ejemplo el 20 %, 30 %, 40 %, o el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, o producir una reducción en la expresión o la actividad relevante superior a 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o más medida mediante uno o varios procedimientos descritos en el presente documento o reconocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o  $K_a$ . La  $K_a$  es la inversa de la constante de disociación ( $K_d$ ). Una proteína de unión puede tener, por ejemplo, una afinidad de unión de por lo menos  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  y  $10^{11}$   $M^{-1}$  para una molécula diana particular. La

mayor afinidad de unión de una proteína de unión a una primera diana con respecto a una segunda diana puede venir indicada por una  $K_a$  superior (o un valor numérico más pequeño de  $K_d$ ) para la unión a la primera diana que la  $K_a$  (o el valor numérico de  $K_d$ ) para la unión a la segunda diana. En dichos casos, la proteína de unión tiene especificidad por la primera diana (por ejemplo una proteína en una primera conformación o imitadora de la misma) con respecto a la segunda diana (por ejemplo la misma proteína en una segunda conformación o imitadora de la misma; o una segunda proteína). Las diferencias en la afinidad de unión (por ejemplo, para la especificidad u otras comparaciones) pueden ser por lo menos de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000 o  $10^5$  veces.

La afinidad de unión puede determinarse mediante una diversidad de procedimientos que incluyen diálisis en equilibrio, unión en equilibrio, filtración en gel, ELISA, resonancia de plasmón superficial o espectroscopía (por ejemplo usando un ensayo de fluorescencia). Las condiciones ejemplares para la evaluación de la afinidad de unión son en tampón TRIS (TRIS 50 mM, NaCl 150 mM,  $\text{CaCl}_2$  5 mM, a un pH de 7,5). Estas técnicas pueden usarse para medir la concentración de proteína de unión unida y libre en función de la concentración de la proteína de unión (o diana). La concentración de la proteína de unión unida ([Unida]) se refiere a la concentración de la proteína de unión libre ([Libre]) y la concentración de sitios de unión para la proteína de unión en la diana en la que (N) es el número de sitios de unión por molécula diana mediante la ecuación siguiente:

$$[\text{Unida}] = N [\text{Libre}] / ((1/K_a) + [\text{Libre}]).$$

No siempre es necesario realizar una determinación exacta de  $K_a$ , aunque, dado que a veces es suficiente obtener una medición cuantitativa de la afinidad, por ejemplo determinada usando un procedimiento tal como ELISA o análisis FACS, que es proporcional a  $K_a$ , y por lo tanto puede usarse para comparaciones, tal como la determinación de si una afinidad superior es, por ejemplo, 2 veces superior, para obtener una medida cualitativa de la afinidad, u obtener una inferencia de afinidad, por ejemplo, mediante la actividad en un ensayo funcional, por ejemplo un ensayo *in vitro* o *in vivo*.

La expresión "proteína de unión" se refiere a una proteína que puede interactuar con una molécula diana. Esta expresión se usa de forma indistintamente con el término "ligando". Una "proteína de unión a calicreína plasmática" se refiere a una proteína que puede interactuar con (por ejemplo, unirse a) calicreína plasmática, e incluye, en particular, proteínas que preferentemente o específicamente interactúan con y/o inhiben calicreína plasmática. Una proteína inhibe la calicreína plasmática si provoca una reducción de la actividad de la calicreína plasmática en comparación con la actividad de la calicreína plasmática en ausencia de la proteína y en las mismas condiciones. En algunas formas de realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo.

La expresión "reactivo de captura" se refiere a un resto que se une específicamente a su ligando.

Tal como se usan en el presente documento, el término "complejo" o la expresión "formación de complejo" se refieren a un complejo entre asociados que tienen una afinidad específica uno por otro.

Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido está reemplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Las secuencias de motivos para biopolímeros pueden incluir posiciones que pueden ser aminoácidos variados. Por ejemplo, el símbolo "X" en dicho contexto se refiere generalmente a cualquier aminoácido (por ejemplo, cualquiera de los veinte aminoácidos naturales) a menos que se indique lo contrario, por ejemplo, se refiere a cualquier aminoácido que no sea cisteína. Otros aminoácidos permitidos también pueden indicarse, por ejemplo, usando paréntesis y barras oblicuas. Por ejemplo, "(A/W/F/N/Q)" significa que la alanina, el triptofano, la fenilalanina, la asparagina y la glutamina están permitidos en esa posición particular.

Tal como se usa en el presente documento, un "reactivo de detección" se refiere a un resto que se une al resto que se va a detectar. Normalmente genera una señal, por ejemplo, fluorescencia, o produce un compuesto que puede medirse.

Un "epítotope" se refiere al sitio en un compuesto diana la que se une una proteína de unión (por ejemplo un anticuerpo tal como un Fab o un anticuerpo de longitud completa). En el caso en el que el compuesto diana sea una proteína, el sitio puede estar compuesto totalmente por componentes aminoacídicos, estar compuesto totalmente por modificaciones químicas de aminoácidos de la proteína (por ejemplo, restos glicosilo) o estar compuesto por combinaciones de los mismos. Los epítotos que se solapan incluyen por lo menos un residuo de aminoácido común, un grupo glicosilo, un grupo fosfato, un grupo sulfato u otra característica molecular.

Una primera proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) "se une al mismo epítoto" que una segunda proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) si la primera proteína de unión se une al mismo sitio de un compuesto diana al que se une la segunda proteína de unión, o se une a un sitio que se solapa (por ejemplo se solapa el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, por ejemplo, en términos de secuencia de aminoácidos u otra característica molecular (por ejemplo grupo glicosilo, grupos fosfato o grupo sulfato)), con el sitio al que se une la segunda proteína de unión.

Una primera proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo) "compite por la unión" con una segunda proteína de unión (por ejemplo un anticuerpo) si la unión de la primera proteína de unión reduce (por ejemplo un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o más) la cantidad de la segunda proteína de unión que se une a su epítoto. La competencia puede ser directa (por ejemplo, la primera proteína de unión se une a un epítoto que es el mismo que, o que se solapa con, el epítoto unido a la segunda proteína de unión), o indirectamente (por ejemplo, la unión de la primera proteína de unión a su epítoto causa un cambio estérico en el compuesto diana que reduce la capacidad de la segunda proteína de unión para unirse a su epítoto).

Tal como se usa en el presente documento, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma que muestra una propiedad y/o una actividad por la que se caracteriza.

Los cálculos de "homología" o de "identidad de secuencia" entre dos secuencias (los términos se usan en el presente documento indistintamente) se llevan a cabo como sigue. Las secuencias se alinean con fines de una comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo y secuencias no homólogas pueden no tomarse en cuenta para propósitos de comparación). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación usando el programa GAP en el paquete informático GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de hueco de 12, una penalización de hueco extendido de 4 y una penalización de hueco de desplazamiento de marco de 5. A continuación, los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o por el mismo nucleótido según la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se usa en el presente documento "identidad" de aminoácidos o de ácidos nucleicos es equivalente a "homología" de aminoácidos o de ácidos nucleicos). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

En una forma de realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada con propósitos de comparación es por lo menos el 30 %, preferentemente por lo menos el 40 %, de forma más preferida por lo menos el 50 %, de forma incluso más preferida por lo menos el 60 % y de forma incluso más preferida por lo menos el 70 %, 80 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 % o 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia de referencia puede ser la longitud de la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina.

Tal como se usa en el presente documento "se hibrida en condiciones de bajo rigor, de rigor medio, de alto rigor o de muy alto rigor" describe condiciones para la hibridación y el lavado. Pueden encontrarse directrices para la realización de reacciones de hibridación en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Se describen procedimientos acuosos y no acuosos en dicha referencia y pueden usarse cualquiera de los mismos. Las condiciones de hibridación específicas a las que se hace referencia en el presente documento son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de bajo rigor en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45 °C, seguido de dos lavados con 0,2X SSC, 0,1 % de SDS por lo menos a 50 °C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55 °C para condiciones de bajo rigor); (2) condiciones de hibridación de rigor medio en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados con 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 60 °C; (3) condiciones de hibridación de alto rigor en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguido de uno o más lavados con 0,2X SSC, 0,1 % de SDS a 65 °C; y (4) condiciones de hibridación de muy alto rigor en fosfato de sodio 0,5 M, 7 % de SDS a 65 °C, seguido de uno o más lavados en 0,2X SSC, 1 % de SDS a 65 °C. Las condiciones de muy alto rigor (4) son las condiciones preferidas y las que deberían usarse a menos que se indique lo contrario. La divulgación incluye ácidos nucleicos que se hibridan con bajo, medio, alto o muy alto rigor a un ácido nucleico descrito en el presente documento o a un complemento del mismo, por ejemplo ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión descritos en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden tener la misma longitud o una longitud dentro del 30, 20 o 10 % de la longitud del ácido nucleico de referencia. El ácido nucleico puede corresponder a una región que codifica una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina descrita en el presente documento.

Una "composición aislada" se refiere a una composición en la que se ha eliminado por lo menos el 90 % de por lo menos un componente de una muestra natural a partir de la que se puede obtener la composición aislada. Las composiciones producidas artificialmente o de forma natural pueden ser "composiciones de por lo menos" un determinado grado de pureza si la especie o la población de especies de interés es por lo menos el 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99 % pura sobre la base de peso-peso.

Tal como se usa en el presente documento, "in vitro" se refiere a eventos que tienen lugar en un entorno artificial,

por ejemplo en un tubo de ensayo o un recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., más que dentro de un organismo multicelular.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "in vivo" se refiere a eventos que tienen lugar dentro de un organismo multicelular tales como un animal humano o no humano.

10 Una "composición aislada" se refiere a una composición a la que se ha eliminado por lo menos el 90 % de por lo menos un componente de una muestra natural a partir de la que se puede obtener la composición aislada. Las composiciones producidas artificialmente o de forma natural pueden ser "composiciones de por lo menos" un determinado grado de pureza si la especie o la población de especies de interés es por lo menos el 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99 % pura sobre la base de peso-peso.

15 Una proteína "aislada" se refiere a una proteína a la que se ha eliminado por lo menos el 90 % de por lo menos un componente de una muestra natural a partir de la que se puede obtener la proteína aislada. Las proteínas pueden ser "de por lo menos" un determinado grado de pureza si la especie o la población de especies de interés es por lo menos el 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99 % pura sobre la base de peso-peso.

20 El término "calicreína" (por ejemplo, calicreína plasmática) se refiere a peptidasas (enzimas que escinden enlaces peptídicos en proteínas), un subgrupo de la familia de la serina proteasa. La calicreína plasmática escinde quinínogeno para generar quininas, péptidos proinflamatorios potentes.

25 La expresión "inhibidor de calicreína" se refiere a cualquier agente o molécula que inhiba la calicreína. Por ejemplo, el DX-88 (también denominado en el presente documento "PEP-1") es un inhibidor específico potente ( $K_i < 1 \text{ nM}$ ) de calicreína plasmática (NP\_000883). (Véanse también, por ejemplo, los documentos WO 95/21601 o WO 2003/103475).

Tal como se usa en el presente documento el término "DX-2922" se usa indistintamente que el término "X101-A01". A continuación se describen otras variantes de este anticuerpo.

Identificación del anticuerpo	Descripción
X63-G06	Fab de línea no germinal descubierto usando ROLIC, misma HC pero diferente LC que M160-G12
X81-B01	IgG de línea germinal producido en células HEK 293T
X101-A01	IgG de línea germinal producido en células CHO, misma secuencia de HC y de LC que X81-B01
DX-2922	Nomenclatura alternativa para X101-A01

30 Tal como se usa en el presente documento el término "DX-2930" se usa indistintamente que el término "X124-G01". A continuación se describen otras variantes de este anticuerpo.

Identificación del anticuerpo	Descripción
M162-A04	Fab de línea no germinal descubierto usando presentación en fagos
M199-A08	Fab con CDR3 de cadena pesada variada derivado por maduración de afinidad de M162-A04
X115-F02	Fab de línea germinal producido en células 293T, misma cadena pesada variable que X124-G01
X124-G01 o DX-2930	IgG de línea germinal producida en células CHO, secuencia de LC y HC igual que X115-F02 excepto que la Lys C-terminal de la HC está eliminada en X124-G01 (también conocido como DX-2930).

35 El término "modulador" se refiere a un polipéptido, ácido nucleico, macromolécula, complejo, molécula, molécula pequeña, compuesto, especie o similar (de origen natural o no natural), o un extracto realizado a partir de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células o tejidos animales, que pueden ser capaces de causar una modulación. Los moduladores pueden evaluarse para determinar su actividad potencial como inhibidores o activadores (directamente o indirectamente) de una propiedad funcional, actividad o proceso biológico, o combinación de las mismas (por ejemplo, agonista, antagonista parcial, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, agentes antimicrobianos, inhibidores de la infección o la proliferación microbiana y similares) mediante su inclusión en ensayos. En dichos ensayos, muchos moduladores pueden cribarse a la vez. La actividad de un modular puede ser conocida, desconocida o parcialmente conocida.

Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede alterarse a partir de la secuencia de tipo silvestre del agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, sin abolir o, de forma más preferida, sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que el cambio de un residuo de aminoácido "esencial" da como resultado una pérdida sustancial de actividad.

Un "paciente", "sujeto" o "huésped" (estos términos se usan indistintamente) que se va a tratar mediante el procedimiento objeto puede significar un animal humano o no humano. En algunas formas de realización, un sujeto es sospechoso de padecer, o está en riesgo de padecer, o padece un trastorno mediado por calicreína, por ejemplo un trastorno mediado por bradiquinina, por ejemplo angioedema hereditario (HAE). En algunas formas de realización, un sujeto está en riesgo de padecer o padece angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemadura, lesión por isquemia/reperfusión cerebral, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis, trombosis arterial o venosa, trombosis asociada con dispositivos de asistencia ventricular o endoprótesis vasculares, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad espinal degenerativa, ileo postoperatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolismo pulmonar, apoplejía, traumatismo craneal o edema cerebral peritumoral, sepsis, evento isquémico de la arteria cerebral media (MCA) agudo (apoplejía), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con un plegamiento proteico incorrecto, una enfermedad asociada con angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (por ejemplo, anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, rinitis persistente) y lesiones hísticas (por ejemplo, lesión por quemadura o por producto químico).

El término "precalicreína" y la expresión "precalicreína plasmática" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la forma zimógena de calicreína plasmática activa, que también es conocida como precalicreína.

El término "prevenir" o "previene" una enfermedad en un sujeto se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo a la administración de un fármaco, de forma que se prevenga por lo menos un síntoma de la enfermedad, es decir, se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, una enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) de forma que proteja al huésped frente al desarrollo de la afección no deseada. "Prevención" de una enfermedad también puede denominarse "profilaxis" o "tratamiento preventivo".

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente idéntica" (o "sustancialmente homóloga") se usa en el presente documento para referirse a una primera secuencia de aminoácido o de ácido nucleico que contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadas) a una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de forma que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos presentan (o codifican proteínas que presentan) actividades similares, por ejemplo, una actividad de unión, una preferencia de unión o una actividad biológica. En el caso de anticuerpos, el segundo anticuerpo presenta la misma especificidad y presenta por lo menos el 50 %, por lo menos el 25 % o por lo menos el 10 % de la afinidad con respecto al mismo antígeno.

Las secuencias similares u homólogas (por ejemplo, por lo menos aproximadamente el 85 % de identidad de secuencia) a las secuencias divulgadas en el presente documento son también parte de la presente solicitud. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o superior.

Además, existe identidad sustancial cuando los segmentos de ácidos nucleicos se hibridan en condiciones de hibridación selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridación muy rigurosas) al complemento de la cadena. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

Las secuencias de motivos para biopolímeros pueden incluir posiciones que pueden ser aminoácidos variados. Por ejemplo, el símbolo "X" en dicho contexto se refiere generalmente a cualquier aminoácido (por ejemplo, cualquiera de los veinte aminoácidos naturales) a menos que se indique lo contrario, por ejemplo, se refiere a cualquier aminoácido que no sea cisteína. Otros aminoácidos permitidos también pueden indicarse, por ejemplo, usando paréntesis y barras oblicuas. Por ejemplo, "(A/W/F/N/Q)" significa que la alanina, el triptofano, la fenilalanina, la asparagina y la glutamina están permitidos en esa posición particular.

La significancia estadística puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Los ensayos estadísticos ejemplares incluyen: el ensayo en T de Students, el ensayo no paramétrico en U de Mann

Whitney y el ensayo estadístico no paramétrico de Wilcoxon. Algunas relaciones estadísticamente significativas tienen un valor de P inferior a 0,05 o 0,02. Los términos "induce", "inhibe", "potencia", "eleva", "aumenta", "reduce" o similares, por ejemplo que denotan diferencias cualitativas o cuantitativas distinguibles entre dos estados, pueden referirse a una diferencia, por ejemplo, una diferencia estadísticamente significativa, entre dos estados.

Tal como se use en el presente documento, una "muestra" se refiere a una composición que comprende tejido, por ejemplo sangre, plasma o proteína, de un sujeto. Una muestra incluye tanto una muestra sin procesar inicial tomada de un sujeto, así como formas procesadas subsiguientemente, por ejemplo parcialmente purificadas o conservadas. Las muestras ejemplares incluyen sangre, plasma, lágrimas o mucosidad. En algunas formas de realización, la muestra es una muestra de sangre o de plasma.

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" preferentemente modula un parámetro que puede medirse, por ejemplo, la actividad de calicreína plasmática, en un grado estadísticamente significativo o en por lo menos aproximadamente el 20 %, de forma más preferida en por lo menos aproximadamente el 40 %, de forma incluso más preferida en por lo menos aproximadamente el 60 % y de forma aún más preferida en por lo menos aproximadamente el 80 % con respecto a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para modular un parámetro que puede medirse, por ejemplo un parámetro asociado a una enfermedad, puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en afecciones y trastornos humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para modular un parámetro *in vitro*.

"Tratar" una enfermedad (o afección) en un sujeto o "tratar" un sujeto que padece una enfermedad se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo, la administración de un fármaco, de forma que por lo menos un síntoma de la enfermedad se cure, se alivie o se reduzca.

El término "prevenir" una enfermedad en un sujeto se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, por ejemplo la administración de un fármaco, de forma que se prevenga por lo menos un síntoma de la enfermedad, es decir, se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (por ejemplo, una enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) de forma que proteja al huésped frente al desarrollo de la afección no deseada. "Prevención" de una enfermedad también puede denominarse "profilaxis" o "tratamiento preventivo".

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, en dosificaciones y durante periodos necesarios, para lograr el resultado de prevención deseado. Normalmente, debido a que se usa una dosis de prevención en los sujetos antes, o en un estado temprano, de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

Los encabezados, incluidos encabezados alfabéticos y numéricos, son meramente para facilitar el entendimiento y la lectura y, en ausencia de indicación expresa de lo contrario, no impone orden temporal o una jerarquía de preferencias.

#### **Detección de HMWK escindido e intacto**

La calicreína plasmática circula como un zimógeno inactivo denominado precalicreína que está en su mayor parte unido a su sustrato, quinínogeno de alto peso molecular (HMWK). En respuesta a un estímulo, el FXII se activa dando FXIIa. El FXIIa escinde la precalicreína para formar calicreína plasmática activa (figura 1). Aproximadamente el 75-90 % de la precalicreína en circulación está unida a HMWK a través de una interacción de sitio no activo con el dominio 6 de HMWK. La pKal activa libre y unida a HMWK genera HMWK escindido y bradiquinina. Los biomarcadores de la activación de calicreína plasmática se muestran en la tabla 2. La adecuabilidad de un biomarcador puede demostrarse siguiendo sus niveles en presencia y en ausencia de un ataque agudo de HAE. Los niveles de estos biomarcadores podrían también alterarse durante un ataque de edema mediado por bradiquinina u otras enfermedades mediadas por la actividad de pKal. Véase la tabla 2.

**Tabla 2. Biomarcadores asociados con KMA**

5 La tabla 2 proporciona marcadores que pueden evaluarse mediante los procedimientos descritos en la tabla 2 y en cualquier otro sitio del presente documento para evaluar sujetos para determinar trastornos mediados por pKal o bradiquinina. La tabla 2 indica la dirección en el cambio del nivel del marcador asociado con trastornos mediados por pKal o bradiquinina.

Biomarcador	Ensayo	Nivel basal en pacientes con HAE con respecto al normal	$\Delta$ debida a activación de contacto	Comentarios
HMWK intacto	ELISA, inmuno-transferencia Western	Sin cambios	Se reduce	El ensayo está disponible para medir quinínogeno intacto usando APTT con plasma deficiente en quinínogeno o inmunoensayos: <a href="http://www.diapharma.com/downloads/68201025811.pdf">www.diapharma.com/downloads/68201025811.pdf</a>
HMWK escindido	ELISA, inmuno-transferencia Western	Aumentó	Aumentó	El quinínogeno escindido puede aumentar a ~47 % del quinínogeno total durante un ataque de HAE. -El quinínogeno escindido también se eleva durante sepsis, cirrosis. Los ensayos pueden usar o bien a) un anticuerpo que es específico para quinínogeno escindido frente a quinínogeno intacto o bien b) un formato de ensayo capaz de separar y cuantificar quinínogeno escindido e intacto (por ejemplo, inmunotransferencia Western). Este ensayo no sería sensible a anticuerpo anti-pKal en circulación y no depende de si la pKal activa unida a la superficie celular es la principal responsable del angioedema mediado por bradiquinina localizado.

10 La presente divulgación se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de que un valor de una forma específica de NMWK (por ejemplo, el porcentaje de HMWK escindido) en una muestra de un paciente se correlaciona con determinadas enfermedades mediadas por pKal (por ejemplo, HAE) y enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, RA, UC y la enfermedad de Crohn). Así, un valor (por ejemplo, un porcentaje) de HMWK escindido, HMWK intacto, o ambos, puede usarse como biomarcador para identificar sujetos que padecen o están en riesgo de padecer dichas enfermedades, para identificar un trastorno que es probable que sea susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal y para evaluar la eficacia del tratamiento de una enfermedad que implica uno o más inhibidores de pKal.

#### Reactivo de detección

20 En algunas formas de realización, un reactivo de detección (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente (preferentemente) a una forma de HMWK en comparación con la otra forma de HMWK puede usarse en los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento para determinar el nivel de HMWK escindido en una muestra, que puede ser una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre o una muestra de plasma) de un paciente candidato. En un ejemplo, el reactivo de detección es un anticuerpo que se une específicamente a HMWK escindido en comparación con HMWK intacto. En otro ejemplo, el reactivo de detección es un anticuerpo que se une específicamente a HMWK intacto en comparación con HMWK escindido. Como alternativa o adicionalmente, el anticuerpo se une específicamente al extremo C-terminal de la cadena ligera de HMWK escindido. Dicho anticuerpo puede usarse para distinguir HMWK de LMWK debido a que el LMWK no contiene el fragmento C-terminal de la cadena ligera de HMWK escindido debido a un corte y empalme alternativo.

30 Un reactivo de detección que "se une específicamente" a un antígeno o a un epítipo es una expresión bien conocida en la técnica, y los procedimientos para determinar dicha unión específica son también bien conocidos en la técnica. Se dice que un reactivo de detección tal como un anticuerpo muestra "unión específica" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con una mayor duración y/o con una mayor afinidad con un antígeno diana particular que lo que lo hace con dianas alternativas. Un reactivo de detección "se une específicamente" a un antígeno diana (por ejemplo, HMWK escindido) o un epítipo del mismo con una mayor afinidad, avidez, más

fácilmente y/o con una mayor duración que lo que se une a otras sustancias (por ejemplo, HMWK intacto). Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente (o preferentemente) a un antígeno (por ejemplo HMWK escindido o al extremo C-terminal de la cadena ligera de HMWK escindido) o un epítipo antigénico del mismo es un anticuerpo que se une a su antígeno diana con una mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con una mayor duración que lo que se une a otros antígenos (por ejemplo, HMWK intacto) u otros epítopes del mismo antígeno. Se entenderá también al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno diana puede o no puede unirse específicamente o preferentemente a un segundo antígeno diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a la unión significa unión preferencial. En algunos ejemplos, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno diana o a un epítipo del mismo puede no unirse a otros antígenos o a otros epítopes del mismo antígeno.

En algunas realizaciones, un anticuerpo para su uso en los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento tiene una afinidad de unión adecuada por un antígeno o un epítipo antigénico diana (por ejemplo, quininógeno escindido, HMWK intacto o el extremo C-terminal de la cadena ligera de quininógeno escindido). Tal como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o  $K_A$ . La  $K_A$  es la inversa de la constante de disociación ( $K_D$ ). El anticuerpo descrito en el presente documento puede tener una afinidad de unión ( $K_D$ ) de por lo menos  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M o inferior. Una afinidad de unión aumentada corresponde a una  $K_D$  reducida. La mayor afinidad de unión de un anticuerpo por un primer antígeno con respecto a un segundo antígeno puede indicarse mediante una  $K_A$  superior (o un valor numérico más pequeño de  $K_D$ ) para la unión al primer antígeno que la  $K_A$  (o el valor numérico de  $K_D$ ) para la unión al segundo antígeno. En dichos casos, el anticuerpo tiene especificidad por el primer antígeno con respecto al segundo antígeno. Las diferencias en la afinidad de unión (por ejemplo, para la especificidad u otras comparaciones) pueden ser por lo menos de 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10000 o  $10^5$  veces.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye por lo menos un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como VH), y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El término "anticuerpo" abarca fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab y sFab,  $F(ab')_2$ , fragmentos Fd, fragmentos Fv, scFv y fragmentos de anticuerpos de dominio (dAb) (de Wildt *et al.*, Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39.)) así como anticuerpos completos. Un anticuerpo puede tener las características estructurales de IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como de subtipos de las mismas). Los anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, pero se prefieren los de primate (primate humano y no humano) y los primatizados.

Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de la complementariedad" ("CDR"), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones estructurales" ("FR"). La extensión de la región estructural y de las CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publicación N° 91-3242, y Chothia, C. *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; véase también [www.hgmp.mrc.ac.uk](http://www.hgmp.mrc.ac.uk)). En el presente documento se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y cada VL está constituida normalmente por tres CDR y cuatro FR, dispuestas partiendo del extremo amino-terminal hacia el extremo carboxi-terminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir adicionalmente la totalidad o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar, por lo tanto, una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, respectivamente. En una forma de realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, estando interconectadas las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina por, por ejemplo, enlaces disulfuro. En las IgG, la región constante de cadena pesada incluye tres dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos normalmente median la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipos kappa o lambda. En una forma de realización, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad mediada por complemento.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o eficazmente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o eficazmente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR pueden ser humanas, por ejemplo, CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC. Cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. La CDR3 de HC puede ser humana. Una o más de las regiones estructurales pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 de la HC o la LC. Por ejemplo, la región Fc puede ser humana. En una forma de realización, todas las regiones estructurales son humanas, por ejemplo, tienen una secuencia de un marco estructural de un anticuerpo producido por una célula somática humana,

por ejemplo una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una forma de realización, las secuencias humanas son secuencias de línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. En una forma de realización, los residuos del marco estructural (FR) de un Fab seleccionado pueden convertirse en el tipo de aminoácido del residuo correspondiente en el gen de línea germinal de primate más similar, especialmente el gen de línea germinal humana. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o eficazmente humanas. Por ejemplo, por lo menos el 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 o 100 % de un dominio variable de inmunoglobulina, la región constante, los dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CL1), o la totalidad del anticuerpo pueden ser humanos o eficazmente humanos.

La totalidad o parte de un anticuerpo puede estar codificado por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Los genes de inmunoglobulina humanos ejemplares incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 y IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como los muchos genes de región variable de inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de región variable en el extremo NH<sub>2</sub>-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH-terminal. Las "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos), están codificadas de forma similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante mencionados anteriormente, por ejemplo gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). La longitud de HC humana varía considerablemente debido a que la CDR3 de HC varía de aproximadamente 3 residuos de aminoácidos a más de 35 residuos de aminoácidos.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo de longitud completa se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad de unirse específicamente a una diana de interés. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo de longitud completa incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos mediante un puente bisulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada que conserva funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, pueden unirse usando procedimientos recombinantes, por medio de un enlazador sintético que permite producirlos como una única cadena de proteína en la que el par de regiones VL y VH forma moléculas monovalentes conocidas como Fv monocatenario (scFv). Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nº 5.260.203, 4.946.778 y 4.881.175; Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883.

Pueden obtenerse fragmentos de anticuerpos utilizando cualquier técnica apropiada, incluidas técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. La expresión "anticuerpo monoespecífico" se refiere a un anticuerpo que muestra una especificidad y una afinidad de unión únicas por una diana, por ejemplo, un epítipo, particular. Esta expresión incluye un "anticuerpo monoclonal" o una "composición de anticuerpos monoclonales", que se usa en el presente documento para referirse a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de composición molecular única, independientemente de cómo se ha generado el anticuerpo.

Tal como se usa en el presente documento, una región variable de inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una región variable de inmunoglobulina que está modificada de forma que incluya un número suficiente de posiciones de aminoácidos de marco estructural humano de forma que la región variable de inmunoglobulina no provoque una respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Las descripciones de inmunoglobulinas "humanizadas" incluyen, por ejemplo, los documentos U.S. 6.407.213 y U.S. 5.693.762.

La constante de inhibición (K<sub>i</sub>) proporciona una medida de la potencia del inhibidor; es la concentración de inhibidor requerida para reducir la actividad enzimática a la mitad y no depende de las concentraciones de la enzima o el sustrato. La K<sub>i</sub> aparente (K<sub>i,ap</sub>) se obtiene a diferentes concentraciones de sustrato mediante la medición del efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de inhibidor (por ejemplo, proteína de unión inhibitoria) a lo largo de la extensión de la reacción (por ejemplo, actividad enzimática); el ajuste del cambio en la constante de velocidad de seudoprimer orden como función de la concentración de inhibidor en la ecuación de Morrison (ecuación 1) proporciona un valor estimado de la K<sub>i</sub> aparente. La K<sub>i</sub> se obtiene a partir del intercepto y extraído de un análisis de regresión lineal de una gráfica de K<sub>i,ap</sub> frente a la concentración de sustrato.

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

Ecuación 1

En la que v = velocidad medida; v<sub>o</sub> = velocidad en ausencia de inhibidor; K<sub>i,ap</sub> = constante de inhibición aparente; I = concentración de inhibidor total y E = concentración de enzima total.

5 En algunas formas de realización, el reactivo de detección tal como se describe en el presente documento puede conjugarse a una marca detectable y la unión del reactivo de detección al antígeno de interés (por ejemplo HMWK escindido y HMWK intacto) puede determinarse basándose en la intensidad de la señal liberada de la marca detectable. Como alternativa, puede usarse un anticuerpo secundario específico con respecto al reactivo de  
10 detección. Pueden acoplarse uno o más anticuerpos a la marca detectable. Puede usarse cualquier marca adecuada conocida en la técnica en los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento. En algunas formas de realización, una marca detectable comprende un fluoróforo. Tal como se usa en el presente documento, el término "fluoróforo" (también denominado "marca fluorescente" o "colorante fluorescente") se refiere a restos que absorben  
15 energía lumínica a una longitud de onda de excitación definida y emiten energía lumínica a una longitud de onda diferente. En algunas realizaciones, un resto de detección es o comprende una enzima. En algunas realizaciones, una enzima es una (por ejemplo, β-galactosidasa) que produce un producto coloreado a partir de un sustrato incoloro.

Quininógeno de alto peso molecular

20 El quininógeno de alto peso molecular (HMWK) está presente en el plasma como una proteína de un único polipéptido (monocatenaria) de múltiples dominios (dominios 1-6) con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa (figura 4). El HMWK es escindido por la pKal dentro del dominio 4 para liberar los 9 aminoácidos, bradiquinina peptídica proinflamatoria y una forma bicatenaria de HMWK (quininógeno escindido). Las 2 cadenas de HMWK son  
25 la cadena pesada, que contiene los dominios 1-3 de HMWK, y la cadena ligera, que contiene los dominios 5 y 6 de HMWK. Las cadenas pesada y ligera tienen un peso molecular de aproximadamente 56 y 46 kilodaltons, respectivamente. Figura 4.

*HMWK intacto*

30 El quininógeno de alto peso molecular (HMWK) intacto, también denominado en el presente documento "quininógeno intacto", puede analizarse, por ejemplo, usando procedimientos coagulantes o inmunológicos, por ejemplo, radioinmunoensayo (véase, por ejemplo, Kerbiriou-Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2):2734-86). Un anticuerpo monoclonal para la cadena ligera de HMWK humano es conocido. Véase, por ejemplo, Reddigari, S.R. y  
35 Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74:695-702. También puede usarse un ensayo para HMWK que se basa en un sustrato cromogénico. Véanse, por ejemplo, Scott, C.F. et al. Thromb Res, 1987, 48(6):685-700; Gallimore, M.J. et al. Thromb Res, 2004, 114(2):91-96.

40 El gen humano que codifica HMWK es quininógeno 1 (KNG1). El KNG1 se transcribe y alternativamente se corta y empalma para formar diversos ARNm que codifican o bien HMWK o bien quininógeno de bajo peso molecular (LMWK). Una secuencia de proteína ejemplar de HMWK se proporciona a continuación:

>gi | 156231037 | ref | NP\_001095886.1 | precursor de la isoforma 1 de quininógeno-1 [Homo sapiens]

```
MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNQFVLYRITTEATKTVGSDT
FYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQY
DCLGCVHPDISTQSPDLEPILRHGIQYFNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRIITYSIVQTNCSEN
FLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPITNSPELEE
TLHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSEKESNEELTESCETKKGQSLD
CNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMI SLMKRPPGFSFPRSSRIGI KEETT VSPH TSMAPAQDEERDSG
KEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHRGHGLGHGHEQQHGLGHGHKFKLDDDDLEHQGGHV
LDHGHKHKHGHGHGKHKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGKNGK
SDFQSDLIATMPPPI SPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPI SDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQ
45 MKESYYFDLTDGLS (SEQ ID NO: 1)
```

*HMWK escindido*

El quininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, también denominado en el presente documento

"quininógeno escindido", puede evaluarse, por ejemplo, usando procedimientos descritos en los ejemplos 1, y 3 a 7, por ejemplo inmunotransferencia Western. En algunas formas de realización, puede evaluarse la cadena ligera de HMWK escindido. Pueden usarse anticuerpos que se unen a HMWK escindido, tales como anticuerpos que se unen a la cadena ligera de HMWK escindido (por ejemplo, un epítipo que comprende residuos C-terminales). Un ejemplo es el mAb (anticuerpo monoclonal) de ratón clon 11H05. Adicionalmente, puede evaluarse HMWK usando espectrometría de masas. Las técnicas de inmunotransferencia para evaluar niveles de HMWK son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Buhler R. *et al.* Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(3):223-232.

Las secuencias ejemplares de las cadenas pesada y ligera de quininógeno escindido se proporcionan a continuación.

> cadena pesada de quininógeno 1 escindido

```
QESQSEI IDCNDKDLFKA VDAALKKYNSQNQSNNQFVLYRIT EATKTVGSDTFYSFKYEI
KEGDCPVQSGK TWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTA
QYDCLGCVHP ISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRIT
YSIVQTNC SKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQ
PPTKICVGCPRDIP TNSPELEETLHTITKLN AENNATFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYF
IDFVARETTCSKESNEELTESCETK KLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISL
MK (SEQ ID NO: 2)
```

> cadena ligera de quininógeno 1 escindido

```
SSRIGEIKEETT VSPPH TSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHWDWGHEKQRKHN LGHGKHER
DQGHGHRGHGLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDDL EHQGGHVL DHGKHKHGHGKHKHKNK
GKNGKHNGWKTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLI
ATMMPPI SPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLS FNPI SDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTT
QMKESYFDLTDGLS (SEQ ID NO: 3)
```

### Formato de ensayo

Los valores (por ejemplo, las cantidades o los niveles absolutos o las cantidades o los niveles relativos tales como porcentajes) de biomarcadores divulgados en el presente documento, o los cambios en valores de biomarcadores divulgados en el presente documento, pueden evaluarse usando ensayos descritos en el presente documento y/o ensayos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el porcentaje de quininógeno escindido en una muestra de un sujeto se usa en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los ensayos que pueden usarse para evaluar niveles de biomarcadores incluyen, por ejemplo, inmunoensayos, por ejemplo, inmunotransferencias Western, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) (por ejemplo, ELISA en sándwich), radioinmunoensayos, ensayos de detección basados en electroquimioluminiscencia y técnicas relacionadas. También pueden usarse enfoques basados en espectrometría de masas. También pueden usarse ensayos que se basan en un sustrato cromogénico. Los ensayos, por ejemplo, los ensayos de inmunotransferencia Western, pueden implicar además el uso de un sistema de imagenología cuantitativo, por ejemplo, tecnología de imagenología LI-COR, que está comercialmente disponible (véase, por ejemplo, el sistema de imagenología por infrarrojos Odyssey® CLx de LI-COR Biosciences). En algunas formas de realización, se usa un ensayo de detección por electroquimioluminiscencia o un ensayo basado en una combinación de electroquimioluminiscencia y tecnología de matriz con patrón (por ejemplo, un ECL o un ensayo de tecnología MULTI-ARRAY de Meso Scale Discovery (MSD)).

Tal como se usan en el presente documento, los términos "medir" o "medición", o alternativamente "detectar" o "detección", significan evaluar la presencia, la ausencia, la cantidad (que puede ser una cantidad eficaz) de una sustancia dentro de una muestra, incluida la derivación de niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de dichas sustancias, o evaluar de otra forma los valores o la categorización de un sujeto.

En algunas formas de realización, los ensayos proporcionados pueden llevarse a cabo en plataformas de alto rendimiento. En algunas formas de realización, pueden usarse placas de múltiples pocillos, por ejemplo, placas de 24, 48, 96, 384 o más pocillos, para ensayos de alto rendimiento. Pueden llevarse a cabo ensayos individuales en cada pocillo en paralelo. Por lo tanto, generalmente es deseable usar un lector de placas para medir múltiples pocillos en paralelo para aumentar el rendimiento del ensayo. En algunas formas de realización, pueden usarse para esta plataforma lectores de placas que son capaces de tomar imágenes de múltiples pocillos (por ejemplo 4, 16, 24, 48, 96, 384 o más pocillos) en paralelo. Por ejemplo, puede usarse un lector de placas comercialmente disponible (por ejemplo el sistema de placa::visión disponible de Perkin Elmer, Waltham, MA). Este lector de placas es capaz de realizar análisis de fluorescencia basados en cinética. El sistema de placa::visión tiene ópticas de alta eficacia de captación y tiene ópticas especiales diseñadas para el análisis de 96 pocillos en paralelo. Algunos lectores de placas en paralelo adecuados adicionales incluyen, pero sin limitación, el SAFIRE (Tecan, San Jose, CA), el

FLIPRTETRA® (Molecular Devices, Union City, CA), el FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) y el CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA). En algunas formas de realización, los ensayos de cribado de alto rendimiento de la invención están automatizados (por ejemplo, adaptados a ensayos robóticos).

## 5 Kits

La presente divulgación también proporciona kits para su uso en la evaluación de quinínogeno escindido y/o intacto en muestras que contienen los mismos, por ejemplo muestras biológicas de pacientes humanos. Dichos kits pueden comprender un reactivo de detección que se une específicamente o bien al quinínogeno escindido o bien al quinínogeno intacto en comparación con otras formas, y opcionalmente, quinínogeno escindido y/o quinínogeno intacto como controles. En algunas formas de realización, los kits comprenden además reactivos y/o anticuerpos secundarios para detectar la unión del reactivo de detección al quinínogeno escindido y/o intacto.

En algunas formas de realización, el kit puede comprender instrucciones para su uso según cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de cómo usar los componentes contenidos en el kit para medir el nivel de quinínogeno escindido y/o intacto en una muestra, que puede ser una muestra biológica recogida de un paciente humano.

Las instrucciones con respecto al uso del kit incluyen generalmente información sobre la cantidad de cada componente y condiciones adecuadas para la realización de los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento. Los componentes del kit puede ser dosis unitarias, envases con productos a granel (por ejemplo, envases de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Los componentes del kit de la divulgación son normalmente instrucciones escritas en una etiqueta o un prospecto del envase (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones proporcionadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

La etiqueta o el prospecto del envase indica que el kit se usa para evaluar el nivel de quinínogeno escindido y/o intacto. Las instrucciones pueden proporcionarse para poner en práctica cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento.

Los kits de la presente divulgación se encuentran en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero sin limitación, viales, frascos, jarras, envases flexibles (por ejemplo bolsas de Mylar o de plástico selladas) y similares. También se contemplan envases para su uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa para solución de administración intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede atravesarse con la aguja de una inyección hipodérmica). El recipiente puede tener también un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa para solución de administración intravenosa o un vial que tiene un tapón que puede atravesarse con la aguja de una inyección hipodérmica).

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones e información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto(s) del envase en el recipiente o asociados con el mismo. En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona artículos de fabricación que comprenden contenidos de los kits descritos anteriormente.

## **Aplicación de procedimientos de ensayo en diagnóstico y pronóstico de enfermedades**

Los procedimientos de ensayo y los kits descritos en el presente documento pueden aplicarse para la evaluación de enfermedades, por ejemplo para el diagnóstico o el pronóstico de una enfermedad. La evaluación puede incluir identificar a un sujeto que está en riesgo de padecer o que padece una enfermedad tal como se describe en el presente documento, por ejemplo un trastorno mediado por pKal tal como HAE y una enfermedad autoinmunitaria tal como RA, UC y la enfermedad de Crohn. La evaluación también puede incluir supervisar el tratamiento de una enfermedad, tal como evaluar la eficacia de un tratamiento para un trastorno mediado por pKal tal como HAE. Además, la evaluación puede incluir identificar una enfermedad que puede tratarse mediante un inhibidor de pKal.

### A. Diagnóstico

En algunas formas de realización, los procedimientos de ensayo y los kits se realizan para determinar el nivel de quinínogeno escindido y/o quinínogeno intacto en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre o una muestra de plasma) recogida de un sujeto candidato (por ejemplo un paciente humano sospechoso de padecer un trastorno mediado por pKal tal como HAE o una enfermedad autoinmunitaria tal como RA, UC y la enfermedad de Crohn). El nivel de quinínogeno escindido puede compararse después con o bien el quinínogeno intacto o bien la cantidad total de quinínogeno en la muestra para determinar un valor (por ejemplo un porcentaje) de quinínogeno escindido, un valor de quinínogeno intacto, o ambos, en la muestra. El valor de quinínogeno escindido y/o quinínogeno intacto puede compararse con un valor de referencia para determinar si el sujeto padece o está en riesgo de padecer un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE o una enfermedad autoinmunitaria, tal como RA,

UC y enfermedad de Crohn. Por ejemplo, si el porcentaje de quinínógeno escindido es igual o superior a un número de referencia, puede establecerse que el sujeto padece o está en riesgo de padecer un trastorno mediado por pKal tal como HAE, RA, UC y la enfermedad de Crohn. Como alternativa, si el porcentaje de quinínógeno intacto es igual o inferior a un número de referencia, puede establecerse que el sujeto padece o está en riesgo de padecer un trastorno mediado por pKal tal como HAE, RA, UC y la enfermedad de Crohn.

El valor de referencia puede ser un nivel de control de porcentaje de quinínógeno escindido. En algunas formas de realización, el nivel de control es el porcentaje de quinínógeno escindido en una muestra de control, tal como una muestra (por ejemplo, una muestra de sangre o plasma) obtenida de un sujeto sano o una población de sujetos sanos, que preferentemente son de la misma especie que el sujeto candidato. Tal como se usa en el presente documento, un sujeto sano es un sujeto que aparentemente no presenta la enfermedad diana (por ejemplo, un trastorno mediado por pKal tal como HAE o enfermedades autoinmunitarias tales como RA, US y la enfermedad de Crohn) en el momento de medir el nivel de quinínógeno escindido y/o intacto o no tiene antecedentes de la enfermedad.

El nivel de control también puede ser un nivel predeterminado. Dicho nivel predeterminado puede representar un porcentaje de quinínógeno escindido en una población de sujetos que no padecen o no están en riesgo de padecer la enfermedad diana. También pueden representar un porcentaje de quinínógeno escindido en una población de sujetos que padecen la enfermedad diana.

El nivel predeterminado puede tomar una diversidad de formas. Por ejemplo, puede ser un valor de corte individual, tal como una mediana o una media. En algunas formas de realización, dicho nivel predeterminado puede establecerse basándose en grupos comparativos, tales como cuando se sabe que un grupo definido padece una enfermedad diana y que otro grupo definido no padece la enfermedad diana. Como alternativa, el nivel predeterminado puede variarse, por ejemplo, un intervalo que representa los porcentajes de quinínógeno escindido en una población de control dentro de un percentil predeterminado.

El nivel de control tal como se describe en el presente documento puede determinarse mediante tecnología rutinaria. En algunos ejemplos, en nivel de control puede obtenerse realizando un procedimiento convencional (por ejemplo, el mismo ensayo para obtener el nivel de quinínógeno escindido y/o intacto en una muestra de ensayo tal como se describe en el presente documento) en una muestra de control tal como se describe en el presente documento. En otros ejemplos, los niveles de quinínógeno escindido y/o intacto pueden obtenerse de miembros de una población de control y los resultados pueden analizarse con, por ejemplo, un programa informático, para obtener el nivel de control (un nivel predeterminado) que represente el nivel de quinínógeno escindido y/o intacto en la población de control.

Comparando el porcentaje de quinínógeno escindido en una muestra obtenida de un sujeto candidato con el valor de referencia tal como se describe en el presente documento, puede determinarse si el sujeto candidato padece o está en riesgo de padecer una enfermedad mediada por pKal (por ejemplo, HAE o una enfermedad autoinmunitaria tal como RA, UC y la enfermedad de Crohn). Por ejemplo, si el porcentaje de quinínógeno escindido en una muestra del sujeto candidato se desvía del valor de referencia (por ejemplo, presenta un valor aumentado en comparación con el valor de referencia), puede establecerse que el sujeto candidato padece o está en riesgo de padecer la enfermedad. Cuando el valor de referencia representa el intervalo de porcentaje de quinínógeno escindido en una población de sujetos que padecen la enfermedad diana, el porcentaje de quinínógeno escindido en una muestra de un candidato que se encuentra dentro del intervalo indica que el sujeto candidato padece o está en riesgo de padecer la enfermedad diana.

Tal como se usa en el presente documento, "un nivel elevado o un nivel superior a un valor de referencia" significa que el nivel/porcentaje de quinínógeno escindido es superior a un valor de referencia, tal como un valor umbral predeterminado de un nivel/porcentaje de quinínógeno escindido en una muestra de control. Los niveles de control se describen en detalle en el presente documento. Un porcentaje elevado de quinínógeno escindido incluye un quinínógeno escindido es un porcentaje que es, por ejemplo, el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más superior a un valor de referencia. Un porcentaje elevado de quinínógeno escindido también incluye el aumento de un fenómeno a partir de un estado cero (por ejemplo, no hay nada de quinínógeno escindido y/o de quinínógeno intacto que se unan a un reactivo de captura en una muestra o estos son indetectables) a un estado no cero (por ejemplo, hay algo de quinínógeno escindido y/o quinínógeno intacto o estos pueden detectarse).

Tal como se usa en el presente documento, "un porcentaje/nivel reducido o un porcentaje/nivel inferior a un valor de referencia" significa que el porcentaje/nivel de quinínógeno escindido es inferior a un valor de referencia, tal como un valor umbral predeterminado de quinínógeno escindido en una muestra de control. Los niveles de control se describen en detalle en el presente documento. Un nivel reducido de quinínógeno escindido incluye un quinínógeno escindido que es, por ejemplo, el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 % o más inferior a un valor de referencia. Un nivel reducido de quinínógeno escindido que se une a un reactivo de captura también incluye la reducción de un fenómeno a partir de un estado no cero (por ejemplo, hay algo de quinínógeno escindido o este es detectable en una muestra) a un estado de cero (por ejemplo,

no hay nada de quinínogeno escindido o este es indetectable en una muestra).

En algunas formas de realización, el sujeto candidato es un paciente humano que padece un síntoma de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, tal como HAE o una enfermedad autoinmunitaria tal como RA, UC y la enfermedad de Crohn. Por ejemplo, el sujeto padece edema; inflamación, siendo dicha inflamación completamente o predominantemente periférica; urticaria; enrojecimiento, dolor e inflamación en ausencia de evidencias de infección; edema mediado por histamina, ataques recurrentes de inflamación, o una combinación de los mismos. En otras formas de realización, el sujeto es de un sujeto que no presenta síntomas de un trastorno mediado por pKal en el momento de recoger la muestra, no tiene antecedentes de un síntoma de un trastorno mediado por pKal o no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal, tal como HAE. En otras formas de realización más, el sujeto es resistente a un tratamiento antihistamínico, un tratamiento con corticosteroides, o a ambos.

(i) HAE

En algunas formas de realización, la enfermedad o la afección que implica actividad de calicreína plasmática es angioedema hereditaria (HAE). El angioedema hereditario (HAE) es también conocido como "edema de Quincke", deficiencia de inhibidor de esterasa C1, deficiencia de inhibidor C1 y edema angioneurótico hereditario (HANE). El HAE se caracteriza por episodios recurrentes de inflamación grave (angioedema) que pueden afectar, por ejemplo, a extremidades, cara, genitales, aparato gastrointestinal y vías respiratorias. Los síntomas de HAE incluyen, por ejemplo, inflamación en brazos, piernas, labios, ojos, lengua y/o garganta; bloqueo de vías respiratorias que pueden implicar inflamación de garganta y ronquera súbita; episodios repetidos de calambres abdominales sin causa obvia; y/o inflamación de los intestinos, que puede ser grave y puede desembocar en calambres abdominales, vómitos, deshidratación, diarrea, dolor y/o conmoción. Aproximadamente un tercio de los individuos con este HAE desarrollan una erupción sin picor denominada eritema marginado durante un ataque.

La inflamación de las vías respiratorias puede ser potencialmente mortal y causar la muerte en algunos pacientes. Las tasas de mortalidad se estiman en el 15-33 %. El HAE es la causa de aproximadamente 15.000-30.000 visitas al servicio de urgencias por año.

El traumatismo o el estrés, por ejemplo, procedimientos dentales, enfermedad (por ejemplo enfermedad vírica tal como resfriados y gripe), menstruación y cirugía pueden desencadenar un ataque de angioedema. Para prevenir ataques agudos de HAE, los pacientes pueden intentar evitar estímulos específicos que han provocado anteriormente ataques. No obstante, en muchos casos, tiene lugar un ataque sin un desencadenante conocido. Normalmente, los síntomas de HAE aparecen en primer lugar en la infancia, y empeoran durante la pubertad. En promedio, los individuos tratados tienen un ataque cada 1 a 2 semanas, y la mayor parte de los episodios durante aproximadamente de 3 a 4 días ([ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema](http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)). La frecuencia y la duración de los ataques varían ampliamente entre personas con angioedema hereditario, incluso entre personas de la misma familia.

Existen tres tipos de HAE, conocidos como tipos I, II y III. Se estima que el HAE afecta a 1 de cada 50.000 personas, el tipo I abarca el 85 por ciento de los casos, el tipo II abarca aproximadamente el 15 por ciento de los casos y el tipo III es muy raro. El tipo III es la forma descrita más recientemente y originalmente se pensaba que se producía solo en mujeres, pero se han identificado familias con varones afectados.

El HAE se hereda en un patrón autosómico dominante, de forma que una persona afectada puede heredar la mutación de un pariente afectado. También pueden tener lugar nuevas mutaciones en el gen, y así, también puede producirse HAE en gente sin antecedentes del trastorno en su familia. Se estima que el 20-25 % de los casos son consecuencia de una mutación nueva espontánea.

Las mutaciones en el gen SERPING1 causan angioedema hereditario de tipo I y tipo II. El gen SERPING1 proporciona instrucciones para producir la proteína inhibidora C1, que es importante para controlar la inflamación. El inhibidor C1 bloquea la actividad de determinadas proteínas que promueven la inflamación. Las mutaciones que causan angioedema hereditario de tipo I conducen a niveles reducidos de inhibidor C1 en la sangre. Por el contrario, las mutaciones que causan el tipo II dan como resultado la producción de un inhibidor C1 que funciona de forma anormal. Sin los niveles adecuados de inhibidor C1 funcional se generan cantidades excesivas de bradiquinina. La bradiquinina promueve la inflamación aumentando el escape de fluido a través de las paredes de los vasos sanguíneos a tejidos corporales. La acumulación excesiva de fluidos en tejidos corporales causa los episodios de inflamación observados en individuos con angioedema hereditario de tipo I y tipo II.

Las mutaciones en el gen F12 están asociadas con algunos casos de angioedema hereditario de tipo III. El gen F12 proporciona instrucciones para producir el factor de coagulación XII. Además de desempeñar un papel crítico en la coagulación de la sangre, el factor XII es también un estimulante importante de la inflamación y está implicado en la producción de bradiquinina. Determinadas mutaciones en el gen F12 tienen como consecuencia la producción de factor XII con actividad aumentada. Como consecuencia, se genera más bradiquinina y las paredes de los vasos sanguíneos se vuelven más permeables, lo que conduce a episodios de inflamación. La causa de otros casos de angioedema hereditario de tipo III continúa siendo desconocida. Las mutaciones en uno o más de los genes aún no

identificados pueden ser responsables del trastorno en algunos casos.

El HAE puede presentarse de forma similar a otras formas de angioedema que tienen como consecuencia alergias u otras afecciones médicas, pero difiere significativamente en causa y tratamiento. Cuando el angioedema hereditario se diagnostica erróneamente como una alergia, se trata de la forma más común con antihistamínicos, esteroides y/o epinefrina, que son normalmente ineficaces contra el HAE, aunque puede utilizarse la epinefrina para reacciones potencialmente mortales. Un diagnóstico erróneo también tiene como consecuencia una cirugía exploratoria innecesaria para pacientes con inflamación abdominal, y en algunos pacientes con HAE se ha diagnosticado incorrectamente el dolor abdominal como psicossomático.

Los síntomas de HAE pueden evaluarse, por ejemplo, utilizando cuestionarios, por ejemplo cuestionarios que son completados por pacientes, personal clínico o miembros de la familia. Dichos cuestionarios se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, escalas analógicas visuales. Véase, por ejemplo, McMillan, C.V. *et al.* Patient. 2012;5(2):113-26.

(ii) Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmunitaria inflamatoria crónica que causa inflamación y dolor de las articulaciones y desemboca normalmente en la destrucción de las articulaciones. La RA sigue generalmente un curso de recaída/remisión, con brotes de actividad de la enfermedad intercaladas con remisiones de los síntomas de enfermedad. La RA se asocia con una serie de trastornos inflamatorios adicionales, incluidos el síndrome de Sjogren (ojos y boca secos provocados por la inflamación de glándulas lacrimales y salivares), pleuritis (inflamación de la pleura que provoca dolor al respirar profundamente y al toser), nódulos reumatoides (sitios nodulares de inflamación que se desarrollan dentro de los pulmones), pericarditis (inflamación del pericardio que causa dolor al tumbarse o al inclinarse hacia delante), síndrome de Felty (esplenomegalia y leucopenia observadas junto con RA, que hacen que el sujeto sea propenso a la infección) y vasculitis (una inflamación de los vasos sanguíneos que puede bloquear el flujo sanguíneo). La caliceína plasmática se ha implicado en artritis reumatoide.

Los síntomas de RA activa incluyen fatiga, falta de apetito, fiebre de grado reducido, dolor de músculos y articulaciones y rigidez. La rigidez de músculos y articulaciones son más notables generalmente por la mañana y después de periodos de inactividad. Durante los brotes, las articulaciones se vuelven frecuentemente rojas, inflamadas, dolorosas y blandas, generalmente como consecuencia de sinovitis.

El tratamiento contra la artritis reumatoide implica una combinación de medicaciones, descanso, ejercicio fortalecedor de las articulaciones y protección de las articulaciones. Se utilizan dos clases de medicamentos en el tratamiento de la artritis reumatoide: "fármacos de primera línea" antiinflamatorios y "fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad" (DMARD). Los fármacos de primera línea incluyen NSAID (fármacos antiinflamatorios no esteroideos) (por ejemplo, aspirina, naproxeno, ibuprofeno y etodolac) y cortisona (corticosteroides). Los DMARD, tales como el oro (por ejemplo, sales de oro, oro-tioglucoasa, tiomalato de oro, oro para administración oral), metotrexato, sulfasalazina, D-penicilamina, azatioprina, ciclofosfamida, clorambucilo y ciclosporina, leflunomida, etanercept, infliximab, anakinra y adalimumab, e hidroxicloroquina, promueven la remisión de la enfermedad y previenen la destrucción progresiva de articulaciones, pero no son agentes antiinflamatorios.

Las escalas útiles para evaluar RA y síntomas de RA incluyen, por ejemplo, la escala de gravedad de artritis reumatoide (RASS; Bardwell *et al.*, (2002) Rheumatology 41(1):38-45), índice de salud específico de artritis SF-36 (ASHI; Ware *et al.*, (1999) Med. Care. 37(5 Supl):MS40-50), escalas de medición del impacto de la artritis o escalas de medición del impacto de la artritis 2 (AIMS o AIMS2; Meenan *et al.* (1992) Arthritis Rheum. 35(1):1-10); el cuestionario de evaluación de salud de Stanford (HAQ), HAQII, o HAQ modificado (véase, por ejemplo, Pincus *et al.* (1983) Arthritis Rheum. 26(11):1346-53).

(iii) Enfermedad intestinal (IBD) – enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa

La enfermedad intestinal inflamatoria (IBD) es un grupo de afecciones inflamatorias del intestino grueso y, en algunos casos, del intestino delgado. Las formas principales de IBD son la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa (UC). Contando con muchos menos casos están otras formas de IBD: colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por diversión, síndrome de Behçet, colitis infecciosa y colitis indeterminada. La mayor diferencia entre la enfermedad de Crohn y la UC es la ubicación y la naturaleza de los cambios inflamatorios. La enfermedad de Crohn puede afectar cualquier parte del aparato gastrointestinal, desde la boca hasta el ano (salto de lesiones), aunque una mayor parte de los casos comienza en el íleon terminal. La colitis ulcerosa, por el contrario, se restringe al colon y al recto. Microscópicamente, la colitis ulcerosa se restringe a la mucosa (revestimiento epitelial del intestino), mientras que la enfermedad de Crohn afecta a la totalidad de la pared intestinal. Finalmente, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa se presentan con manifestaciones extraintestinales (tales como problemas hepáticos, artritis, manifestaciones en la piel y problemas oculares) en diferentes proporciones.

Los síntomas de la IBD incluyen dolor abdominal, vómitos, diarrea, hematoquecia, pérdida de peso, ganancia de peso y diversas dolencias o enfermedades asociadas (artritis, pioderma gangrenosa, colangitis esclerótica primaria).

El diagnóstico se realiza generalmente mediante colonoscopia con biopsia de lesiones patológicas.

El tratamiento para la IBD, en función del nivel de gravedad, puede requerir inmunosupresión para controlar los síntomas. Pueden utilizarse inmunosupresores tales como azatioprina, metotrexato o 6-mercaptopurina. Más comúnmente, el tratamiento de IBD requiere una forma de mesalamina. A menudo, se utilizan esteroides para controlar brotes de enfermedad y fueron una vez aceptables como fármaco de mantenimiento. Se han utilizado productos biológicos, tales como infliximab, para tratar pacientes con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Los casos graves pueden requerir cirugía, tal como resección de intestino, estricturoplastia o una colostomía o ileostomía temporal o permanente. Existen tratamientos medicinales alternativos para IBD en diversas formas, no obstante dichos procedimientos se concentran en controlar la patología subyacente a fin de evitar una exposición a esteroides prolongada o una escisión quirúrgica. Habitualmente, el tratamiento comienza por la administración de fármacos, tales como prednisona, con efectos antiinflamatorios elevados. Una vez la inflamación se ha controlado exitosamente, el paciente se cambia habitualmente a un fármaco más suave, tal como asacol (una mesalamina) para mantener la enfermedad en remisión. Si no tiene éxito, puede o no puede administrarse, dependiendo del paciente, una combinación de los fármacos inmunosupresores mencionados anteriormente con una mesalamina (que también puede tener un efecto antiinflamatorio).

*(iv) Otros trastornos mediados por pKal o mediados por bradiquinina*

Otras enfermedades o afecciones ejemplares asociadas con la actividad de caliceína plasmática incluyen angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemadura, lesión por isquemia/reperusión cerebral, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis, trombosis arterial o venosa, trombosis asociada con dispositivos de asistencia ventricular o endoprótesis vasculares, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad espinal degenerativa, íleo postoperatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolismo pulmonar, apoplejía, traumatismo craneal o edema cerebral peritumoral, sepsis, evento isquémico de la arteria cerebral media (MCA) agudo (apoplejía), reestenosis (por ejemplo, después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con un plegamiento proteico incorrecto, una enfermedad asociada con angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (por ejemplo, anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, rinitis persistente) y lesiones hísticas (por ejemplo, lesión por quemadura o por producto químico).

Un sujeto que se ha establecido que padece o que está en riesgo de padecer un trastorno mediado por pKal tal como se describe en el presente documento puede someterse a un tratamiento adecuado tal como los descritos en el presente documento.

**B. Evaluación de la eficacia del tratamiento**

Los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento también pueden aplicarse para evaluar la eficacia de un tratamiento contra un trastorno mediado por pKal (por ejemplo, HAE). Por ejemplo, pueden recogerse múltiples muestras biológicas (por ejemplo, muestras de sangre o de plasma) de un sujeto al que se realiza un tratamiento o bien antes y después del tratamiento o bien durante el transcurso del tratamiento. Los niveles de quinínógeno escindido y/o intacto pueden medirse mediante cualquiera de los procedimientos de ensayo descritos en el presente documento y pueden determinarse valores (por ejemplo, porcentajes) de quinínógeno escindido y/o intacto en consecuencia. Si el porcentaje del quinínógeno escindido se reduce después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento (el porcentaje de quinínógeno escindido en una muestra recogida más tarde en comparación con el de una muestra recogida antes) o el porcentaje de quinínógeno intacto aumenta después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento, indica que el tratamiento es eficaz. En algunos ejemplos, el tratamiento implica un agente terapéutico, tal como un agente de unión a caliceína tal como se describe en el presente documento, un antagonista del receptor de bradiquinina B2 tal como se describe en el presente documento o un agente de reemplazo de C1-INH tal como se describe en el presente documento. Los ejemplos de los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, DX-2930 o DX88.

Si se constata que el sujeto no responde al tratamiento, se administra al sujeto en cuestión el agente terapéutico con una dosis superior y/o con una frecuencia de dosificación superior. En algunas formas de realización, la dosificación o la frecuencia de dosificación del agente terapéutico se mantienen, se reducen o se suspenden en un sujeto que se ha constatado que responde al tratamiento o no tiene necesidad de un tratamiento adicional. Como alternativa, puede aplicarse un tratamiento diferente al sujeto que se ha encontrado que no responde al primer tratamiento.

**Identificación de trastornos susceptibles de tratamiento con inhibidores de pKal**

Los valores de quinínógeno escindido y/o quinínógeno intacto pueden basarse también en la identificación de un

trastorno que puede tratarse mediante un inhibidor de pKal. Para poner en práctica este procedimiento, el nivel de quinínogeno escindido y/o el nivel de quinínogeno intacto en una muestra recogida de un sujeto (por ejemplo, una muestra de sangre o una muestra de plasma) que tiene una enfermedad diana puede medirse mediante un ensayo adecuado, por ejemplo, los descritos en el presente documento tal como un ensayo de inmunotransferencia Western. Los valores tales como porcentajes del quinínogeno escindido y/o intacto pueden determinarse tal como se describe en el presente documento. Los valores de quinínogeno escindido y/o quinínogeno intacto pueden compararse con un valor de referencia tal como se describe en el presente documento. Si el valor de quinínogeno escindido/quinínogeno intacto se desvía del valor de referencia (por ejemplo, se eleva o se reduce), esto indica que un inhibidor de pKal puede ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, si los porcentajes de quinínogeno escindido se reducen después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento, puede constatarse que el tratamiento es eficaz. Como alternativa, si los porcentajes de quinínogeno intacto aumentan después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento, se constata que el tratamiento es eficaz.

En algunas formas de realización, el nivel de quinínogeno escindido y/o intacto puede medirse utilizando un reactivo de detección (por ejemplo un anticuerpo) que se une específicamente o bien a quinínogeno escindido o bien a quinínogeno intacto en comparación con la otra forma de quinínogeno. En algunos ejemplos, el anticuerpo se une específicamente a quinínogeno escindido en comparación con quinínogeno intacto. En otros ejemplos, el anticuerpo se une específicamente al extremo C-terminal de la cadena ligera de quinínogeno escindido.

Si se constata que la enfermedad es susceptible (puede tratarse mediante) a un inhibidor de pKal, el procedimiento puede comprender adicionalmente administrar al sujeto que padece la enfermedad una cantidad eficaz de un inhibidor de pKal, DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

### **Tratamiento**

Un sujeto en riesgo de padecer o que padece (por ejemplo, que tiene), un trastorno mediado por pKal o mediado por bradiquinina, identificado mediante cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, puede tratarse con cualquier agente terapéutico apropiado. En algunas formas de realización, los procedimientos proporcionados incluyen seleccionar un tratamiento para un sujeto basado en el resultado del ensayo proporcionado, por ejemplo la detección de un biomarcador.

En algunas formas de realización, el procedimiento comprende uno de entre seleccionar o administrar, o ambos, un agente terapéutico, por ejemplo, un agente de unión a calicreína tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un antagonista del receptor de bradiquinina B2 tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, un agente de reemplazo de C1-INH tal como se describe en el presente documento, para su administración al sujeto basándose en el resultado del ensayo, por ejemplo, la detección de un biomarcador.

En algunas formas de realización, se administra a un sujeto una proteína o un polipéptido de unión de calicreína plasmática. En algunas formas de realización, el agente de unión a calicreína es un inhibidor de calicreína, por ejemplo, un péptido, un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo de calicreína o un fragmento de los mismos. En algunas formas de realización, se administra a un sujeto un antagonista del receptor de bradiquinina B2. En algunas formas de realización, se administra a un sujeto un agente terapéutico de reemplazo de C1-INH.

El agente terapéutico, por ejemplo un inhibidor de calicreína, por ejemplo un antagonista del receptor de bradiquinina B2, por ejemplo un agente de reemplazo de C1-INH, puede administrarse junto con otro tratamiento como parte de una politerapia para el tratamiento de la enfermedad o la afección que implica actividad de calicreína plasmática y/o de bradiquinina. La politerapia, por ejemplo con uno o más de entre un inhibidor de calicreína, antagonista del receptor de bradiquinina B2 o agente de reemplazo de C1-INH, por ejemplo con uno o más de entre un inhibidor de calicreína, antagonista del receptor de bradiquinina B2 o agente de reemplazo de C1-INH y otro tratamiento, puede proporcionarse en múltiples configuraciones diferentes. El primer agente puede administrarse antes o después de la administración del otro tratamiento. En algunas situaciones, el primer agente y otro tratamiento (por ejemplo, un agente terapéutico) se administran concurrentemente, o en una proximidad temporal cercana (por ejemplo un intervalo de tiempo corto entre las inyecciones, tal como durante la misma sesión de tratamiento). El primer agente y el otro tratamiento también pueden administrarse a intervalos temporales más amplios.

#### *Agentes de unión a calicreína plasmática*

Los agentes de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, proteínas de unión, por ejemplo polipéptidos, por ejemplo polipéptidos inhibidores, por ejemplo anticuerpos, por ejemplo anticuerpos inhibidores, u otros agentes de unión, por ejemplo moléculas pequeñas) son agentes terapéuticos útiles para una diversidad de enfermedades y afecciones, por ejemplo, enfermedades y afecciones que implican actividad de calicreína plasmática. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la enfermedad o la afección que implica actividad de calicreína plasmática es angioedema hereditaria (HAE). En algunas formas de realización, se administra una proteína o un polipéptido de unión a calicreína plasmática a un sujeto en riesgo de padecer o que padece un trastorno mediado por pKal o mediado por bradiquinina.

Una serie de inhibidores proteicos útiles de calicreína, calicreína tisular y/o plasmática, incluye un dominio de Kunitz. Tal como se utiliza en el presente documento, un "dominio de Kunitz" es un dominio polipeptídico que tiene por lo menos 51 aminoácidos y que contiene por lo menos dos, y preferentemente tres, disulfuros. El dominio se pliega de forma que la primera y la sexta cisteínas, la segunda y la cuarta, y la tercera y la quinta cisteínas formen puentes disulfuro (por ejemplo, en un dominio de Kunitz que tiene 58 aminoácidos, las cisteínas pueden estar presentes en posiciones correspondientes a los aminoácidos 5, 14, 30, 38, 51 y 55, según el número de las secuencias homólogas de BPTI proporcionadas más adelante, y los disulfuros pueden formarse entre las cisteínas de la posición 5 y 55, 14 y 38, y 30 y 51), o, si hay presencia de dos disulfuros, pueden formarse entre un subconjunto correspondiente de cisteínas del mismo. El espaciado entre cisteínas respectivas puede ser de entre 7, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 aminoácidos del espaciado siguiente entre posiciones correspondientes a: 5 a 55, 14 a 38, y 30 a 51, según la numeración de la secuencia BPTI que se proporciona más adelante. La secuencia BPTI puede usarse como referencia para referirse a posiciones específicas en cualquier dominio de Kunitz genérico. La comparación de un dominio de Kunitz de interés con BPTI puede realizarse identificando el mejor ajuste de alineamiento en el que el número de cisteínas alineadas esté maximizado.

La estructura 3D (a alta resolución) del dominio de Kunitz de BPTI es conocida. Una de las estructuras de rayos X se deposita en el Brookhaven Protein Data Bank como "6PTI". La estructura 3D de algunos homólogos de BPTI (Eigenbrot *et al.*, (1990) Protein Engineering, 3(7):591-598; Hynes *et al.*, (1990) Biochemistry, 29:10018-10022) es conocida. Se conocen por lo menos ochenta y una secuencias de dominios de Kunitz. Los homólogos humanos conocidos incluyen tres dominios de Kunitz de LACI también conocido como inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) (Wun *et al.*, (1988) J. Biol. Chem. 263(13):6001-6004; Girard *et al.*, (1989) Nature, 338:518-20; Novotny *et al.*, (1989) J. Biol. Chem., 264(31):18832-18837), dos dominios de Kunitz de inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina, APP-I (Kido *et al.*, (1988) J. Biol. Chem., 263(34):18104-18107), un dominio de Kunitz de colágeno, tres dominios de Kunitz de TFPI-2 (Sprecher *et al.*, (1994) PNAS USA, 91:3353-3357), los dominios de Kunitz de inhibidor del activador del factor de crecimiento de hepatocitos de tipo 1, los dominios de Kunitz de inhibidor del activador del factor de crecimiento de hepatocitos de tipo 2, los dominios de Kunitz descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N° 2004-0152633. LACI es una fosfoglicoproteína sérica humana con un peso molecular de 39 kDa (secuencia de aminoácidos en la tabla 1) que contiene tres dominios de Kunitz.

**Tabla 1: Dominios de Kunitz naturales ejemplares**

LACI: (SEQ ID NO. 4)	<pre> 1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedeehitiit dtelpplklM 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC 101 KKMCTRDnan riiktltlqqe kpdfCfleed pgiCrgyitr yfynnqtkqC 151 erfkyggClg nmnfnfetlee CkniCedgpn gfgvdnygtq lnavnsltp 201 qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC 251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm </pre> <p>La secuencia de señal (1-28) está en mayúsculas y subrayada  LACI-K1 (50-107) está en mayúsculas  LACI-K2 (121-178) está subrayada  LACI-K3 (211-270) está en negrita</p>
BPTI (SEQ ID NO: 5)	<pre> 1 2 3 4 5 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 RPFDF_CLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGL_CQTFVYGG_CRAKRNFKSAED_CMRTC_GGA </pre>

Los dominios de Kunitz anteriores se refieren a LACI-K1 (residuos 50 a 107), LACI-K2 (residuos 121 a 178) y LACI-K3 (213 a 270). La secuencia de ADNc de LACI se indica en Wun *et al.* (J. Biol. Chem., 1988, 263(13):6001-6004). Girard *et al.* (Nature, 1989, 338:518-20) informan sobre estudios mutacionales en los que los residuos de PI de cada uno de los tres dominios de Kunitz estaban alterados. LACI-K1 inhibe el Factor VIIa (F.VIIa) cuando F.VIIa está completado al factor tisular y LACI-K2 inhibe el Factor Xa.

Las proteínas que contienen dominios de Kunitz ejemplares incluyen las siguientes, con los números de acceso de SWISS-PROT en paréntesis:

- A4\_HUMAN (P05067), A4\_MACFA (P53601), A4\_MACMU (P29216),
- A4\_MOUSE (P12023), A4\_RAT (P08592), A4\_SAISC (Q95241),
- AMBP\_PLEPL (P36992), APP2\_HUMAN (Q06481), APP2\_RAT (P15943),
- AXP1\_ANTAF (P81547), AXP2\_ANTAF (P81548), BPT1\_BOVIN (P00974),
- BPT2\_BOVIN (P04815), CA17\_HUMAN (Q02388), CA36\_CHICK (P15989),
- CA36\_HUMAN (P12111), CRPT\_BOOMI (P81162), ELAC\_MACEU (O62845),

ELAC\_TRIVU (Q29143), EPPI\_HUMAN (095925), EPPI\_MOUSE (Q9DA01),  
 HTIB\_MANSE (P26227), IBP\_CARCR (P00993), IBPC\_BOVIN (P00976),  
 IBPI\_TACTR (P16044), IBPS\_BOVIN (P00975), ICS3\_BOMMO (P07481),  
 5 IMAP\_DROFU (P11424), IP52\_ANESU (P10280), ISC1\_BOMMO (P10831),  
 ISC2\_BOMMO (P10832), ISH1\_STOHE (P31713), ISH2\_STOHE (P81129),  
 ISIK\_HELPO (P00994), ISP2\_GALME (P81906), IVB1\_BUNFA (P25660),  
 IVB1\_BUNMU (P00987), IVB1\_VIPAA (P00991), IVB2\_BUNMU (P00989),  
 IVB2\_DABRU (P00990), IVB2\_HEMHA (P00985), IVB2\_NAJNI (P00986),  
 IVB3\_VIPAA (P00992), IVBB\_DENPO (P00983), IVBC\_NAJNA (P19859),  
 10 IVBC\_OPHHA (P82966), IVBE\_DENPO (P00984), IVBI\_DENAN (P00980),  
 IVBI\_DENPO (P00979), IVBK\_DENAN (P00982), IVBK\_DENPO (P00981),  
 IVBT\_ERIMA (P24541), IVBT\_NAJNA (P20229), MCPI\_MELCP (P82968),  
 SBPI\_SARBU (P26228), SPT3\_HUMAN (P49223), TKD1\_BOVIN (Q28201),  
 TKD1\_SHEEP (Q29428), TXCA\_DENAN (P81658), UPTI\_PIG (Q29100),  
 15 AMBP\_BOVIN (P00978), AMBP\_HUMAN (P02760), AMBP\_MERUN (Q62577),  
 AMBP\_MESAU (Q60559), AMBP\_MOUSE (Q07456), AMBP\_PIG (P04366),  
 AMBP\_RAT (Q64240), IATR\_HORSE (P04365), IATR\_SHEEP (P13371),  
 SPT1\_HUMAN (043278), SPT1\_MOUSE (Q9R097), SPT2\_HUMAN (043291),  
 SPT2\_MOUSE (Q9WU03), TFP2\_HUMAN (P48307), TFP2\_MOUSE (035536),  
 20 FPI\_HUMAN (P10646), TFPI\_MACMU (Q28864), TFPI\_MOUSE (054819),  
 FPI\_RABIT (P19761), TFPI\_RAT (Q02445), YN81\_CAEEL (Q03610)

Puede usarse una diversidad de procedimientos para identificar un dominio de Kunitz a partir de una base de datos  
 de secuencias. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos conocida de un dominio de Kunitz, una secuencia de  
 25 consenso, o un motivo (por ejemplo el motivo ProSite Motif) pueden contrastarse con las bases de datos de  
 secuencias de GenBank (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda,  
 MD), por ejemplo, usando BLAST; con la base de datos Pfam de HMM (Modelos Ocultos de Markov) (por ejemplo,  
 usando parámetros por defecto para la búsqueda en Pfam; con la base de datos SMART o con la base de datos  
 ProDom. Por ejemplo, el número de acceso Pfam PF00014 de la Publicación 9 de Pfam proporciona numerosos  
 30 dominios de Kunitz y un HMM para identificar dominios de Kunitz. Una descripción de la base de datos Pfam puede  
 encontrarse en Sonhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28(3):405-420 y una descripción detallada de los HMM puede  
 encontrarse, por ejemplo, en Gribskov *et al.* (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159; Gribskov *et al.* (1987) *Proc. Natl.*  
*Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; y Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.*  
 2:305-314. La base de datos SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE) de HMM  
 35 tal como se describe por Schultz *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857 y Schultz *et al.* (2000) *Nucl. Acids*  
*Res* 28:231. La base de datos de SMART contiene dominios identificados mediante perfilado con los modelos de  
 ocultos de Markov del programa de búsqueda HMMer2 (R. Durbin *et al.* (1998) *Biological sequence analysis:*  
*probabilistic models of proteins and nucleic acids.* Cambridge University Press). La base de datos también está  
 anotada y supervisada. La base de datos de dominios proteicos ProDom consiste en una compilación automática de  
 40 dominios homólogos (Corpet *et al.* (1999) *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). Las versiones actuales de ProDom se  
 construyen usando búsquedas en PSI-BLAST recurrentes (Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-  
 3402; Gouzy *et al.* (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340.) de las bases de datos de proteínas SWISS-PROT  
 38 y TREMBL. La base de datos genera automáticamente una secuencia de consenso para cada dominio. Prosite  
 enumera el dominio de Kunitz como un motivo e identifica proteínas que incluyen un dominio de Kunitz. Véase, por  
 45 ejemplo, Falquet *et al.* *Nucleic Acids Res.* 30:235-238(2002).

Los dominios de Kunitz interactúan con proteasa diana usando, principalmente, aminoácidos de dos regiones bucle  
 ("bucles de unión"). La primera región bucle se encuentra aproximadamente entre los residuos correspondientes a  
 50 los aminoácidos 13-20 de BPTI. La segunda región bucle se encuentra aproximadamente entre los residuos  
 correspondientes a los aminoácidos 31-39 de BPTI. Una biblioteca ejemplar de dominios de Kunitz varía una o más  
 posiciones de aminoácidos en la primera y/o la segunda regiones bucle. Las posiciones particularmente útiles para  
 variar, cuando se criba para obtener dominios de Kunitz que interactúan con calicreína o cuando se seleccionan  
 para determinar variantes de afinidad mejorada incluyen: posiciones 13, 15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 y 39 con  
 respecto a la secuencia de BPTI. Se espera que por lo menos algunas de estas posiciones estén en contacto  
 55 estrecho con la proteasa diana. También es útil variar otras posiciones, por ejemplo, posiciones que son adyacentes  
 a las posiciones mencionadas anteriormente en la estructura tridimensional.

La "región estructural" de un dominio de Kunitz se define como aquellos residuos que son una parte del dominio de  
 Kunitz, pero excluyendo específicamente residuos de las primera y segunda regiones bucles de unión, es decir,  
 60 aproximadamente los residuos correspondientes a los aminoácidos 13-20 de BPTI y 31-39 de BPTI. Inversamente,  
 los residuos que no se encuentran en el bucle de unión pueden tolerar un intervalo más amplio de sustituciones de  
 aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas y/o no conservativas).

En una forma de realización, estos dominios de Kunitz son formas variantes de la estructura en bucle incluido el  
 65 dominio de Kunitz 1 de la proteína inhibidora de la coagulación asociada a lipoproteína (LACI) humana. La LACI  
 contiene tres estructuras de bucle peptídicas internas bien definidas que son paradigma de dominios de Kunitz

(Girard, T. *et al.*, 1989. Nature, 338:518-520). Las variantes del dominio de Kunitz 1 de LACI descritas en el presente documento se han cribado, aislado y unido a calicreína con una afinidad y especificidad potenciadas (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.795.865 y 6.057.287). Estos procedimientos también pueden aplicarse a otros marcos estructurales de dominios de Kunitz para obtener otros dominios de Kunitz que interactúan con calicreína, por ejemplo, calicreína plasmática. Los moduladores útiles de calicreína actúan normalmente uniéndose a y/o inhibiendo la calicreína, tal como se determina usando ensayos de unión e inhibición de calicreína.

En algunos aspectos, un agente de unión a calicreína (por ejemplo una proteína de unión, por ejemplo un polipéptido, por ejemplo polipéptidos inhibidores, por ejemplo un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo inhibidor, u otro agente de unión, por ejemplo una molécula pequeña) se une a la forma activa de calicreína plasmática. En algunas formas de realización, el agente de unión a calicreína, se une a, e inhibe, la calicreína plasmática, por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína murina.

Las proteínas de unión a calicreína plasmática pueden ser de longitud completa (por ejemplo, una IgG (por ejemplo una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por ejemplo, IgA1, IgA2), IgD e IgE) o pueden incluir solo un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')<sub>2</sub> o scFv). La proteína de unión puede incluir dos inmunoglobulinas de cadena pesada y dos inmunoglobulinas de cadena ligera, o puede ser un anticuerpo monocatenario. Las proteínas de unión a calicreína plasmática pueden ser proteínas recombinantes tales como anticuerpos humanizados, injertados a CDR, quiméricos, desinmunizados o generados *in vitro* y pueden incluir opcionalmente regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal. En una forma de realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo monoclonal.

En algunas formas de realización, la proteína de unión a calicreína se une a, e inhibe, la calicreína plasmática, por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína murina. En la publicación de Estados Unidos N° 20120201756 se divulgan proteínas de unión a calicreína plasmática ejemplares. En algunas formas de realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es un anticuerpo (por ejemplo un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligera y/o pesada de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (también denominado en el presente documento DX-2922), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01 (también denominado en el presente documento DX-2930), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas formas de realización, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítoto que M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (también denominado en el presente documento DX-2922), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01 (también denominado en el presente documento DX-2930), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas formas de realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es DX-2930.

A continuación se proporcionan las secuencias de la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de DX-2930.

Región variable de cadena pesada de DX-2930:

```
EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLVWVSGIYSSGGITVYADSVKGRF
TISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVTVSS (SEQ ID NO:
6)
```

Región variable de cadena ligera de DX-2930:

```
DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESQVPSRFSGSGSG
TEFTLTISSLQPDFATYYCQYNTYWTFGQGTKVEI (SEQ ID NO: 7)
```

En algunos aspectos, un polipéptido de unión a calicreína (por ejemplo, polipéptido inhibidor) se une a la forma activa de calicreína plasmática. En la patente de Estados Unidos N° 5.795.865, la patente de Estados Unidos N° 5.994.125, la patente de Estados Unidos N° 6.057.287, la patente de Estados Unidos N° 6.333.402, la patente de Estados Unidos N° 7.628.983 y la patente de Estados Unidos N° 8.283.321, la patente de Estados Unidos N° 7.064.107, la patente de Estados Unidos N° 7.276.480, la patente de Estados Unidos N° 7.851.442, la patente de Estados Unidos N° 8.124.586, la patente de Estados Unidos N° 7.811.991 y la publicación de Estados Unidos N° 20110086801 se divulgan agentes de calicreína plasmática polipeptídicos ejemplares. En algunas formas de realización, el polipéptido de unión a calicreína es DX-88 (un inhibidor de calicreína de origen no natural, también conocido como KALBITOR® (ecalantida), SEQ ID NO: 8). En algunas formas de realización, el inhibidor de calicreína comprende o consiste en una secuencia de aproximadamente 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de la SEQ ID NO: 8 o el polipéptido DX-88 que tiene la secuencia de 60 aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His  
 Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys  
 Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg  
 Asp (SEQ ID NO:8)

5 En algunas formas de realización, la proteína de unión a calicreína plasmática es EPIKAL-2 (SEQ ID NO: 9), que es un inhibidor de calicreína de origen no natural que tiene una secuencia de 58 residuos de aminoácidos (correspondiente a los residuos 3-60 de SEQ ID NO: 8) y que tiene sustituciones de aminoácidos de Ile a Ser en el residuo 34 y Glu a Gly en el residuo 39. La secuencia de EPIKAL-2 se muestra a continuación:

EpiKal2: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala  
 His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly  
 Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr  
 Arg Asp (SEQ ID NO:9)

10 En algunas formas de realización, una proteína de unión de calicreína plasmática puede tener aproximadamente el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia con respecto a la proteína de unión descrita en el presente documento. En algunas formas de realización, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia en las regiones estructurales de HC y/o LC (por ejemplo, FR 1, 2, 3 y/o 4 de HC y/o LC) con respecto a una proteína de unión descrita en el presente documento. En algunas formas de realización, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia en las CDR de HC y/o LC (por ejemplo, CDR 1, 2 y/o 3 de HC y/o LC) con respecto a una proteína de unión descrita en el presente documento. En algunas formas de realización, una proteína de unión de calicreína plasmática puede tener aproximadamente el 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad de secuencia en la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3 y/o CL1) con respecto a la proteína de unión descrita en el presente documento.

25 En algunos aspectos, una molécula pequeña se une a la forma activa de calicreína plasmática.

*Antagonistas del receptor de bradiquinina B2*

30 En algunas formas de realización, se administra a un sujeto un antagonista del receptor de bradiquinina B2. Los antagonistas del receptor de bradiquinina B2 ejemplares incluyen incatibant (Firazyr®), que es un fármaco peptidomimético que contiene 10 aminoácidos que bloquean la unión de bradiquinina nativa al receptor de bradiquinina B2.

*Agentes de reemplazo de C1-INH*

35 En algunas formas de realización, se administra a un sujeto un agente de reemplazo de C1-INH. Los agentes de reemplazo de C1-INH están disponibles públicamente e incluyen, por ejemplo, Berinert®, que es un concentrado de C1-INH nanofiltrado, pasteurizado, humano purificado.

**EJEMPLOS**

40 **Ejemplo 1: Quininógeno escindido**

45 Sobre la base del análisis del sistema de contacto, el quinínógeno escindido es un biomarcador adecuado para medir la activación del sistema de contacto. Se ha demostrado previamente que el quinínógeno escindido aumenta durante ataques de HAE, en cirrosis), y como consecuencia de la activación del sistema de contacto durante la sepsis. Se cribaron bibliotecas de presentación en fagos de anticuerpos frente al quinínógeno escindido en combinación con depleción sobre quinínógeno intacto. Paralelamente se inmunizaron ratones con quinínógeno escindido y anticuerpos monoclonales obtenidos de líneas celulares de hibridoma. Ambas actividades proporcionaron una serie de anticuerpos monoclonales diferentes que se unieron a quinínógeno escindido y quinínógeno intacto, pero ningún anticuerpo que se unió solo a quinínógeno escindido.

55 Se cribaron una serie de anticuerpos para determinar su adecuabilidad en un análisis por inmunotransferencia Western y se identificaron algunos que operaban bien, que incluyen el mAb de ratón (clon 11H05) mostrado en la figura 2. Es evidente que este ensayo es capaz de detectar quinínógeno escindido en muestras de plasma humano. Además, los datos de la figura 2 confirman que la recogida de plasma en vidrio es suficiente para prevenir la

activación de contacto y la escisión del quininógeno.

También puede usarse un enfoque basado en espectrometría de masas para detectar quininógeno escindido en plasma de pacientes. En este enfoque, un producto inmunitario adsorbe quininógeno de la muestra del paciente, digiere proteolíticamente el quininógeno eluido y analiza fragmentos peptídicos por LC-MC.

### Ejemplo 2: Quininógeno intacto y escindido

Se usó un análisis por inmunotransferencia Western para demostrar que el plasma de un paciente obtenido durante un ataque y recogido en tubos para plasma con citrato que contenían un cóctel de antiproteasas muestra una reducción en la cantidad de quininógeno intacto (es decir, monocatenario) (figura 3). Se observó un aumento en quininógeno escindido (es decir, bicatenario).

### Ejemplo 3: Ensayo para medir niveles de quininógeno escindido

Se optimizó adicionalmente un ensayo por inmunotransferencia Western para la detección de quininógeno de alto peso molecular (HMWK) intacto (monocatenario) y escindido (bicatenario) usando detección Li-cor. Este ensayo descrito en el presente documento usa un anticuerpo monoclonal de ratón (clon 11H05) que se generó mediante tecnología de hibridoma inmunizando animales con HMWK bicatenario y cribando fusiones de hibridoma frente a HMWK monocatenario y bicatenario por ELISA. El mAb 11H05 se seleccionó basándose en su rendimiento en un ensayo de inmunotransferencia Western y su capacidad para unirse específicamente a la cadena ligera y no unirse a la cadena pesada de HMWK. Se prefieren los que se unen a la cadena ligera debido a que la cadena ligera no está presente en el otro quininógeno plasmático (quininógeno de bajo peso molecular, LMWK), que no es un sustrato de pKal. El ensayo se usó también para demostrar la importancia de la recogida de plasma en tubos de plástico dado que la recogida en tubos de vidrio dio como resultado la activación del sistema de contacto (figura 4).

En algunos ejemplos, se usaron los materiales y las condiciones siguientes en el ensayo de inmunotransferencia Western en el presente documento:

#### **Materiales**

- Minicelda XCell SureLock® Mini-Cell, Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. EI0001
- Caja de gel (gel box)/fuente de alimentación
- Dispositivo de inmunotransferencia Western iBlot®, Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. IB1001
- Pila de transferencia iBlot®, nitrocelulosa, mini, Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. IB301001
- Pipeta de múltiples canales de Matrix Laboratories Impact-2, o equivalente
- Rainin Pipetman, intervalos de volumen variados, Rainin, N° de cat.: P-10, P-20, P-100, P-200 y P-1000, o equivalente
- Congelador a -80 °C con registrador gráfico
- Congelador a -20 °C con registrador gráfico
- Refrigerador a 2-8 °C con registrador gráfico
- Sistemas de filtro de polietersulfona (PES) de 0,22 µm, Corning, N° de cat. 431096 o equivalente
- Agua desionizada y purificada (agua DI), Ricca Chemical, N° de cat. 9150-5, o equivalente
- Geles NuPAGE de tris-acetato al 7 %, 15 pocillos, Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. EA03555Box
- Tampón de procesamiento SDS tris-acetato (20X), Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. LA0041
- Agente reductor de muestra NuPAGE (10X), Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. NP0009
- Tampón de muestra NuPAGE (4X), Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. NP0007
- Geles NuPAGE de Bis-Tris al 4-12 %, 15 pocillos, Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. NP0336BOX
- Tampón de procesamiento MES SDS (20X), Life Technologies (Invitrogen), N° de cat. NP0002

- Tampón de bloqueo Odyssey, LI-COR, N° de cat. 927-40000
- Tween20, Sigma, N° de cat. P1379
- 5 • Solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4, Sigma, N° de cat. P-3813 o equivalente
- Tris, Fisher Scientific, N° de cat. T393-5000
- Cloruro de sodio, JT Baker, N° de cat. 3624-19
- 10 • Ácido clorhídrico 6 N, EMD, N° de cat. HX0603M-6
- Tampón de acetato de sodio 3 M, pH 5,2, Teknova, N° de cat. S0296
- 15 • Albúmina serica bovina (BSA), exenta de IgG y proteasa, Jackson ImmunoResearch, N° de cat. 001-000-162
- Clon de anticuerpo anti-LC de HMWK monoclonal de ratón, Clon 11H05 (N° 16), 1,4 mg/ml, Dyax
- IRDye 680RD antirratón de cabra, LI-COR, N° de cat. 926-68070
- 20 • Marcadores de peso molecular de un color Odyssey, LI-COR, N° de cat. 928-40000
- Cóctel inhibidor de antiproteasas (10X), proporcionado por Dyax
- 25 • Factor XIIa, 1,47 mg/ml (21,6 µM), Enzyme Research Labs, proporcionado por Dyax
- Plasma deficiente en quininógeno, Hyphen-Biomed, proporcionado por Dyax
- HMWK monocatenario, 1,61 mg/ml, Enzyme Research Labs, N° de cat. HK 2700
- 30 • HMWK bicatenario, 2,01 mg/ml, Enzyme Research Labs, N° de cat. HK 2362
- Muestras de plasma humano normal, muestras de pacientes con HAE y muestras de Bioreclamation proporcionadas por Dyax
- 35 • DX2930, Dyax, N° de lote: PURDX1-L01, 32,1 mg/ml
- DX88, Dyax, N° de lote: B2007-029, 10,1 mg/ml

40 **Esquema del protocolo:**

Preparación de muestra de ensayo no reducida	Se prepararon muestras de ensayo no reducidas añadiendo 5 µl de 4X tampón de muestra a 15 µl de muestras de ensayo a ~5 %. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos. Las muestras se centrifugaron brevemente para eliminar cualquier tipo de condensación de la tapa del tubo de microcentrifugación de la muestra de ensayo.
Carga y procesamiento de gel	Se procesaron muestras reducidas usando geles Bis-Tris al 4-12 % y se procesaron muestras no reducidas usando geles de Tris-acetato al 7 %. Se carga un marcador proteico de un color en el carril 1 de cada gel. Se carga una muestra QC en el carril 2 de cada gel. Se cargan muestras de ensayo reducidas y no reducidas en los carriles 3-15 del tipo de gel apropiado. Los geles se procesan a 125 V durante ~75 minutos.
Transferencia de gel	Cada gel se transfiere a una membrana de microcelulosa usando las pilas de transferencia iBlot, mini y el iBlot. Después de añadir el gel y la pila de transferencia al iBlot, se selecciona el programa P0 y se procesa durante ~7 minutos. Después de completar la transferencia, la membrana se transfiere a una bandeja de plástico que contiene 20 ml de tampón de bloqueo Odyssey.
Bloqueo de membrana	Las membranas se bloquean con 20 ml de tampón de bloqueo Odyssey. Las membranas se incuban con tampón de bloqueo sobre un agitador de placa durante 1 hora.

Preparación y adición de mAb anti-LC de HMWK de ratón	Se diluye mAb anti-LC de HMWK de ratón a 1 µg/ml en tampón de bloqueo Odyssey que contiene el 0,2 % de Tween-20. El tampón de bloqueo se descarta de cada membrana. Se añade un volumen de 20 ml de la solución de anticuerpo primario a 1 µg/ml a cada membrana y las membranas se incuban sobre un agitador de placa durante 1 hora a temperatura ambiente.
Preparación y adición de IRDye 680 antirratón de cabra	Se prepara IRDye 680 antirratón de cabra a una dilución de 1:15.000. El IRDye 680 antirratón de cabra se prepara inicialmente a una dilución de 1:10 seguida de 1:1.500 para una dilución final de 1:15.000. El IRDye 680 antirratón de cabra se prepara en tampón de bloqueo Odyssey que contiene el 0,2 % de Tween-20. La solución de anticuerpo secundario se añade a cada membrana y las membranas se incuban sobre un agitador de placa durante 1 hora a temperatura ambiente.
Lectura de la membrana	Después de enjuagar con PBS, las membranas se disponen sobre el Li-Cor Odyssey y las membranas se leen.
Lavado de la membrana	Las membranas se lavan con PBS que contiene el 0,1 % de Tween-20 durante 5 minutos por lavado durante un total de cuatro lavados después de la incubación de anticuerpo primario y la incubación de anticuerpo secundario.

5 Para evaluar la capacidad de mAb 11H05 para detectar HMWK monocatenario y bicatenario, las proteínas purificadas se añadieron a plasma deficiente en HMWK en concentraciones que incluyen niveles observados en plasma normal (figura 5). Fue evidente que en condiciones reductoras, 11H05 detecta HMWK monocatenario con una sensibilidad superior al bicatenario. Contando con la sensibilidad diferencial del mAb para las dos formas de HMWK, este ensayo pudo usarse para cuantificar con exactitud la concentración de HMWK monocatenario y bicatenario en plasma del paciente. Como alternativa, el porcentaje de la señal del bicatenario puede determinarse en muestras de plasma sospechosas de implicar activación de contacto y se compara con el del plasma de individuos sanos normales. Usando este último enfoque, el ensayo pudo usarse para cribar muestras de diferentes enfermedades e identificar enfermedades asociadas con la activación del sistema de contacto.

10 También se realizaron ensayos de precisión y exactitud inter e intra-ensayo. Tanto en condiciones no reductoras como en condiciones reductoras, el ensayo se realizó de forma aceptable produciendo porcentajes de valores CV ≤ 25 % a lo largo de todos los parámetros analizados.

15 Se realizaron también ensayos de estabilidad de congelación-descongelación en plasma humano normal. Se determinó que el HMWK no parece degradarse entre 0 y 3 ciclos de congelación-descongelación.

20 El ensayo de inmunotransferencia Western se validó usando muestras de plasma de pacientes con angioedema hereditario (HAE), una enfermedad que se sabe que está provocada por un exceso de activación del sistema de contacto y de actividad de pKal. Tal como se muestra en la figura 6, el porcentaje de HMWK escindido en plasma con HAE es aproximadamente el 20 %, que es significativamente superior al de plasma normal. Durante un ataque de HAE, el porcentaje de HMWK escindido detectado usando este ensayo está más elevado. Estos datos demuestran claramente el aumento de HMWK escindido en plasma de HAE durante el estado de enfermedad quiescente (basal). Por lo tanto, el ensayo pudo usarse para supervisar la eficacia de inhibidores de pKal terapéuticos mediante una evaluación del grado al que restauran niveles normales de quininógeno escindido.

25 Se sabe que las superficies o partículas cargadas negativamente tales como fosfolípidos o polifosfatos son activadores eficaces del sistema de contacto, que conduce a la formación de pKal activo y la generación de la bradiquinina a partir de la proteólisis de HMWK monocatenario. La identidad de la superficie fisiológica que conduce a la activación del sistema de contacto en ataques de HAE no se conoce. No obstante, los ataques de HAE están asociados con la generación de FXIIa. El uso de FXIIa como iniciador del sistema de contacto, más que de sustancias cargadas tales como sulfato de dextrano o caolín, posibilita una activación del sistema de contacto más reproducible y un rendimiento del ensayo optimizado. La concentración de FXIIa y las condiciones de reacción se determinaron para aproximar el porcentaje de quininógeno escindido que se observa en pacientes con HAE (~20-35 50 %) (figura 7, tabla 1).

Tabla 1 – Intensidades de señal Li-cor de muestras de plasma humano tratado con FXIIa\*

Comparación reducida de condiciones de activación de factor XIIa								
Conc. de FXIIa (nM)	Temp. de incubación	Tiempo de incubación (min)	Monocatenario	Bicatenario (56 kDa)	Bicatenario (46 kDa)	Señal total	% de bicatenario en el carril	% de bicatenario a partir de la señal sin tratar
0	N/A	N/A	29500	202	300	30002	1,7 %	N/A
2,5	37 °C	10	21900	4010	2370	28280	22,6 %	25,8 %
2,5	37 °C	30	19500	4240	2370	26110	25,3 %	33,9 %
2,5	Hielo	10	20900	447	1220	22567	7,4 %	29,2 %
2,5	Hielo	30	8160	3380	3950	15490	47,3 %	72,3 %
5	37 °C	10	9020	4070	2950	16040	43,8 %	69,4 %
5	37 °C	30	8480	4070	3770	16320	48,0 %	71,3 %
5	Hielo	10	13300	3270	2780	19350	31,3 %	54,9 %
5	Hielo	30	2220	5220	9420	16860	86,8 %	92,5 %
7,5	37 °C	10	4200	5610	6920	16730	74,9 %	85,8 %
7,5	37 °C	30	4530	6310	7560	18400	75,4 %	84,6 %
7,5	Hielo	10	12100	2510	2520	17130	29,4 %	59,0 %
7,5	Hielo	30	260	4340	12300	16900	98,5 %	99,1 %

% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total

% de bicatenario a partir de la señal sin tratar:

1 - (señal de monocatenario tratada/señal de monocatenario sin tratar)

\*Análisis de señal de muestras a partir de inmunotransferencia Western en la figura 5.

5 Usando una concentración de FXIIa 2,5 nM y condiciones de reacción optimizadas, se examinó plasma humano normal de 15 varones y 15 mujeres en presencia o ausencia de 10 µg/ml de DX-2930 (un anticuerpo inhibidor potente de la actividad de pKal) y se determinó el porcentaje de HMWK bicatenario (tabla 2). Es evidente que el ensayo es capaz de detectar la inhibición de la calicreína plasmática de proteólisis de HMWK en plasma. Se mostró que DX-2930 presenta una potencia aproximadamente equivalente en este ensayo a la ecalantida, un inhibidor de pKal aprobado para el tratamiento de ataques de HAE (figura 8). Una potencia igual a la de ecalantida en este ensayo *in vitro* sugiere que niveles de fármaco equivalentes pueden ser igualmente eficaces en HAE.

Tabla 2. Porcentaje promedio de bicatenario en el carril, valores reducidos y no reducidos\*

Muestra	Porcentaje promedio de bicatenario en el carril			
	XIIa (nM)	DX2930 (µg/ml)	Reducidos	No reducidos
Promedio varones	0	0	16,1 %	32,0 %
	2,5	0	42,0 %	61,2 %
	2,5	10	29,5 %	43,6 %
Promedio mujeres	0	0	9,6 %	21,5 %
	2,5	0	43,8 %	50,2 %
	2,5	10	26,4 %	30,3 %

15 \*Promedio de plasma a partir de 15 varones y 15 mujeres.

También se analizaron muestras de pacientes con colitis ulcerosa (UC) y artritis reumatoide (RA) usando el ensayo de inmunotransferencia de Western. Las muestras de plasma de pacientes se obtuvieron de Bioreclamation y se recogieron en tubos de plástico en anticoagulante. Se encontró que el porcentaje de quinínogeno escindido era elevado tanto en pacientes con UC como con RA en comparación con pacientes de control normales (figura 9, tabla

20

3).

Tabla 3. Resumen del análisis por inmunotransferencia Western de muestras con colitis ulcerosa y artritis reumatoide

5

Carril	Muestras en estado de enfermedad reducido en K2EDTA y citrato de sodio, colitis ulcerosa y artritis reumatoide							
	Muestra	Anticoagulante	Enfermedad	Señal de HMWK				% de bicitenarrio en el carril
				Monocatenario (110 kDa)	Bicitenarrio (56 kDa)	Bicitenarrio (46 kDa)	Señal total	
1	Patrones de peso molecular	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Patrones de monocatenario y bicitenarrio	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	A3005, N17	Antiproteasa	Normal	20500	775	366	21641	5,3 %
4	BRH745075	Citrato de sodio	Normal	18700	1340	802	20842	10,3 %
5	BRH745056	Citrato de sodio	Normal	24200	893	782	25875	6,5 %
6	BRH715036	K2EDTA	Colitis ulcerosa	17400	3030	1340	21770	20,1 %
7	BRH715037	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	17400	1220	694	19314	9,9 %
8	BRH715038	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	N/A	2140	10300	12440	100,0 %
9	BRH715039	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	14100	1700	596	16396	14,0 %
10	BRH715040	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	13300	1170	2070	16540	19,6 %
11	BRH715041	K2EDTA	Artritis reumatoide	N/A	N/A	4950	4950	100,0 %
12	BRH715042	K2EDTA	Artritis reumatoide	88	N/A	9250	9338	99,1 %
13	BRH715043	K2EDTA	Artritis reumatoide	N/A	N/A	6900	6900	100,0 %
14	BRH715044	Citrato de sodio	Artritis reumatoide	N/A	N/A	2850	2850	100,0 %
15	BRH715045	Citrato de sodio	Artritis reumatoide	6600	1860	1520	9980	33,9 %

También se analizaron muestras de pacientes con enfermedad de Crohn (CD) usando el ensayo de inmunotransferencia Western. Las muestras de plasma de pacientes se obtuvieron de Bioreclamation y se recogieron en tubos de plástico en anticoagulante. Se encontró que el porcentaje de quinínogeno escindido era elevado en pacientes con CD en comparación con pacientes de control normales (figura 10, tabla 4).

10

Tabla 4. Resumen del análisis por inmunotransferencia Western de muestras con enfermedad de Crohn

Carril	Muestras en estado de enfermedad reducido en K2EDTA y citrato de sodio, colitis ulcerosa y artritis reumatoide								
	Muestra	Anticoagulante	Enfermedad	Señal de HMWK					% de bicatenario en el carril
				Monocatenario (150 kDa)	Monocatenario (110 kDa)	Bicatenario (56 kDa)	Bicatenario (46 kDa)	Señal total	
1	Patrones de peso molecular	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	Patrones de monocatenario y bicatenario	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	A2992, N14	Citrato de sodio	Normal	704	12900	384	576	14564	6,6 %
4	BRH745047	Citrato de sodio	Normal	1560	5820		192	7572	2,5 %
5	BRH745076	Citrato de sodio	Normal	5720	12300	382	480	18882	4,6 %
6	BRH715026	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	12100	1230	1950	15280	20,8 %
7	BRH715027	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	16300	668	1550	18518	12,0 %
8	BRH715028	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	6650	504	2250	9404	29,3 %
9	BRH715029	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	1900	14100	N/A	680	16680	4,1 %
10	BRH715030	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	1320	3230	6020	10570	87,5 %

**Ejemplo 4: Efectos de FXIIa y DX2930 sobre muestras de plasma humano normal (NHP)**

5

*Propósito:*

El propósito de este experimento era determinar los efectos de DX-2930 sobre la activación del sistema de contacto por FXIIa. El DX2930 puede inhibir la calicreína plasmática, reduciendo la relación bicatenario a monocatenario medida en respuesta al tratamiento con FXIIa. Las muestras de NHP en citrato de sodio de cinco varones y cinco mujeres se analizaron sin tratar, después de activación con FXIIa y después de activación con FXIIa cuando las muestras se habían pretratado con 10 µg/ml de DX-2930. Cada serie de muestras se analizó en condiciones no reducidas y reducidas.

10

*Procedimiento:*

15

## Preparación de la muestra

20

1. Se retiraron muestras de NHP del almacenamiento en congelación y se dejaron estabilizar a temperatura ambiente. Se analizaron las muestras de NHP siguientes: BRH745050, BRH745051, BRH745052, BRH745053 y BRH745054. Se analizaron las muestras de mujeres siguientes: BRH745065, BRH745066, BRH745067, BRH745068 y BRH745069.

25

2. Se preparó DX2930 a 215 µg/ml añadiendo 3,35 µl de la solución madre de DX2930 (Nº de lote: PURDX1-L01, 32,1 mg/ml) a 496,65 µl de 1X TBS.

30

3. Se preparó un intermedio 1:10 de la solución de FXIIa añadiendo 5 µl de la solución madre de FXIIa (25.300 nM) a 45 µl de TBS. Se preparó una solución de FXIIa 56,25 nM añadiendo 4,45 µl del intermedio 1:10 a 195,55 µl de TBS.

4. Cada una de las muestras de NHP se preparó con 10 µg/ml de DX2930 añadiendo 2 µl de la solución de DX2930 de 215 µg/ml a 41 µl de NHP.

35

5. Cada una de las muestras de NHP se preparó con 2,5 nM de FXIIa añadiendo 2 µl de la solución 56,25 nM de FXIIa a 43 µl de cada una de las muestras de NHP, con o sin DX2930.

## ES 2 692 408 T3

6. Las muestras se incubaron con FXIIa a 37 °C durante 10 minutos. La reacción se detuvo añadiendo 5 µl de 10X inhibidores de antiproteasa.
- 5 7. Cada una de las muestras de NHP, con FXIIa, con DX2930 y FXIIa, y la muestra no tratada se diluyeron en plasma al 5 % añadiendo 5 µl de la muestra a 95 µl de TBS.
8. Se prepararon las muestras de ensayo no reducidas añadiendo 5 µl de 4X tampón de muestra a 15 µl de muestra.
- 10 9. Las muestras reducidas se prepararon añadiendo 5 µl del 4X tampón de muestra y 2 µl de 10X agente reductor a 13 µl de muestra.
10. Todas las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos usando un bloque calentador.
- 15 Carga, procesamiento y transferencia de gel
  1. Se preparó un volumen de 1 l de tampón de procesamiento 1X Tris-Acetato SDS añadiendo 50 ml de tampón de procesamiento 20X Tris-Acetato SDS a 950 ml de agua DI.
  - 20 2. Se preparó un volumen de 1 l de tampón de procesamiento 1X MES añadiendo 50 ml de tampón de procesamiento 20X MES SDS a 950 ml de agua DI.
  3. Se preparó tampón de ensayo (tampón de bloqueo Odyssey con el 0,2 % de Tween) añadiendo 1 ml de Tween-20 a 499 ml de tampón de bloqueo Odyssey.
  - 25 4. Se preparó tampón de lavado (PBS con el 0,1 % de Tween) añadiendo 1 paquete de PBS y 1 ml de Tween-20 a 900 ml de agua DI. La solución se mezcló bien y se llevó a 1 l usando agua DI. La solución final se filtró a través de un sistema de filtración PES 0,22 µM.
  - 30 5. Un volumen de 4 µl de un marcador proteico de un color se añadió al carril 1 de dos geles.
  6. Se añadieron volúmenes de 13 µl de muestras no reducidas a los carriles apropiados de un gel de Tris-Acetato al 7 %.
  - 35 7. Se añadieron volúmenes de 13 µl de muestras reducidas a los carriles apropiados de un gel de Bis-Tris al 4-12 %.
  8. Los geles se procesaron a 125 voltios durante ~75 minutos.
  - 40 9. Cada gel se transfirió individualmente a una membrana usando las minipilas de transferencia de iBlot y el programa P0 del sistema de transferencia iBlot.
  10. Cada membrana se transfirió a una bandeja de plástico que contenía 20 ml de tampón de bloqueo Odyssey. Las membranas se incubaron en tampón de bloqueo Odyssey sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.
  - 45 11. Se preparó una solución de anticuerpo primario de 1 µg/ml añadiendo 28,58 µl de mAb anti-HMWK de ratón, clon N° 11H05, 1,4 mg/ml a 29.971,42 µl de tampón de ensayo.
  - 50 12. El tampón de bloqueo se retiró de las bandejas de plástico. Se añadió un volumen de 20 ml de la solución de anticuerpo primario a cada bandeja y las membranas se incubaron sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.
  13. Un intermedio 1:10 de IRDye 680 anti-IgG de ratón de cabra se preparó añadiendo 5 µl de IRDye 680 de IgG antirratón de cabra a 45 µl de tampón de ensayo. La solución de anticuerpo secundario se preparó a una dilución de 1:15.000 añadiendo 26,66 µl del intermedio 1:10 de IRDye 680 de anti-IgG de ratón de cabra a 39.973,34 µl de tampón de ensayo.
  - 55 14. La solución de anticuerpo primario se retiró de las bandejas.
  - 60 15. Cada membrana se lavó durante cinco minutos con 20 ml de tampón de lavado y después la solución de lavado se descartó. El lavado se repitió durante un total de 4 lavados.
  - 65 16. Se añadió un volumen de 20 ml de la solución de anticuerpo secundario a cada bandeja y las membranas se incubaron sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

17. La solución de anticuerpo secundario se retiró de las bandejas.

18. Cada membrana se lavó durante cinco minutos con 20 ml de tampón de lavado y después la solución de lavado se descartó. El lavado se repitió durante un total de 4 lavados.

19. Cada membrana se enjuagó con PBS durante 5 minutos.

20. Las membranas se escanearon usando Li-cor Odyssey CLx.

**Resultados:**

Las tablas 5 y 6 contienen los datos de muestras no reducidas. Las tablas 7 y 8 contienen los datos de muestras reducidas. El porcentaje de HMWK escindido se calculó usando dos procedimientos. El porcentaje de bicatenario en el carril se determinó usando la ecuación siguiente: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total. El porcentaje de bicatenario de la señal no tratada se determinó usando la fórmula siguiente: 1 - (señal de monocatenario tratada/señal de monocatenario no tratada). Las muestras tratadas y no tratadas se prepararon de forma ligeramente diferente, dado que las muestras no tratadas tenían un porcentaje ligeramente superior de plasma en la preparación de muestra. Por lo tanto, las muestras no tratadas produjeron señales en general ligeramente superiores que las muestras tratadas. El porcentaje de valor de bicatenario en el carril se usó para determinar el porcentaje de HMWK escindido debido a la preparación de muestra ligeramente diferente entre muestras tratadas y no tratadas.

La tabla 16 contiene un resumen de los resultados de activación y de inhibición. En condiciones reducidas, las muestras no tratadas de NHP de varones y mujeres contenían un promedio del 16,1 % y del 9,6 % de HMWK escindido respectivamente. Las muestras de NHP de varones y mujeres tratadas con FXIIa contenían un promedio del 42,0 % y el 43,8 % de HMWK escindido, respectivamente. Las muestras de NHP de varones y mujeres pretratadas con DX-2930 y tratadas después con FXIIa contenían un promedio del 29,5 % y el 26,4 % de HMWK escindido, respectivamente.

En condiciones no reducidas, las muestras no tratadas de NHP de varones y mujeres contenían un promedio del 32,0 % y del 21,5 % de HMWK escindido respectivamente. Las muestras de NHP de varones y mujeres tratadas con FXIIa contenían un promedio del 61,2 % y el 50,2 % de HMWK escindido, respectivamente. Las muestras de NHP de varones y mujeres pretratadas con DX-2930 y tratadas después con FXIIa contenían un promedio del 43,6 % y el 30,3 % de HMWK escindido, respectivamente.

**Conclusión:**

El tratamiento de muestras de NHP con FXIIa aumentó el porcentaje de HMWK escindido en comparación con muestras no tratadas. Las muestras de NHP que se pretrataron con DX-2930, operación seguida de la activación con FXIIa, produjeron menos HMWK escindido que las muestras tratadas con solo FXIIa, pero un porcentaje ligeramente superior de HMWK escindido en comparación con muestras no tratadas. Las muestras de NHP no tratadas reducidas contenían menos HMWK escindido que las muestras de NHP no tratadas no reducidas. Se encontró también que las muestras de NHP no tratadas, tratadas con FXIIa y pretratadas con DX2930 y tratadas después con FXIIa produjeron resultados reproducibles.

**Tabla 5. Inhibición por DX2930 no reducida de la activación por FXIIa, muestras de varones, señales de HMWK monocatenario/bicatenario, señal total, porcentaje de HMWK bicatenario**

Activación no reducida de NHP de varones con factor XIIa, inhibición de factor XIIa con DX2930								
Muestra de NHP de varones	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/ml)	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril	% de bicatenario a partir de la señal sin tratar
			Monocatenario (120kDa)	Bicatenario (100 kDa)	Bicatenario (90 kDa)			
BRH745050	0	0	17900	4670	0	22570	20,7 %	N/A
BRH745050	2,5	0	8160	7750	1770	17680	53,8 %	54,4 %
BRH745050	2,5	10	12600	6620	812	20032	37,1 %	29,6 %
BRH745051	0	0	19600	3450	0	23050	15,0 %	N/A
BRH745051	2,5	0	10000	9430	2140	21570	53,6 %	49,0 %
BRH745051	2,5	10	15300	6480	915	22695	32,6 %	21,9 %
BRH745052	0	0	22500	8570	1100	32170	30,1 %	N/A
BRH745052	2,5	0	11000	10700	3050	24750	55,6 %	51,1 %
BRH745052	2,5	10	16500	8500	1500	26500	37,7 %	26,7 %
BRH745053	0	0	6370	13100	7390	26860	76,3 %	N/A
BRH745053	2,5	0	1710	8310	10500	20520	91,7 %	73,2 %
BRH745053	2,5	10	4360	9310	6490	20160	78,4 %	31,6 %
BRH745054	0	0	27100	5900	0	33000	17,9 %	N/A
BRH745054	2,5	0	11500	9880	2270	23650	51,4 %	57,6 %
BRH745054	2,5	10	15100	6280	814	22194	32,0 %	44,3 %

**% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total**

**% de bicatenario a partir de la señal sin tratar:**

**1 - (señal de monocatenario tratada/señal de monocatenario no tratada)**

**Tabla 6. Inhibición por DX2930 no reducida de la activación por FXIIa, muestras de mujeres, señales de HMWK monocatenario/bicatenario, señal total, porcentaje de HMWK bicatenario**

Activación no reducida de NHP de mujeres con factor XIIa, inhibición de factor XIIa con DX2930								
Muestra de NHP de mujeres	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/ml)	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril	% de bicatenario a partir de la señal sin tratar
			Monocatenario (120kDa)	Bicatenario (100 kDa)	Bicatenario (90 kDa)			
BRH745065	0	0	14700	2500	161	17361	15,3 %	N/A
BRH745065	2,5	0	4750	5550	3160	13460	64,7 %	67,7 %
BRH745065	2,5	10	10500	3270	453	14223	26,2 %	28,6 %
BRH745066	0	0	23200	4460	17,4	27677	16,2 %	N/A
BRH745066	2,5	0	14200	10600	1780	26580	46,6 %	38,8 %
BRH745066	2,5	10	15100	5920	205	21225	28,9 %	34,9 %
BRH745067	0	0	26000	8610	300	34910	25,5 %	N/A
BRH745067	2,5	0	13700	9470	1410	24580	44,3 %	47,3 %
BRH745067	2,5	10	19800	8880	795	29475	32,8 %	23,8 %
BRH745068	0	0	25400	9180	211	34791	27,0 %	N/A
BRH745068	2,5	0	14200	12500	2610	29310	51,6 %	44,1 %
BRH745068	2,5	10	15800	7350	708	23858	33,8 %	37,8 %
BRH745069	0	0	20900	6470	0	27370	23,6 %	N/A
BRH745069	2,5	0	17000	11500	1820	30320	43,9 %	18,7 %
BRH745069	2,5	10	21600	8960	198	30758	29,8 %	-3,3 %

**% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total**

**% de bicatenario a partir de la señal sin tratar:**

**1 - (señal de monocatenario tratada/señal de monocatenario no tratada)**

**Tabla 7. Inhibición por DX2930 reducida de la activación por FXIIa, muestras de varones, señales de HMWK monocatenario/bicatenario, señal total, porcentaje de HMWK bicatenario**

Activación reducida de NHP de varones con factor XIIa, inhibición de factor XIIa con DX2930								
Muestra de NHP de varones	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/ml)	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril	% de bicatenario a partir de la señal sin tratar
			Monocatenario	Bicatenario (56 kDa)	Bicatenario (46 kDa)			
BRH745050	0	0	28300	0	0	28300	0,0 %	N/A
BRH745050	2,5	0	14400	3360	2620	20380	29,3 %	49,1 %
BRH745050	2,5	10	19200	2560	1430	23190	17,2 %	32,2 %
BRH745051	0	0	26800	0	0	26800	0,0 %	N/A
BRH745051	2,5	0	12800	2950	2580	18330	30,2 %	52,2 %
BRH745051	2,5	10	13900	2100	1210	17210	19,2 %	48,1 %
BRH745052	0	0	17800	853	1500	20153	11,7 %	N/A
BRH745052	2,5	0	12100	2980	3250	18330	34,0 %	32,0 %
BRH745052	2,5	10	16900	2790	2190	21880	22,8 %	5,1 %
BRH745053	0	0	7280	4340	8430	20050	63,7 %	N/A
BRH745053	2,5	0	3180	5620	9240	18040	82,4 %	56,3 %
BRH745053	2,5	10	6420	5470	6660	18550	65,4 %	11,8 %
BRH745054	0	0	22100	625	586	23311	5,2 %	N/A
BRH745054	2,5	0	9610	2660	2020	14290	32,8 %	56,5 %
BRH745054	2,5	10	12500	2010	1300	15810	20,9 %	43,4 %

**% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total**

**% de bicatenario a partir de la señal sin tratar:**

**1 - (señal de monocatenario tratada/señal de monocatenario no tratada)**

**Tabla 8. Inhibición por DX2930 reducida de la activación por FXIIa, muestras de mujeres, señales de HMWK monocatenario/bicatenario, señal total, porcentaje de HMWK bicatenario**

Activación reducida de NHP de mujeres con factor XIIa, inhibición de factor XIIa con DX2930								
Muestra de NHP de mujeres	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/ml)	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril	% de bicatenario a partir de la señal sin tratar
			Monocatenario	Bicatenario (56 kDa)	Bicatenario (46 kDa)			
BRH745065	0	0	17300	2080	1240	20620	16,1 %	N/A
BRH745065	2,5	0	4100	4880	3450	12430	67,0 %	76,3 %
BRH745065	2,5	10	9770	3740	1960	15470	36,8 %	43,5 %
BRH745066	0	0	21300	1770	753	23823	10,6 %	N/A
BRH745066	2,5	0	9710	4280	2760	16750	42,0 %	54,4 %
BRH745066	2,5	10	13600	3990	1780	19370	29,8 %	36,2 %
BRH745067	0	0	21900	375	1850	24125	9,2 %	N/A
BRH745067	2,5	0	11900	5120	3430	20450	41,8 %	45,7 %
BRH745067	2,5	10	19000	3610	2440	25050	24,2 %	13,2 %
BRH745068	0	0	29400	525	966	30891	4,8 %	N/A
BRH745068	2,5	0	19600	5660	5130	30390	35,5 %	33,3 %
BRH745068	2,5	10	25100	4050	3260	32410	22,6 %	14,6 %
BRH745069	0	0	19900	500	688	21088	5,6 %	N/A
BRH745069	2,5	0	12000	2910	2560	17470	31,3 %	39,7 %
BRH745069	2,5	10	15000	1790	1350	18140	17,3 %	24,6 %

% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total

% de bicatenario a partir de la señal sin tratar:

1 - (señal de monocatenario tratada/señal de monocatenario no tratada)

5 **Tabla 9. Porcentaje promedio de bicatenario en el carril, valores reducidos y no reducidos**

Porcentaje promedio de bicatenario en el carril				
Muestra	XIIa (nM)	DX2930 (µg/ml)	Reducidos	No reducidos
Promedio varones	0	0	16,1 %	32,0 %
	2,5	0	42,0 %	61,2 %
	2,5	10	29,5 %	43,6 %
Promedio mujeres	0	0	9,6 %	21,5 %
	2,5	0	43,8 %	50,2 %
	2,5	10	26,4 %	30,3 %

**Ejemplo 6. Inhibición de la activación de FXIIa usando DX-2930 y DX-88**

10 *Propósito:*

El propósito de este experimento era determinar los efectos de DX-2930 y DX-88 sobre la inhibición de la activación con el FXIIa. Se analizó DX-2930 a 5 concentraciones: 200, 100, 30, 12 y 5 µg/ml. Se analizó DX-88 a 5 concentraciones: 9,4, 4,7, 1,4, 0,56 y 0,24 µg/ml. Las muestras pretratadas con DX-2930 y DX-88 se trataron con FXIIa. Además de las muestras pretratadas, se analizaron una muestra no tratada y dos muestras tratadas solo con FXIIa. Las muestras se analizaron en condiciones reducidas.

*Procedimiento:*

20 1. Se preparó una mezcla de NHP añadiendo 250 µl de cada muestra de plasma, BRH745070, BRH745071 y BRH745048, a un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml y se mezcló bien.

## ES 2 692 408 T3

- 5 2. Se preparó una solución de 4500 µg/ml de DX2930 añadiendo 4,21 µl de la solución madre de DX2930 (32,1 mg/ml) a 25,79 µl de TBS. Se preparó una solución de 2250 µg/ml de DX2930 añadiendo 15 µl de la solución de 4500 µg/ml a 15 µl de TBS. Se preparó una solución de 675 µg/ml de DX2930 añadiendo 6 µl de la solución de 2250 µg/ml a 14 µl de TBS. Se preparó una solución de 270 µg/ml de DX2930 añadiendo 8 µl de la solución de 675 µg/ml a 12 µl de TBS. Se preparó una solución de 112,5 µg/ml de DX2930 añadiendo 10 µl de la solución de 270 µg/ml a 14 µl de TBS.
- 10 3. Se prepararon cinco muestras de plasma pretratadas con DX-2930 añadiendo 2 µl de cada solución de DX2930 a 41 µl de la mezcla de NHP.
- 15 4. Se preparó una solución de 211,5 µg/ml de DX88 añadiendo 6,28 µl de la solución madre de DX88 (10,1 mg/ml) a 293,72 µl de TBS. Se preparó una solución de 105,75 µg/ml de DX88 añadiendo 15 µl de la solución de 211,5 µg/ml a 15 µl de TBS. Se preparó una solución de 31,5 µg/ml de DX88 añadiendo 8,94 µl de la solución de 105,75 µg/ml a 21,06 µl de TBS. Se preparó una solución de 12,6 µg/ml de DX88 añadiendo 12 µl de la solución de 31,5 µg/ml a 18 µl de TBS. Se preparó una solución de 5,4 µg/ml de DX88 añadiendo 12,86 µl de la solución de 12,6 µg/ml a 17,14 µl de TBS.
- 20 5. Se prepararon cinco muestras de plasma pretratadas con DX-88 añadiendo 2 µl de cada solución de DX-88 a 41 µl de la mezcla de NHP.
- 25 6. Se preparó un intermedio 1:10 de FXIIa añadiendo 5 µl de la solución madre (25.300 nM) a 45 µl de TBS. Se preparó una solución de FXIIa 56,25 nM añadiendo 4,45 µl del intermedio 1:10 a 195,55 µl de TBS.
- 30 7. Cada una de las muestras de plasma pretratadas con DX2930 y DX88 se trató con 2,5 nM de FXIIa añadiendo 2 µl de la solución de FXIIa 56,25 nM a cada una de las muestras.
- 35 8. Se prepararon dos muestras que contenían FXIIa añadiendo 2 µl de TBS y 2 µl de la solución de FXIIa 56,25 nM a 41 µl del conjunto de NHP.
- 40 9. Se preparó una muestra no tratada añadiendo 4 µl de TBS a 41 µl del conjunto de NHP.
- 45 10. Se incubaron todas las muestras que contenían FXIIa a 37 °C durante 10 minutos.
- 50 11. Se añadió un volumen de 5 µl de inhibidores de antiproteasa a cada muestra incluida la muestra no tratada. El volumen de muestra total para cada replicado fue de 50 µl.
- 55 12. Cada muestras se diluyó a ~5 % de plasma añadiendo 5 µl de la muestra a 95 µl de TBS.
- 60 13. Las muestras se prepararon añadiendo 5 µl del 4X tampón de muestra y 2 µl de 10X agente reductor a 13 µl de muestra.
- 65 14. Todas las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos usando un bloque calentador.
15. Un volumen de 1 l de tampón de procesamiento 1X MES se preparó añadiendo 50 ml de tampón de procesamiento 20X MES SDS a 950 ml de agua DI.
16. Se preparó tampón de ensayo (tampón de bloqueo Odyssey con el 0,2 % de Tween) añadiendo 1 ml de Tween-20 a 499 ml de tampón de bloqueo Odyssey.
17. Se preparó tampón de lavado (PBS con el 0,1 % de Tween) añadiendo 1 paquete de PBS y 1 ml de Tween-20 a 900 ml de agua DI. La solución se mezcló bien y se llevó a 1 l usando agua DI. La solución final se filtró a través de un sistema de filtración PES 0,22 µM.
18. Un volumen de 4 µl de un marcador proteico de un color se añadió al carril 1 de dos geles.
19. Se añadieron volúmenes de 13 µl de muestras reducidas a los carriles apropiados de un gel de Bis-Tris al 4-12 %.
20. El gel se procesó a 125 voltios durante ~75 minutos.
21. Cada gel se transfirió a una membrana usando la minipila de transferencia de iBlot y el programa P0 del sistema de transferencia de iBlot.
22. La membrana se transfirió a una bandeja de plástico que contenía 20 ml de tampón de bloqueo Odyssey. La membrana se incubó en tampón de bloqueo Odyssey sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante

1 hora.

23. Se preparó una solución de anticuerpo primario de 1 µg/ml añadiendo 14,29 µl de mAb anti-HMWK de ratón, clon N° 11H05, 1,4 mg/ml a 19.985,7 µl de tampón de ensayo.

24. El tampón de bloqueo se retiró de la bandeja de plástico. Se añadió un volumen de 20 ml de la solución de anticuerpo primario a la membrana y se incubó sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

25. Un intermedio 1:10 de IRDye 680 de anti-IgG de ratón de cabra se preparó añadiendo 5 µl de IRDye 680 anti-IgG de ratón de cabra a 45 µl de tampón de ensayo. La solución de anticuerpo secundario se preparó a una dilución de 1:15.000 añadiendo 13,33 µl del intermedio 1:10 de IRDye 680 anti-IgG de ratón de cabra a 19.986,7 µl de tampón de ensayo.

26. La solución de anticuerpo primario se retiró de la bandeja.

27. La membrana se lavó durante cinco minutos con 20 ml de tampón de lavado y después la solución de lavado se descartó. El lavado se repitió durante un total de 4 lavados.

28. Se añadió un volumen de 20 ml de la solución de anticuerpo secundario a la membrana y se incubó sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

29. La solución de anticuerpo secundario se retiró de la bandeja.

30. La membrana se lavó durante cinco minutos con 20 ml de tampón de lavado y después la solución de lavado se descartó. El lavado se repitió durante un total de 4 lavados.

31. La membrana se enjuagó con PBS durante 5 minutos.

32. La membrana se analizó usando Li-cor Odyssey CLx.

*Resultados:*

La tabla 10 contiene los resultados para el experimento de inhibición con DX-2930 y DX-88. El porcentaje de bicatenario se calculó dentro de cada carril y se calculó mediante comparación de la señal sin tratar con la señal tratada. Para esta comparación, se usó el porcentaje de bicatenario en el carril. El conjunto de NHP no tratado produjo un porcentaje de valor de bicatenario del 3,8 %. Cuando el conjunto de NHP se trató solo con FXIIa, las dos muestras replicadas produjeron porcentajes de valores de bicatenario del 24,4 %. Las muestras pretradas con DX-2930 produjeron porcentajes de valores de bicatenario ligeramente inferiores en comparación con las muestras preparadas con DX-88. Las muestras pretratadas con 5 µg/ml de DX-2930 y 0,24 µg/ml de DX-88 produjeron porcentajes de valores de bicatenario del 22,3 % y del 23,9 % respectivamente. Estos valores son muy próximos al porcentaje de valor de bicatenario en la muestra tratada solo con FXIIa.

*Conclusión:*

Las muestras pretratadas con DX-2930 produjeron un porcentaje ligeramente inferior de valores de bicatenario que las muestras pretratadas con DX-88.

Tabla 10. Inhibición de FXIIa usando DX-2930 y DX-88, señales de HMWK, porcentaje de HMWK bicatenario

Inhibición de la activación de contacto de FXIIa usando DX-88 y DX-2930								
FXIIa (nM)	DX2930 (µg/ml)	DX88 (µg/ml)	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril	% de bicatenario a partir de la señal sin tratar
			Monocatenario (110 kDa)	Bicatenario (56 kDa)	Bicatenario (46 kDa)			
0,00	0,00	0,00	26600	413	643	27656	3,8 %	N/A
2,50	0,00	0,00	20500	3920	2690	27110	24,4 %	22,9 %
2,50	0,00	0,00	21200	4470	2390	28060	24,4 %	20,3 %
2,50	200,00	0,00	27200	376	576	28152	3,4 %	-2,3 %
2,50	100,00	0,00	25300	206	212	25718	1,6 %	4,9 %
2,50	30,00	0,00	24700	784	1470	26954	8,4 %	7,1 %
2,50	12,00	0,00	23200	3170	1560	27930	16,9 %	12,8 %
2,50	5,00	0,00	20100	3630	2140	25870	22,3 %	24,4 %
2,50	0,00	9,40	22600	615	663	23878	5,4 %	15,0 %
2,50	0,00	4,70	22500	349	592	23441	4,0 %	15,4 %
2,50	0,00	1,40	21500	2210	1270	24980	13,9 %	19,2 %
2,50	0,00	0,56	20600	3340	1990	25930	20,6 %	22,6 %
2,50	0,00	0,24	19500	3910	2200	25610	23,9 %	26,7 %

**% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total**

**% de bicatenario a partir de la señal sin tratar:**

**1 - (señal de monocatenario tratada/señal de monocatenario no tratada)**

#### Ejemplo 7. Determinación de niveles de quinínogeno escindido en muestras de pacientes con HAE, RA, UC y CD

##### Propósito:

El propósito de este experimento era evaluar muestras de plasma tratado con antiproteasa de pacientes con angioedema hereditario (HAE). Se analizaron dos muestras con HAE de cada paciente, una muestra basal y una muestra de ataque. Las muestras se analizaron en condiciones reducidas y en condiciones no reducidas. Además, se analizaron muestras de pacientes a los que se diagnosticó enfermedad de Crohn, artritis reumatoide y colitis ulcerosa. También se analizaron muestras de plasma humano normal. Las muestras adicionales se analizaron solo en condiciones reducidas.

##### Procedimiento:

1. Se analizaron seis conjuntos de muestras de pacientes con HAE. Cada muestra de plasma se preparó añadiendo 5 µl de muestra a 95 µl de TBS.

2. Se analizaron cinco muestras de plasma con enfermedad de Crohn, cinco muestras de plasma con artritis reumatoide y cinco muestras con colitis ulcerosa. Cada muestra de plasma se preparó añadiendo 5 µl de muestra a 95 µl de TBS.

3. Se prepararon siete muestras de plasma humano normal para su uso como controles añadiendo 5 µl de muestra a 95 µl de TBS.

4. Se prepararon muestras de ensayo no reducidas añadiendo 5 µl de 4X tampón de muestra a 15 µl de muestra.

5. Se prepararon muestras reducidas añadiendo 5 µl del 4X tampón de muestra y 2 µl de 10X agente reductor a 13 µl de muestra.

6. Todas las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos usando un bloque calentador.

7. Un volumen de 1 l de tampón de procesamiento 1X Tris-Acetato SDS se preparó añadiendo 50 ml de tampón

## ES 2 692 408 T3

de procesamiento 20X Tris-Acetato SDS a 950 ml de agua DI.

8. Un volumen de 2 l de tampón de procesamiento 1X MES se preparó añadiendo 100 ml de tampón de procesamiento 20X MES SDS a 1900 ml de agua DI.

9. Se preparó tampón de ensayo (tampón de bloqueo Odyssey con el 0,2 % de Tween) añadiendo 2 ml de Tween-20 a 998 ml de tampón de bloqueo Odyssey.

10. Se preparó tampón de lavado (PBS con el 0,1 % de Tween) añadiendo 1 paquete de PBS y 1 ml de Tween-20 a 900 mL de agua DI. La solución se mezcló bien y se llevó a 1 l usando agua DI. La solución final se filtró a través de un sistema de filtración PES 0,22 µM.

11. Un volumen de 4 µl de un marcador proteico de un color se añadió al carril 1 de cuatro geles.

12. Se añadieron volúmenes de 13 µl de muestras no reducidas a los carriles apropiados de un gel de Tris-Acetato al 7 %.

13. Se añadieron volúmenes de 13 µl de muestras reducidas a los carriles apropiados de geles de Bis-Tris al 4-12 %.

14. Los geles se procesaron a 125 voltios durante ~75 minutos.

15. Cada gel se transfirió individualmente a una membrana usando las minipilas de transferencia de iBlot y el programa P0 del sistema de transferencia de iBlot.

16. Cada membrana se transfirió a una bandeja de plástico que contenía 20 ml de tampón de bloqueo Odyssey. Las membranas se incubaron en tampón de bloqueo Odyssey sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

17. Se preparó una solución de anticuerpo primario de 1 µg/ml añadiendo 57,14 µl de mAb anti-HMWK de ratón, clon N° 11H05, 1,4 mg/ml a 79.942,86 µl de tampón de ensayo.

18. El tampón de bloqueo se retiró de las bandejas de plástico. Se añadió un volumen de 20 ml de la solución de anticuerpo primario a cada bandeja y las membranas se incubaron sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

19. Un intermedio 1:10 de IRDye 680 anti-IgG de ratón de cabra se preparó añadiendo 10 µl de IRDye 680 anti-IgG de ratón de cabra a 90 µl de tampón de ensayo. La solución de anticuerpo secundario se preparó a una dilución de 1:15.000 añadiendo 53,33 µl del intermedio 1:10 de IRDye 680 anti-IgG de ratón de cabra a 79.946,67 µl de tampón de ensayo.

20. La solución de anticuerpo primario se retiró de las bandejas.

21. Cada membrana se lavó durante cinco minutos con 20 ml de tampón de lavado y después la solución de lavado se descartó. El lavado se repitió durante un total de 4 lavados.

22. Se añadió un volumen de 20 ml de la solución de anticuerpo secundario a cada bandeja y las membranas se incubaron sobre un agitador de placa a temperatura ambiente durante 1 hora.

23. La solución de anticuerpo secundario se retiró de las bandejas.

24. Cada membrana se lavó durante cinco minutos con 20 ml de tampón de lavado y después la solución de lavado se descartó. El lavado se repitió durante un total de 4 lavados.

25. Cada membrana se enjuagó con PBS durante 5 minutos.

26. Las membranas se escanearon usando Li-cor Odyssey CLx.

### Resultados:

Como se esperaba, la mayor parte de las muestras de pacientes mostraron un nivel elevado de HMWK bicatenario en las muestras de ataques a diferencia de en las muestras basales. Las tablas 11 y 12 contienen los datos de HAE para este experimento. La tabla 13 contiene el conjunto de datos para muestras de pacientes con colitis ulcerosa y artritis reumatoide. La tabla 14 contiene los datos para las muestras de pacientes con enfermedad de Crohn.

**Tabla 11. Muestras de pacientes con HAE no reducidas, señales de HMWK, basales y de ataque, porcentaje de bicatenario en el carril**

Muestras de pacientes con HAE no reducidas con antiproteasa, basales y de ataque							
Paciente ID	Pacientes iniciales	HAE	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril
			120 kDa	100 kDa	90 kDa		
A3009	N18	Normal	15500	3750	N/A	19250	19,5 %
A4970	AC	Basal	13000	4300	240	17540	25,9 %
A4908	AC	De ataque	9450	5910	1740	17100	44,7 %
A5564	BB	Basal	15900	5650	585	22135	28,2 %
A5353	BB	De ataque	11600	10500	2340	24440	52,5 %
A4607	FF	Basal	11400	4850	N/A	16250	29,8 %
A4619	FF	De ataque	6770	6750	2090	15610	56,6 %
A5346	DG	Basal	10800	3850	102	14752	26,8 %
A5422	DG	De ataque	5650	2080	133	7863	28,1 %
A4183	PC	Basal	9530	1190	N/A	10720	11,1 %
A4671	PC	De ataque	8840	1570	N/A	10410	15,1 %
A5248	GR	Basal	14300	4270	44,1	18614,1	23,2 %
A2315	GR	De ataque	11600	4610	490	16700	30,5 %

**% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total**

5 **Tabla 12. Muestras de pacientes con HAE reducidas, señales de HMWK, basales y de ataque, porcentaje de bicatenario en el carril**

Muestras de pacientes con HAE reducidas con antiproteasa, basales y de ataque							
Paciente ID	Pacientes iniciales	HAE	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril
			110 kDa	56 kDa	46 kDa		
A3009	N18	Normal	18700	802	926	20428	8,5 %
A4970	AC	Basal	14500	2980	1480	18960	23,5 %
A4908	AC	De ataque	8500	3540	2670	14710	42,2 %
A5564	BB	Basal	12400	3160	1380	16940	26,8 %
A5353	BB	De ataque	8980	3980	2620	15580	42,4 %
A4607	FF	Basal	10900	2490	1620	15010	27,4 %
A4619	FF	De ataque	6130	3930	2520	12580	51,3 %
A5346	DG	Basal	11200	2400	709	14309	21,7 %
A5422	DG	De ataque	7900	2640	749	11289	30,0 %
A4183	PC	Basal	13900	1850	572	16322	14,8 %
A4671	PC	De ataque	13500	2120	572	16192	16,6 %
A5248	GR	Basal	19000	2120	1160	22280	14,7 %
A2315	GR	De ataque	16400	3660	1580	21640	4,2 %

**% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total**

Tabla 13. Muestras de plasma de individuos con colitis ulcerosa y artritis reumatoide, señales HMWK, porcentaje de bicatenario en el carril

Muestras en estado de enfermedad reducido en K2EDTA y citrato de sodio, colitis ulcerosa y artritis reumatoide							
Muestra	Anticoagulante	Enfermedad	Señal de HMWK			Señal total	% de bicatenario en el carril
			Monocatenario (110 kDa)	Bicatenario (56 kDa)	Bicatenario (46 kDa)		
A3005, N17	Antiproteasa	Normal	20500	775	366	21641	5,3 %
BRH745075	Citrato de sodio	Normal	18700	1340	802	20842	10,3 %
BRH745056	Citrato de sodio	Normal	24200	893	782	25875	6,5 %
BRH715036	K2EDTA	Colitis ulcerosa	17400	3030	1340	21770	20,1 %
BRH715037	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	17400	1220	694	19314	9,9 %
BRH715038	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	N/A	2140	10300	12440	100,0 %
BRH715039	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	14100	1700	596	16396	14,0 %
BRH715040	Citrato de sodio	Colitis ulcerosa	13300	1170	2070	16540	19,6 %
BRH715041	K2EDTA	Artritis reumatoide	N/A	N/A	4950	4950	100,0 %
BRH715042	K2EDTA	Artritis reumatoide	88	N/A	9250	9338	99,1 %
BRH715043	K2EDTA	Artritis reumatoide	N/A	N/A	6900	6900	100,0 %
BRH715044	Citrato de sodio	Artritis reumatoide	N/A	N/A	2850	2850	100,0 %
BRH715045	Citrato de sodio	Artritis reumatoide	6600	1860	1520	9980	33,9 %

% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total

5 Tabla 14. Muestras de plasma de individuos con enfermedad de Crohn, señales HMWK, porcentaje de bicatenario en el carril

Muestras en estado de enfermedad reducido en K2EDTA y citrato de sodio, enfermedad de Crohn y psoriasis								
Muestra	Anticoagulante	Enfermedad	Señal de HMWK				Señal total	% de bicatenario en el carril
			Monocatenario (150 kDa)	Monocatenario (110 kDa)	Bicatenario (56 kDa)	Bicatenario (46 kDa)		
A2992, N14	Citrato de sodio	Normal	704	12900	384	576	14564	6,6 %
BRH745047	Citrato de sodio	Normal	1560	5820	N/A	192	7572	2,5 %
BRH745076	Citrato de sodio	Normal	5720	12300	382	480	18882	4,6 %
BRH715026	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	12100	1230	1950	15280	20,8 %
BRH715027	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	16300	668	1550	18518	12,0 %
BRH715028	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	6650	504	2250	9404	29,3 %
BRH715029	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	1900	14100	N/A	680	16680	4,1 %
BRH715030	K2EDTA	Enfermedad de Crohn	N/A	1320	3230	6020	10570	87,5 %

% de bicatenario en el carril: suma de señal de bicatenario/suma de señal del carril total

#### OTRAS FORMAS DE REALIZACIÓN

10

Todas las características divulgadas en la presente memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica divulgada en la presente memoria descriptiva puede reemplazarse por una característica alternativa que sirva para el mismo fin, un fin equivalente o similar. Así, a menos que se indique

expresamente lo contrario, cada característica divulgada es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 5 <110> Dyax Corp.  
Sexton, Daniel J.  
Faucette, Ryan  
Kenniston, Jon A.
- 10 Conley, Greg  
Nixon, Andrew  
TenHoor, Christopher  
Adelman, Burt  
Chyung, Yung
- 15 <120> EVALUACIÓN Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR BRADIQUININA
- <130> D0617.70063WO00
- 20 <140> TBD  
<141> 17/01/2004
- <150> US 61/754.607  
<151> 20/01/2013
- 25 <160> 9
- <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1  
<211> 644  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- 35 <400> 1

```

Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser
1                               5                               10                               15

Leu Thr Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp
                20                               25                               30

Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn
                35                               40                               45

Gln Ser Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys
50                               55                               60

Thr Val Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu
65                               70                               75                               80

Gly Asp Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr
                85                               90                               95

Lys Asp Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly
                100                               105                               110

Lys Arg Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile
                115                               120                               125
    
```

ES 2 692 408 T3

Thr Pro Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly  
 130 135 140

Cys Val His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu  
 145 150 155 160

Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu  
 165 170 175

Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly  
 180 185 190

Leu Asn Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys  
 195 200 205

Glu Asn Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly  
 210 215 220

Asp Thr Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg  
 225 230 235 240

Ile Ala Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe  
 245 250 255

Val Gln Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro  
 260 265 270

Thr Asn Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys  
 275 280 285

Leu Asn Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val  
 290 295 300

Lys Lys Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp  
 305 310 315 320

Phe Val Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu  
 325 330 335

Thr Glu Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn  
 340 345 350

Ala Glu Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val  
 355 360 365

Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly



ES 2 692 408 T3

<400> 2

Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp Leu Phe  
 1 5 10 15

Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn Gln Ser  
 20 25 30

Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys Thr Val  
 35 40 45

Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu Gly Asp  
 50 55 60

Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr Lys Asp  
 65 70 75 80

Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly Lys Arg  
 85 90 95

Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile Thr Pro  
 100 105 110

Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly Cys Val  
 115 120 125

His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu Arg His  
 130 135 140

Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu Phe Met  
 145 150 155 160

Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly Leu Asn  
 165 170 175

Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys Glu Asn  
 180 185 190

5

ES 2 692 408 T3

Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly Asp Thr  
 195 200 205

Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg Ile Ala  
 210 215 220

Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe Val Gln  
 225 230 235 240

Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro Thr Asn  
 245 250 255

Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys Leu Asn  
 260 265 270

Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val Lys Lys  
 275 280 285

Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Val  
 290 295 300

Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu Thr Glu  
 305 310 315 320

Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn Ala Glu  
 325 330 335

Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys  
 340 345 350

Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys  
 355 360

<210> 3  
 <211> 255  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro  
 1 5 10 15

His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys  
 20 25 30

Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg  
 35 40 45

10

ES 2 692 408 T3

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His  
50 55 60

Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His  
65 70 75 80

Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His  
85 90 95

Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His  
100 105 110

Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn  
115 120 125

Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr  
130 135 140

Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly Pro Thr Pro Ile Pro  
145 150 155 160

Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe Ser Asp Phe Gln Asp  
165 170 175

Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile  
180 185 190

Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly  
195 200 205

Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys  
210 215 220

Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu Ile Asn Pro Thr Thr  
225 230 235 240

Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser  
245 250 255

<210> 4

<211> 304

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<400> 4

Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys



ES 2 692 408 T3

<210> 5  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 5  
 10  
 Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr  
 20 25 30  
 Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala  
 35 40 45  
 Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala  
 50 55  
 <210> 6  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 20  
 <400> 6  
 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  
 25  
 <210> 7  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30

ES 2 692 408 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 7

5

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 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Trp Thr  
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105

<210> 8

<211> 60

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 8

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys  
1 5 10 15

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys  
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu  
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp  
50 55 60

20

<210> 9

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 9

ES 2 692 408 T3

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala  
1 5 10 15

Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu  
20 25 30

Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu  
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp  
50 55

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para identificar a un sujeto en riesgo de padecer o que padece un trastorno mediado por caliceína plasmática (pKal), comprendiendo el procedimiento:
- 5           medir un nivel de quinínogeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, y opcionalmente un nivel de HMWK intacto en una muestra de un sujeto;
- determinar un valor del HMWK escindido; y
- 10           establecer que el sujeto está en riesgo de padecer o padece un trastorno mediado por pKal si el valor del HMWK escindido es superior a un valor de referencia,
- en el que el valor de referencia se refiere al valor de HMWK escindido en un sujeto sano;
- 15           y en el que el trastorno mediado por pKal es angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el valor del HMWK escindido es el porcentaje del HMWK escindido en la muestra.
- 20
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que los niveles del HMWK escindido y opcionalmente del HMWK intacto se miden mediante un agente de detección, que se une específicamente a HMWK escindido en comparación con HMWK intacto, o que se une específicamente a HMWK intacto en comparación con HMWK escindido, en el que opcionalmente el agente de detección no se une a quinínogeno de bajo peso molecular (LMWK).
- 25
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el agente de detección es un anticuerpo; preferentemente en el que el anticuerpo se une específicamente a HMWK escindido en comparación con HMWK intacto y opcionalmente no se une a LMWK, de forma más preferida en el que el agente de detección es un anticuerpo que se une al extremo C-terminal de la cadena ligera de HMWK escindido.
- 30
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los niveles del HMWK intacto y del HMWK escindido se miden mediante ensayo de inmunotransferencia Western.
- 35
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la muestra es una muestra de sangre o una muestra de plasma.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el sujeto presenta un síntoma del trastorno mediado por pKal, o en el que el sujeto es resistente a un tratamiento antihistamínico, a un tratamiento con corticosteroides, o a ambos.
- 40
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el síntoma es un edema.
- 45
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el síntoma es:
- ataques recurrentes de inflamación;
- inflamación, siendo dicha inflamación completamente o predominantemente periférica;
- 50           urticaria;
- enrojecimiento, dolor e inflamación en ausencia de evidencias de infección; o
- 55           edema no mediado por histamina.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el sujeto no tiene síntomas de un trastorno mediado por pKal en el momento de la recogida de la muestra, no tiene antecedentes de síntomas del trastorno mediado por pKal, o no tiene antecedentes del trastorno mediado por pKal.
- 60
11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende determinar si el trastorno es susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal, siendo el trastorno susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal si el valor de HMWK escindido es superior al valor de referencia.
- 65
12. Un procedimiento para evaluar un tratamiento de un trastorno mediado por pKal en un sujeto, comprendiendo el procedimiento:

medir niveles de un HMWK escindido y opcionalmente niveles de un HMWK intacto en muestras recogidas de un sujeto antes y después del tratamiento o durante el transcurso del tratamiento;

5 determinar un valor de HMWK escindido en cada muestra basándose en los niveles de HMWK escindido y opcionalmente intacto en la misma muestra y

evaluar la eficacia del tratamiento basándose en los cambios en los valores de HMWK escindido en las muestras antes y después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento,

10 en el que el trastorno mediado por pKal es angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

15 13. Una composición farmacéutica para su utilización en el tratamiento de una enfermedad mediada por pKal en un sujeto, comprendiendo la composición un inhibidor de pKal y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en la que el sujeto tiene un valor de quinínógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido que es superior a un valor de referencia, que se refiere al valor de HMWK escindido en un sujeto sano; y en la que la enfermedad mediada por pKal es angioedema hereditario (HAE), artritis reumatoide, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

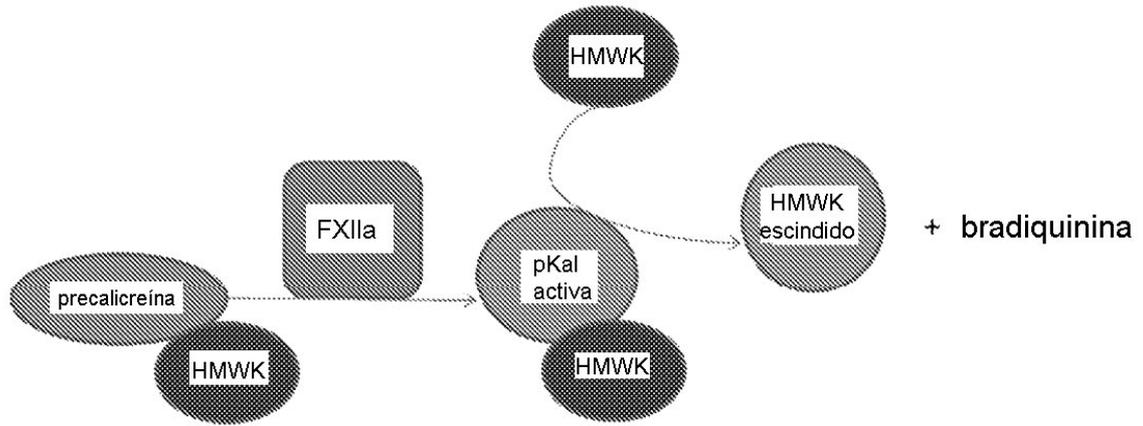


FIG. 1

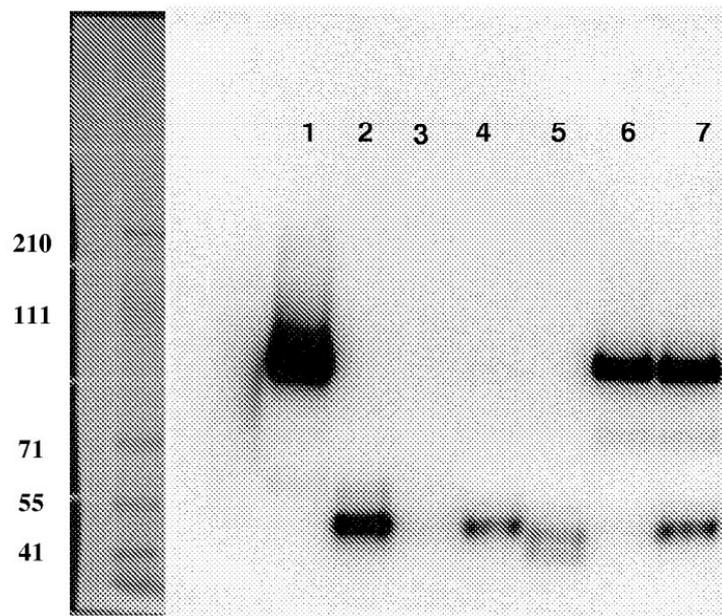


FIG. 2

Quantificación de quinínogeno monocatenario intacto mediante inmunotransferencia Western en plasma con ANTIPROTEASA de pacientes con HAE

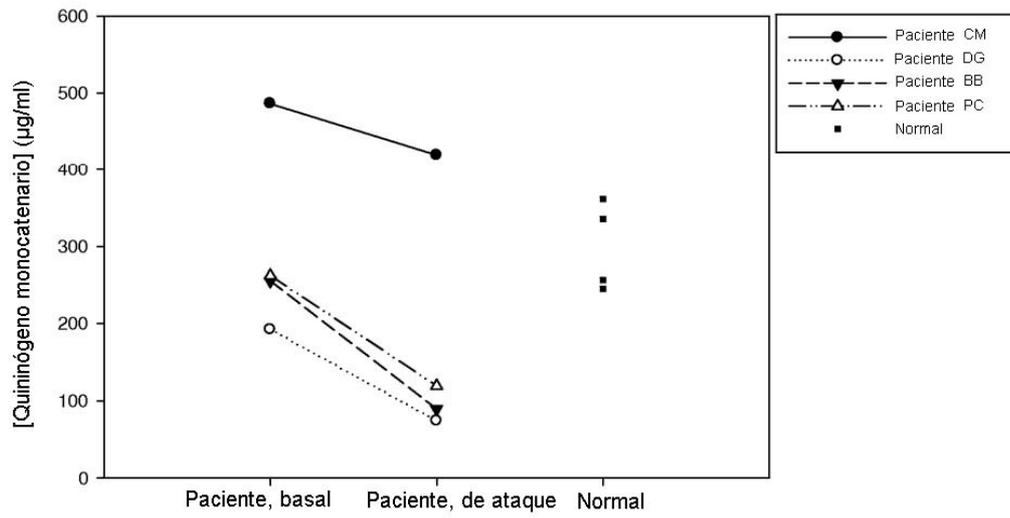


FIG. 3

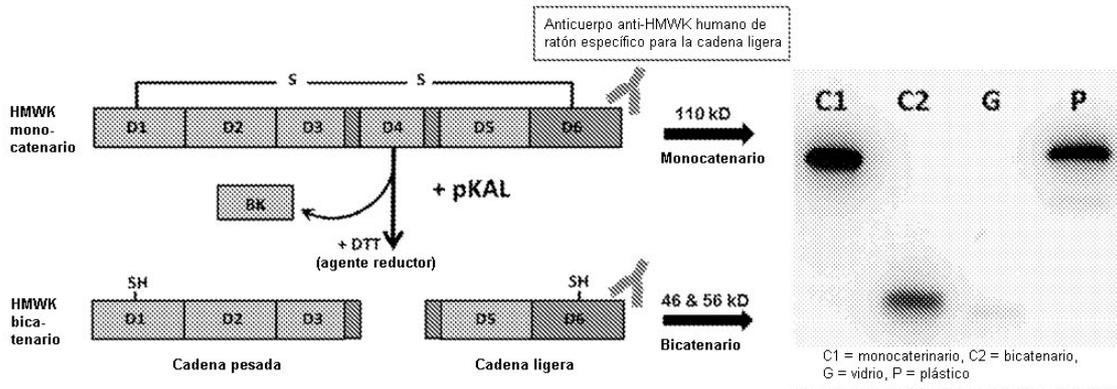


FIG. 4

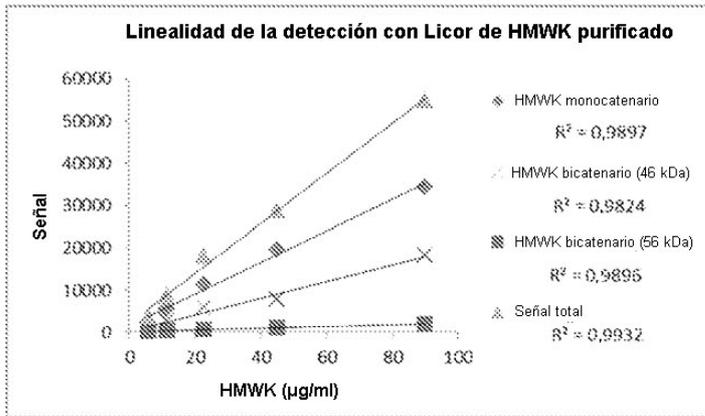


FIG. 5

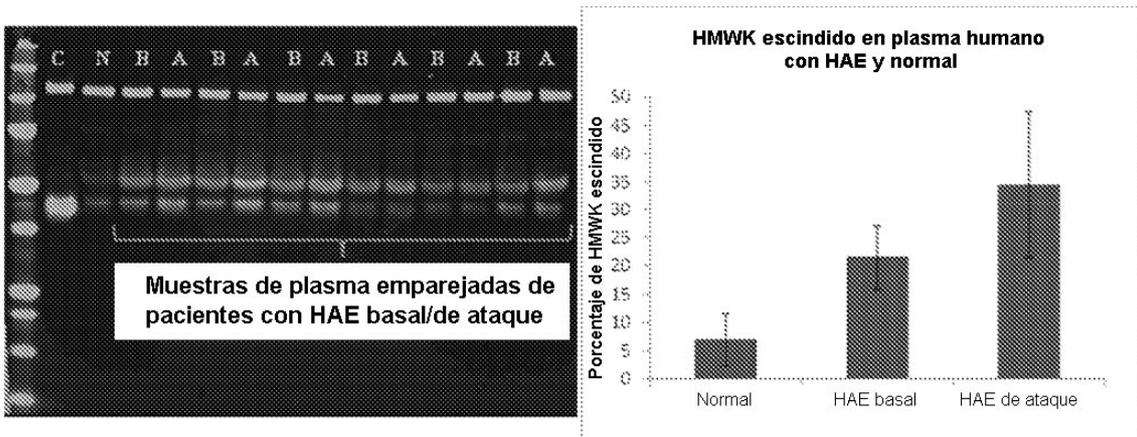


FIG. 6

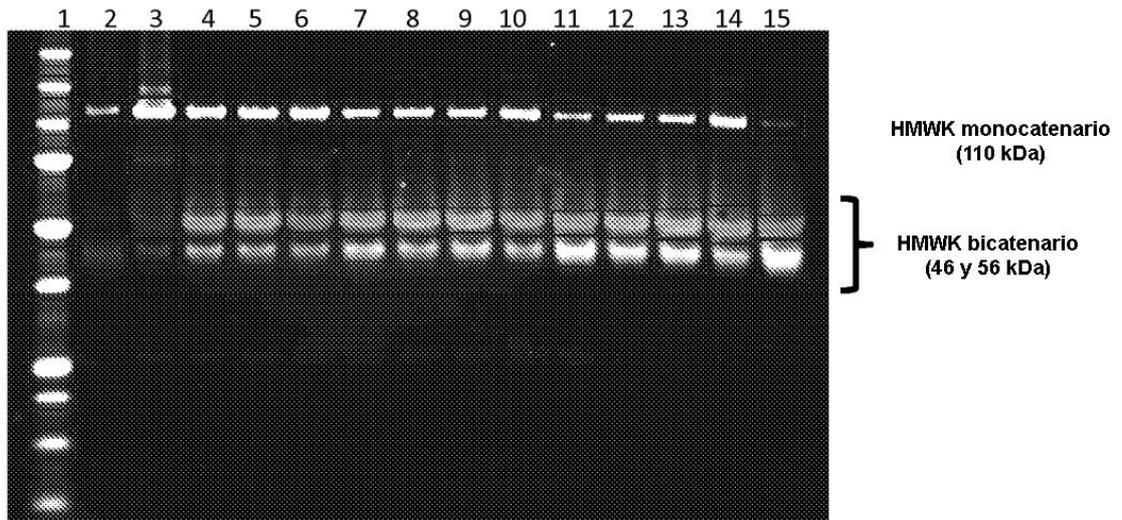


FIG. 7A

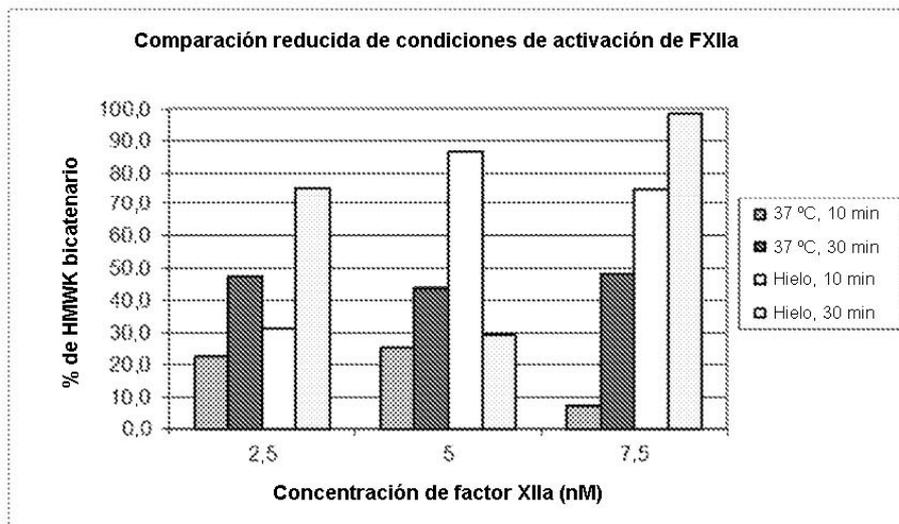


FIG. 7B

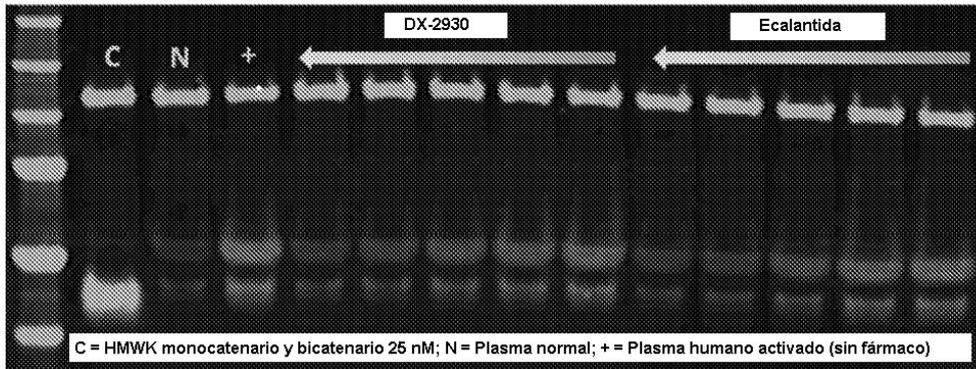


FIG. 8A

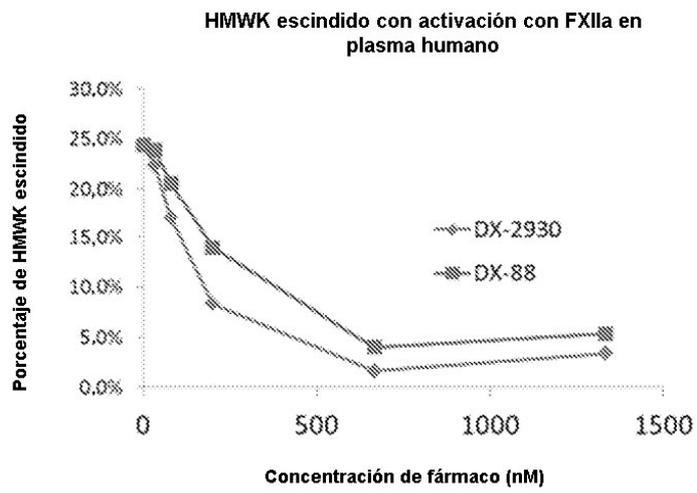


FIG. 8B

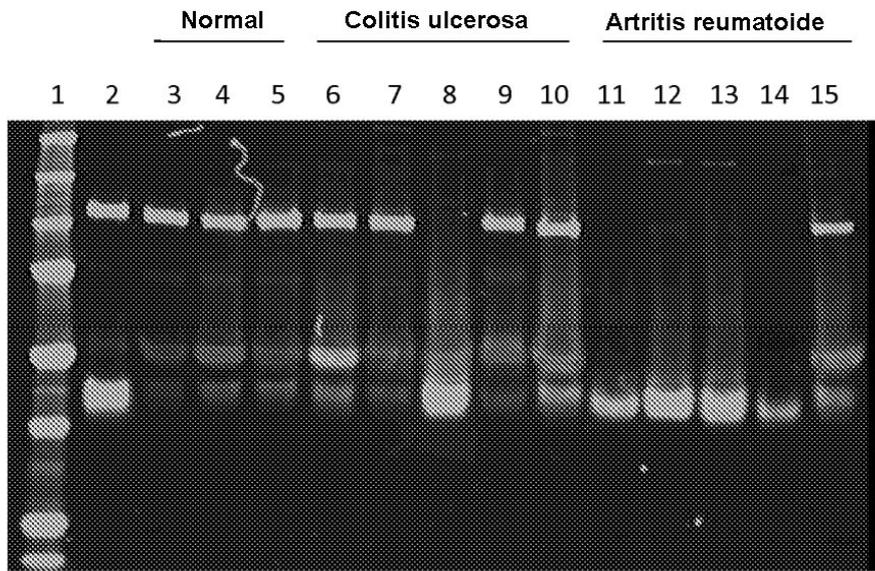


FIG. 9

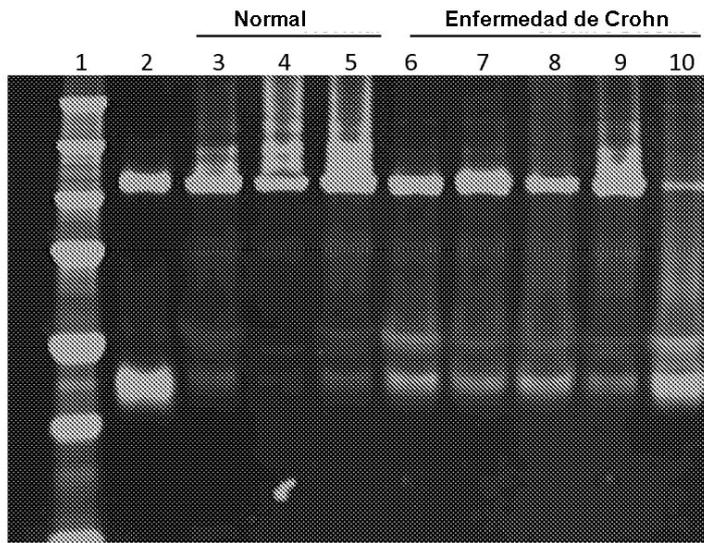


FIG. 10