

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 347**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2014 PCT/US2014/012090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14113701**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014 E 14740167 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2946206**

54 Título: **Evaluación, ensayos y tratamiento de trastornos mediados por pKal**

30 Prioridad:

20.01.2013 US 201361754600 P

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

01.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JOSEPH, KUSUMAM y
KAPLAN, ALLEN, P.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 718 347 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, ensayos y tratamiento de trastornos mediados por pKal

Antecedentes

5 La calicreína plasmática (pKal) es la principal enzima generadora de bradiquinina en la circulación. La activación de pKal se produce a través del sistema de contacto que ha sido relacionado con la patología de la enfermedad asociada con el angioedema hereditario (HAE, por sus siglas en inglés). La bradiquinina es un mediador clave del dolor, la inflamación, el edema y la angiogénesis.

10 El inhibidor de C1 de la proteasa del plasma (también conocido como inhibidor de C1 o C1-INH) es un inhibidor de la proteasa que pertenece a la superfamilia de la serpina. Su función principal es la inhibición del sistema del complemento para prevenir la activación espontánea. Los angioedemas hereditarios de tipo I y II son provocados por deficiencias genéticas de C1-INH, que conducen a la producción excesiva de bradiquinina.

15 Govers-Reimslag *et al.* (J Thromb Haemost. 5(9):1896-903 (2007)) comentan la implicación del sistema plasmático de calicreína-quinina en la aterotrombosis. Schneider *et al.* (J Allergy Clin Immunol. 120(2):416-22 (2007)) consideran el papel de la calicreína en la patogénesis del angioedema hereditario. Konrad Bork (Curr Allergy Asthma Rep 12:273 (2012)) comenta las opciones de tratamiento para gestionar el angioedema hereditario, mientras que Marc Riedl (World Allergy Organization Journal 3:226 (2010)) considera las estrategias actuales para el tratamiento del angioedema hereditario.

Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona un método, que comprende:
poner en contacto una muestra que contiene inhibidor de C1 de la proteasa del plasma (C1-INH) con un reactivo de captura, que está inmovilizado sobre un sustrato, y
medir en la muestra un nivel de C1-INH funcional que se une al reactivo de captura;
en el que el reactivo de captura comprende:

- 25 i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo,
ii) una forma activa de la calicreína plasmática, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma, o
iii) una combinación de i) y ii).

La presente invención proporciona, además, un kit para detectar el inhibidor de C1 (C1-INH) funcional de la proteasa del plasma capaz de unirse a un reactivo de captura, que comprende:

- 30 a) un reactivo de captura inmovilizado sobre un sustrato, comprendiendo el reactivo de captura:
i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo;
ii) una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma; o
iii) una combinación de i) y ii);
b) un reactivo de detección que se une a C1-INH; y, opcionalmente,
c) C1-INH.

35 La presente invención proporciona, además, un método para evaluar un tratamiento de un trastorno mediado por pKal en un sujeto, que comprende:

- 40 medir el nivel del inhibidor de C1 (C1-INH) funcional de la proteasa del plasma que es capaz de inhibir la calicreína plasmática, Factor XII, o ambos en muestras recogidas del sujeto antes y después del tratamiento o durante el curso del tratamiento, siendo preferiblemente la muestra una muestra de sangre o una muestra de plasma; en donde los niveles de C1-INH funcional se miden por el método de la invención; y
evaluar la efectividad del tratamiento en base al nivel de C1-INH funcional, en donde un aumento del nivel de C1-INH funcional después del tratamiento o a lo largo del transcurso del tratamiento indica que el tratamiento es efectivo en el sujeto;
en donde preferiblemente el sujeto es un paciente humano con HAE.

45 Sumario de la divulgación

Los ensayos de diagnóstico funcional actualmente disponibles para investigar el C1-INH emplean la inhibición de C1s activados y, por lo tanto, el sistema del complemento. La presente divulgación se basa en el desarrollo de nuevos ensayos de diagnóstico que emplean la inhibición de PKal, FXII o ambos, por lo tanto, la vía de señalización mediada por PKal. Sorprendentemente, los ensayos de diagnóstico descritos en esta memoria distinguen con éxito el 100% de los pacientes que tienen tipos I y II de HAE de los pacientes control.

Por consiguiente, un aspecto de la presente divulgación presenta un método, que comprende: (a) poner en contacto una muestra que contiene inhibidor de C1 (C1-INH) de la proteasa del plasma con un reactivo de captura, y (b)

medir un nivel del C1-INH en la muestra que se une al reactivo de captura. El reactivo de captura comprende: i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo, ii) una forma activa de calicreína plasmática, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma, o iii) una combinación de i) e ii). Por ejemplo, el reactivo de captura puede ser la forma activa de Factor XII, la forma activa de calicreína plasmática, o una combinación de las mismas. Cualquiera de los reactivos de captura para uso en los ensayos descritos en esta memoria puede inmovilizarse sobre un sustrato.

En algunas realizaciones, el nivel de C1-INH que se une al agente de captura se mide utilizando un agente de detección que se une a C1-INH, por ejemplo, un anticuerpo que se une a C1-INH. En algunas realizaciones, el nivel de C1-INH que se une al agente de captura se mide mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La muestra que contiene C1-INH (p. ej., una muestra de sangre o una muestra de plasma) puede obtenerse de un sujeto. En algunos ejemplos, el sujeto tiene un síntoma de un trastorno mediado por pKal, que puede ser edema, ataques recurrentes de hinchazón; hinchazón, en donde dicho hinchazón es completa o predominantemente periférico; urticaria; enrojecimiento, dolor e hinchazón en ausencia de evidencia de infección; o edema no mediado por histamina. En otros ejemplos, el sujeto es resistente a una terapia anti-histamínica, una terapia con corticosteroides o ambas. En aún otros ejemplos, el sujeto no tiene síntomas de un trastorno mediado por pKal en el momento en el que se recoge la muestra, no tiene antecedentes de un síntoma de un trastorno mediado por pKal o no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal.

En algunas realizaciones, el método descrito en esta memoria comprende, además, identificar al sujeto que está en riesgo o padece un trastorno mediado por pKal si el nivel de C1-INH que se une al reactivo de captura en la muestra se reduce en comparación con un valor de referencia. El trastorno mediado por pKal puede ser angioedema idiopático dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, 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 stents, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal inflamatoria, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad de la columna vertebral degenerativa, íleo post-operatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario (HAE), embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, sepsis, arteria cerebral media aguda (MCA, por sus siglas en inglés) evento isquémico (accidente cerebrovascular), reestenosis, nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el plegamiento incorrecto de proteínas, una enfermedad asociada con la angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias, o lesiones tisulares. En algunos ejemplos, el trastorno mediado por pKal es HAE.

Si se identifica que el sujeto está en riesgo de tener o tiene un trastorno mediado por pKal (p. ej., HAE), el método descrito en esta memoria puede comprender, además, administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente de unión a calicreína; un antagonista del receptor de bradiquinina B2 y un agente de reemplazo de C1-INH. En algunos casos, el agente terapéutico es DX-88, DX-2930 o EPIKAL-2.

Otro aspecto de la presente divulgación presenta un método para tratar a un sujeto (p. ej., un paciente humano) que tiene un trastorno mediado por pKal (p. ej., HAE), comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente terapéutico, que es un agente de unión a calicreína, un antagonista del receptor B2 de bradiquinina o un agente de reemplazo de C1-INH. El sujeto a tratar por este método tiene un nivel reducido de C1-INH que es capaz de unirse a un reactivo de captura en comparación con un valor de referencia. El reactivo de captura comprende: i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo; ii) una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH, o iii) una combinación de i) y ii). El nivel de C1-INH del sujeto puede determinarse por cualquiera de los métodos de ensayo descritos en esta memoria.

En algunos ejemplos, el agente terapéutico es DX-88, DX-2930 o EPIKAL-2.

También están dentro del alcance de la presente divulgación composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de un sujeto (p. ej., un paciente humano) que tiene un trastorno mediado por pKal (p. ej., HAE) y un nivel reducido de C1-INH que es capaz de unirse a un reactivo de captura en comparación con un valor de referencia. La composición farmacéutica comprende un agente terapéutico para tratar el trastorno, que puede ser un agente de unión a calicreína, un antagonista del receptor B2 de bradiquinina o un agente de reemplazo de C1-INH, y un soporte farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación también proporciona usos de las composiciones farmacéuticas descritas en esta memoria en la fabricación de medicamentos para uso en el tratamiento de trastornos mediados por PKal, tales como HAE. En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit para

detectar inhibidor de C1 (C1-INH) de la proteasa del plasma capaz de unirse a un reactivo de captura. El kit puede comprender: a) un reactivo de captura que comprende:

- i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo;
- ii) una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma; o
- iii) una combinación de i) y ii);

5

b) un reactivo de detección que se une a C1-INH y, opcionalmente, c) C1-INH.

En algunas realizaciones, el reactivo de captura, que puede ser FXIIa, la forma activa de PKal, o una combinación de los mismos, se inmoviliza sobre un sustrato. En algunas realizaciones, el reactivo de detección es un anticuerpo anti-C1-INH.

- 10 Además, la presente divulgación proporciona un método para evaluar un tratamiento de un trastorno mediado por pKal en un sujeto (*p. ej.*, un paciente con HAE humano), que comprende: (a) medir los niveles de inhibidor de C1 (C1-INH) de la proteasa del plasma que es capaz de inhibir la calicreína plasmática, factor XII, o ambos en muestras recogidas del sujeto antes y después del tratamiento o durante el curso del tratamiento, y (b) evaluar la efectividad del tratamiento en base a los niveles de C1-INH, en donde una disminución del nivel de C1-INH después del
- 15 tratamiento o en el transcurso del tratamiento indica que el tratamiento es efectivo en el sujeto.

En algunas realizaciones, el tratamiento implica un agente de unión a calicreína, un antagonista del receptor B2 de bradiquinina o un agente de reemplazo de C1-INH. Por ejemplo, el tratamiento implica a DX-88, DX-2930 o EPIKAL-2. Alternativamente o además, las muestras recogidas del sujeto son muestras de sangre o muestras de plasma.

- 20 En algunas realizaciones, los niveles del C1-INH pueden medirse mediante un método de ensayo tal como se describe en esta memoria. Por ejemplo, los niveles del C1-INH se pueden medir mediante un proceso que comprende: (a) poner en contacto las muestras recogidas del sujeto con un reactivo de captura (*p. ej.*, inmovilizado sobre un sustrato), y (b) medir un nivel del C1-INH en la muestra que se une al reactivo de captura, que puede comprender: i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo, ii) una forma activa de calicreína plasmática, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo, o iii) una combinación de i) y ii). En algunos
- 25 ejemplos, el reactivo de captura comprende la forma activa de Factor XII, la forma activa de calicreína plasmática o una combinación de las mismas. En cualquiera de los ensayos descritos en esta memoria, los niveles del C1-INH se pueden medir utilizando un agente de detección que se une a C1-INH, *p. ej.*, un anticuerpo que se une a C1-INH. En algunos ejemplos, los niveles de C1-INH se miden mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

- 30 Las siguientes realizaciones también están dentro del alcance de la presente divulgación.

La presente divulgación proporciona métodos para evaluar (*p. ej.*, Identificar) un sujeto, *p. ej.*, un sujeto en riesgo de padecer o que padezca (*p. ej.*, tenga) un trastorno mediado por pKal o mediado por bradiquinina. Los métodos proporcionados permiten el análisis de pacientes con angioedema mediado por calicreína plasmática (KMA, por sus siglas en inglés) u otras enfermedades mediadas por pKal útiles en la evaluación y el tratamiento.

- 35 Realizaciones de la divulgación proporcionan un biomarcador y su uso en la identificación y el tratamiento de pacientes, *p. ej.*, pacientes que padecen edema provocado por bradiquinina que se genera por la calicreína plasmática. Métodos, composiciones y dispositivos descritos en esta memoria son útiles de varias maneras. Por ejemplo, los niveles de un marcador de pKal se pueden utilizar para identificar trastornos asociados con la activación elevada del sistema de contacto. El rastreo inicial puede seguirse con ensayos *in vitro* o *in vivo* con inhibidores de la calicreína plasmática (*p. ej.*, DX-88, EPI-KAL2 o DX-2930), *p. ej.*, en modelos preclínicos de la enfermedad. Un
- 40 marcador descrito en esta memoria también se puede utilizar como biomarcador farmacodinámico o para controlar de otro modo la respuesta de un sujeto a un inhibidor de la calicreína. Un marcador descrito en esta memoria se puede utilizar en un diagnóstico complementario para permitir el tratamiento de enfermedades mediadas por la calicreína plasmática, administrar la dosificación durante la terapia profiláctica de un trastorno mediado por pKal o
- 45 bradiquinina, *p. ej.*, HAE, angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, lesión por isquemia/reperusión cerebral, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis, trombosis asociada con dispositivos de asistencia ventricular, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable.

- 50 En esta memoria se describe un método para evaluar a un sujeto, *p. ej.*, un sujeto con riesgo de padecer un trastorno mediado por pKal, un trastorno mediado por bradiquinina, *p. ej.*, un edema resistente a la histamina o HAE, que comprende: a) adquirir una muestra que comprende tejido de un sujeto, *p. ej.*, sangre, plasma o lágrimas; b) poner en contacto dicha muestra, *p. ej.*, *in vitro*, con uno o más reactivos de captura en condiciones suficientes para la formación de un complejo entre C1-INH y dicho uno o más reactivos de captura, en donde dicho reactivo de
- 55 captura comprende uno o ambos de: i) un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de

unión a C1-INH del mismo; o ii) un resto que comprende una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma; y c) evaluar el nivel de unión de CI-INH a dicho reactivo de captura.

5 En algunas realizaciones, dicha evaluación comprende comparar el nivel determinado de unión de C1-INH a dicho reactivo de captura con una referencia, en donde un nivel que cumple un criterio predeterminado, p. ej., si está en o debajo de una referencia, es indicativo de un trastorno susceptible de tratamiento con un inhibidor de pKal. La referencia puede ser, p. ej., el nivel en una persona que no tiene un trastorno mediado por pKal, p. ej., una persona que no tiene HAE, u otro trastorno descrito en esta memoria, o que no tiene antecedentes de un síntoma de un trastorno de este tipo.

10 En algunas realizaciones, el trastorno mediado por pKal se selecciona de: HAE, angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, 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 stents, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal inflamatoria, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad de la columna vertebral degenerativa, íleo post-operatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, sepsis, arteria cerebral media aguda (MCA) evento isquémico (accidente cerebrovascular), reestenosis (p. ej., tras angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el plegamiento incorrecto de proteínas, una enfermedad asociada con la angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (p. ej., anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, persistente, rinitis) y lesiones tisulares (p. ej., lesiones por quemaduras o productos químicos).

25 En algunas realizaciones, dicho sujeto se evalúa para determinar la susceptibilidad al trastorno mediado por pKal. En determinadas realizaciones, dicho sujeto tiene un síntoma de, p. ej., coherencia con un trastorno mediado por pKal, p. ej., edema. En determinadas realizaciones, dicho sujeto tiene un síntoma de un trastorno caracterizado por una activación de pKal no deseada y a dicho sujeto se le ha administrado una terapia antihistamínica o terapia con corticosteroides y los síntomas eran resistentes a la misma. En algunas realizaciones, dicho sujeto tiene uno o más o todos los siguientes síntomas o propiedades: ataques recurrentes de hinchazón; hinchazón en la que dicha hinchazón es completa o predominantemente periférica, p. ej., el sujeto no tiene una hinchazón abdominal o de las vías respiratorias significativa; urticaria; enrojecimiento, dolor e hinchazón en ausencia de evidencia de infección; no responde a la terapia con antihistamínicos o corticosteroides; o tiene edema no mediado por histamina.

35 En algunas realizaciones, dicho sujeto tiene edema persistente o recurrente y no responde a una o ambas terapias con antihistamínicos y esteroides.

40 En algunas realizaciones, el sujeto que tiene el sujeto no tiene un historial de un trastorno mediado por pKal, p. ej., HAE, IAE, IBD o IBS. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un historial de un trastorno mediado por pKal, p. ej., HAE, IAE, IBD o IBS. En algunas realizaciones, el sujeto no tiene un historial de HAE. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un historial de HAE. En algunas realizaciones, el sujeto no tiene un historial de IAE. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un historial de IAE. En algunas realizaciones, el sujeto no tiene un historial de IBD o IBS. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un historial de IBD o IBS. En algunas realizaciones, el sujeto no tiene un historial de un trastorno mediado por histamina, p. ej., una alergia alimentaria. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un historial de un trastorno mediado por histamina, p. ej., una alergia a los alimentos. En algunas realizaciones, el sujeto no tiene un historial de un trastorno mediado por pKal, p. ej., HAE, IAE, IBD o IBS, y no tiene un historial de un trastorno mediado por histidina, p. ej., una alergia alimentaria. En algunas realizaciones, el sujeto no tiene un historial de un trastorno mediado por pKal, p. ej., HAE, IAE, IBD o IBS, y tiene un historial de un trastorno mediado por histamina, p. ej., una alergia alimentaria. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un historial de un trastorno mediado por pKal, p. ej., HAE, IAE, IBD o IBS, y no tiene un historial de un trastorno mediado por histidina, una alergia alimentaria. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un historial de un trastorno mediado por pKal, p. ej., HAE, IAE, IBD o IBS, y tiene un historial de un trastorno mediado por histamina, p. ej., una alergia alimentaria.

50 En determinadas realizaciones, dicho sujeto tiene un historial de angioedema. En determinadas realizaciones, dicho sujeto no tiene un historial de angioedema. En realizaciones particulares, dicho sujeto no padece un síntoma característico de un trastorno mediado por pKal o bradiquinina, p. ej., edema. En determinadas realizaciones, dicho sujeto sufre un ataque de angioedema cuando dicho tejido se extrajo del cuerpo del sujeto.

55 En algunas realizaciones, dicho uno o más reactivos de captura se disponen sobre un sustrato. En determinadas realizaciones, el sustrato es un sustrato insoluble. En algunas realizaciones, dicho uno o más reactivos de captura comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo. En realizaciones

particulares, dicho uno o más reactivos de captura comprenden una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma. En realizaciones particulares, dicho uno o más reactivos de captura comprenden una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo y una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma.

5 En algunas realizaciones, dicho método no incluye evaluar la unión de C1-INH a C1 activado, p. ej., C1s.

En algunas realizaciones, dicho uno o más reactivos de captura comprenden un primer resto de unión específico que forma un complejo con un segundo resto de unión específico dispuesto sobre dicho sustrato. En determinadas realizaciones, dicho primer y segundo resto de unión se seleccionan de biotina y avidina.

10 En algunas realizaciones, dicho método comprende, p. ej., en dicha evaluación, evaluar la unión de un reactivo de detección con dicho complejo, p. ej., un reactivo de detección que se une a C1INH complejado, p. ej., un anticuerpo anti-C1INH, p. ej., el reactivo de detección puede unirse a C1INH antes o después de la formación de un complejo entre el C1INH y el reactivo de captura. En determinadas realizaciones, el método comprende suministrar un reactivo de detección en condiciones suficientes para formar un complejo entre C1-INH y un reactivo de detección. En algunas realizaciones, dicho C1-INH está complejado con reactivo de captura. En realizaciones particulares, dicho método comprende formar un complejo que comprende un reactivo de detección, C1-INH y reactivo de captura, en el que dicho reactivo de detección está complejado con dicho C1-INH, dicho C1-INH está complejado con reactivo de captura.

20 En algunas realizaciones, el reactivo de captura comprende un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo. En algunas realizaciones, el reactivo de captura comprende un resto que comprende una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma. En algunas realizaciones, el reactivo de captura comprende uno o ambos de: i) un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo, o ii) un resto que comprende una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo. En realizaciones particulares, el reactivo de captura comprende un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo. En realizaciones particulares, el reactivo de captura comprende un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o uno de sus fragmentos de unión a C1-INH como un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH.

30 En algunas realizaciones, el reactivo de captura comprende, además, un resto que une dicho complejo a un sustrato. En determinadas realizaciones, dicho resto comprende un primer y un segundo participante en la unión, en donde uno está unido a dicho reactivo de captura y el otro está unido a dicho sustrato.

35 En algunas realizaciones, el método comprende, además, administrar un agente terapéutico descrito en esta memoria a dicho sujeto. En determinadas realizaciones, dicho agente terapéutico se selecciona de: un agente de unión a calicreína; un antagonista del receptor de bradiquinina B2; o un agente de reemplazo de C1-INH. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende DX-88. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende DX-2930. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende EPIKAL-2. En algunas realizaciones, el método comprende, además, administrar una segunda terapia.

En algunas realizaciones, el método comprende determinar si dicho sujeto tiene HAE.

40 En esta memoria se describe un método para evaluar un sujeto según el tipo de HAE, que comprende: (i) adquirir un valor para la función de C1-INH para el sujeto mediante métodos descritos en esta memoria (p. ej., medir un nivel del C1-INH en la muestra que se une a el reactivo de captura); y (ii) adquirir un valor para el nivel total de proteína C1-INH (p. ej., medir un nivel total de C1-INH); en donde si el valor para la función C1-INH proporcionado por (i) cumple con un criterio preseleccionado, p. ej., está por debajo de un valor de referencia, y el valor para el nivel de proteína C1-INH proporcionado por (ii) cumple con un criterio preseleccionado, p. ej., está por encima de un valor de referencia, categorizar luego al sujeto como que tiene HAE tipo II. En algunas realizaciones, al menos uno de (i) y (ii) se adquiere directamente.

50 En esta memoria se describe un método para tratar a un sujeto, que comprende adquirir una evaluación de dicho sujeto realizada por métodos descritos en esta memoria; y, en respuesta a ello, seleccionar una terapia para, o administrar una terapia a dicho paciente. En algunas realizaciones, el método comprende, además, administrar un agente terapéutico descrito en esta memoria a dicho sujeto. En determinadas realizaciones, dicho agente terapéutico se selecciona de: un agente de unión a calicreína; un antagonista del receptor B2 de bradiquinina; o un agente de reemplazo de C1-INH. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende DX-88. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende DX-2930. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende EPIKAL-2.

5 En esta memoria se describe un método para tratar a un sujeto, que comprende: proporcionar un sujeto que ha sido evaluado mediante métodos descritos en esta memoria; y, en respuesta a ello, seleccionar una terapia para, o administrando una terapia a dicho paciente. En algunas realizaciones, el método comprende, además, administrar un agente terapéutico descrito en esta memoria a dicho sujeto. En determinadas realizaciones, dicho agente terapéutico se selecciona de: un agente de unión a calicreína; un antagonista del receptor B2 de bradiquinina; o un agente de reemplazo de C1-INH. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende DX-88. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende DX-2930. En realizaciones particulares, dicho agente terapéutico comprende EPIKAL-2.

10 En esta memoria se describe una mezcla de reacción que comprende un reactivo de captura descrito en esta memoria, opcionalmente, complejado con C1-INH, y opcionalmente complejado con un reactivo de detección. En realizaciones, la mezcla de reacción comprende plasma del sujeto. En algunas realizaciones, los elementos no complejados de la muestra se han eliminado, p. ej., mediante lavado.

15 En esta memoria se describe un sustrato que comprende uno o más agentes de captura tal como se describe en esta memoria, p. ej., uno o ambos de i) un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo; o ii) un resto que comprende una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma. En algunas realizaciones, dicho sustrato comprende los restos i e ii, dispuestos en regiones direccionables individualmente.

20 En esta memoria se describe un dispositivo que comprende un sustrato sobre el cual se dispone al menos uno y, en una realización, ambos reactivos de captura descritos en esta memoria. En realizaciones, un primer reactivo de captura está dispuesto en una primera región y el segundo reactivo de captura está dispuesto en una segunda región de dicho sustrato, p. ej., en diferentes pocillos.

En esta memoria se describe un kit que comprende uno o más de: uno o ambos reactivos de captura descritos en esta memoria, opcionalmente dispuestos sobre un sustrato; un reactivo de detección, p. ej., un anticuerpo anti-C1-INH o un anticuerpo anti-anti-C1-INH; y patrones, p. ej., C1-INH.

25 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se recogen en los dibujos adjuntos y en la descripción que figura más adelante. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

30 La **FIG. 1** representa una detección a modo de ejemplo de la formación del complejo calicreína-C1-INH mediante ELISA. De izquierda a derecha - control normal, muestras de plasma de pacientes con HAE Tipo I, HAE Tipo II y HAE Tipo III.

La **FIG. 2** representa una detección a modo de ejemplo de la formación del complejo Factor XII-C1-INH activado mediante ELISA. De izquierda a derecha - control normal, muestras de plasma de pacientes con HAE Tipo I, HAE Tipo II y HAE Tipo III.

35 La **FIG. 3** es una ilustración esquemática de un método a modo de ejemplo para medir los niveles de C1-INH basados en la inhibición de FXIIa a través de un ensayo ELISA.

40 La **FIG. 4** incluye gráficos que muestran datos de ELISAs funcionales a modo de ejemplo en muestras de control y muestras de HAE. La **FIG. 4A** representa datos de un ELISA funcional comercialmente disponible para medir C1-INH basado en la inhibición de C1s. La **FIG. 4B** representa datos de un ensayo ELISA funcional a modo de ejemplo para medir C1-INH basado en la inhibición de calicreína. La **FIG. 4C** representa datos de un ensayo ELISA funcional a modo de ejemplo para medir C1-INH basado en la inhibición de FXII.

Descripción detallada

45 La calicreína plasmática (PKal) es un componente de la serina proteasa del sistema de contacto y es la principal enzima generadora de bradiquinina en la circulación. El sistema de contacto es activado por el factor XIIa (la forma activa del factor XII o FXII) tras la exposición a superficies extrañas o con carga negativa o en las superficies de células endoteliales mediante proilcarboxipeptidasas (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). La activación de la calicreína plasmática amplifica la coagulación intrínseca a través de su activación por retroalimentación de factor XII y aumenta la inflamación a través de la producción del nonapéptido bradiquinina proinflamatorio. Como la quininogenasa primaria en la circulación, la calicreína plasmática es en gran parte responsable de la generación de bradiquinina en la vasculatura. Una deficiencia genética en la proteína inhibidor de C1 (C1-INH) conduce a angioedema hereditario (HAE). Pacientes con HAE sufren ataques agudos de edema doloroso a menudo precipitados por desencadenantes desconocidos (Zuraw B.L. et al., *N Engl J Med* 359, 1027-

1036, 2008). Mediante el uso de agentes farmacológicos o estudios genéticos en modelos animales, el sistema de calicreína-quinina en plasma (KKS en plasma) se ha implicado en diversas enfermedades.

5 El angioedema hereditario (HAE), tipos I y II, es un trastorno autosómico dominante caracterizado por hinchazón en las extremidades, la cara, el tracto gastrointestinal o las vías respiratorias superiores (1). Los ataques duran 2-5 días y, si no se tratan adecuadamente, la hinchazón de la laringe, en particular, puede ser fatal. Dado que este es un trastorno raro (que afecta a de 1:20.000 hasta 1:50.000 personas) con una presentación variable, el diagnóstico puede pasarse por alto. El HAE generalmente es provocado por una mutación heterocigótica en el gen C1-INH que resulta en niveles reducidos de proteína (HAE tipo I, 85% de los casos) o función reducida (HAE tipo II, 15%) (2). En el HAE tipo I, el nivel de proteína C1-INH es bajo y el nivel funcional es proporcionalmente bajo, mientras que en el HAE tipo II, el nivel de proteína es normal o incluso elevado, pero el nivel funcional es bajo. Por lo tanto, se requiere un ensayo funcional, no solo para confirmar el diagnóstico de HAE, sino también para diagnosticar la enfermedad de tipo II sin éste.

15 C1-INH es una enzima serina proteasa que inhibe las proteínas activadas del complemento, la coagulación y las cascadas de formación de quinina. Los ensayos actualmente disponibles utilizados para evaluar el nivel funcional de C1-INH miden la inhibición de C1s de la cascada del complemento mediante C1-INH, utilizando un ensayo cromogénico o un método ELISA complejo. El ensayo cromogénico generalmente se considera preferible (3), pero ambos métodos tienen limitaciones. Es más probable que el ensayo cromogénico tenga un falso positivo ocasional, mientras que el ELISA complejo tiene un valor predictivo negativo de solo 62%.

20 Una limitación tanto del ELISA complejo como de los métodos cromogénicos conocidos en la técnica es que los ensayos miden la actividad de C1-INH en una enzima de la cascada del complemento, que no es la causa de enfermedades mediadas por PKal, tales como el HAE. De hecho, se ha informado que un C1-INH disfuncional tiene actividad normal en la cascada formadora de quinina, por lo tanto, no se produce angioedema alguno, pero fracasa en inhibir C1s, por lo que C1 es anormalmente activo y C4 está agotado (7). Por lo tanto, la tecnología actualmente disponible no permitiría medir el nivel de C1-INH que es funcional para inhibir la cascada de formación de quinina (p. ej., inhibiendo PKal y/o FXIIa).

25 La presente divulgación se basa en el desarrollo de nuevos ensayos para medir C1-INH funcional empleando metodología ELISA basado en la inhibición de factor XII activado, o calicreína plasmática, para el diagnóstico de HAE tipos I y II. Estos ensayos tienen relevancia fisiológica particularmente con enfermedades/trastornos asociados con la vía de señalización de PKal y, por lo tanto, serían un avance importante con respecto a los métodos conocidos en la técnica.

30 En esta memoria se describen nuevos métodos de ensayo para medir los niveles de C1-INH basados en la inhibición de PKal y/o FXII (p. ej., formas activas de las proteínas) y kits para llevar a cabo los métodos de ensayo. En esta memoria también se describe la aplicación de métodos de ensayo de este tipo en el diagnóstico de pacientes que tienen o están en riesgo de padecer una enfermedad/un trastorno mediado por PKal, tal como el HAE o la evaluación de un tratamiento de la enfermedad/trastorno.

Definiciones

Por conveniencia, antes de una descripción adicional de la presente invención, se definen aquí determinados términos y expresiones empleados en la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas. Otros términos y expresiones se definen como aparecen en la memoria descriptiva.

40 Las formas en singular "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "adquirir" o "adquiriendo" se refiere a la posesión de una entidad física, o un valor, p. ej., un valor numérico, mediante la "adquisición directa" o la "adquisición indirecta" de la entidad física o el valor. "Adquirir directamente" significa realizar un proceso (p. ej., realizar un ensayo o test en una muestra o "analizar una muestra" tal como se define ese término en esta memoria) 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 (p. ej., un laboratorio de terceros que adquirió directamente la entidad física o el valor). Adquirir directamente una entidad física incluye realizar un proceso, p. ej., analizar una muestra, que incluye un cambio físico en una sustancia física, p. ej., un material de partida. Cambios a modo de ejemplo incluyen hacer una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cortar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, 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, p. ej., realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, p. ej., una muestra, analito o reactivo (al que algunas veces se alude en esta memoria como "análisis físico"), que realiza un método analítico, p. ej., un método que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, p. ej., un

analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, de otra sustancia; combinando un analito o fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, p. ej., un tampón, disolvente o reaccionante; o cambiando la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiando la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado del mismo, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

Tal como se utiliza en esta memoria, "analizar" una muestra incluye realizar un proceso que implica un cambio físico en una muestra u otra sustancia, p. ej., un material de partida. Cambios a modo de ejemplo incluyen hacer una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, cortar o fragmentar una sustancia, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades separadas en una mezcla, realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. El análisis de una muestra puede incluir realizar un proceso analítico que incluye un cambio físico en una sustancia, p. ej., una muestra, analito o reactivo (al que a veces se alude en esta memoria como "análisis físico"), realizar un método analítico, p. ej., un método que incluye uno o más de lo siguiente: separar o purificar una sustancia, p. ej., un analito o un fragmento u otro derivado del mismo, de otra sustancia; p. ej., un tampón, disolvente o reaccionante; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiando la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado del mismo, p. ej., rompiendo o formando un enlace covalente o no covalente entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

El término "agonista", tal como se utiliza en esta memoria, pretende referirse a un agente que imita o regula al alza (p. ej., potencia o complementa) la bioactividad de una proteína. Un agonista puede ser una proteína de tipo salvaje o un derivado de la misma que tenga al menos una bioactividad de la proteína de tipo salvaje. Un agonista también puede ser un compuesto que aumente al menos una bioactividad de una proteína. Un agonista también puede ser un compuesto que aumente la interacción de un polipéptido con otra molécula, p. ej., un péptido diana o un ácido nucleico.

El término "antagonista", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un agente que regula a la baja (p. ej., suprime o inhibe) al menos una bioactividad de una proteína. Un antagonista puede ser un compuesto que inhibe o disminuye la interacción entre una proteína y otra molécula, p. ej., un péptido diana o un sustrato enzimático. Un antagonista también puede ser un compuesto que reduce o inhibe la cantidad de proteína expresada presente. Típicamente, inhibir una proteína o un gen se refiere a reducir la expresión o una actividad relevante de la proteína o gen en al menos un 10% o más, por ejemplo, un 20%, 30%, 40% o 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más, o una disminución en la expresión o la actividad relevante de más de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 -lo doble o más, medido por uno o más métodos descritos en esta memoria o reconocidos en la técnica.

Tal como se utiliza en esta memoria, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o K_a . La K_a es el recíproco de la constante de disociación (K_d). Una proteína de unión puede tener, por ejemplo, una afinidad de unión de al 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 relación a una segunda diana se puede indicar mediante una mayor K_a (o un menor valor numérico K_d) para unir la primera diana que la K_a (o el valor numérico K_d) para unir la segunda diana. En tales casos, la proteína de unión tiene especificidad para la primera diana (p. ej., una proteína en una primera conformación o imitación de la misma) en relación con la segunda diana (p. ej., la misma proteína en una segunda conformación o imitación de la misma; o una segunda proteína). Las diferencias en la afinidad de unión (p. ej., para la especificidad u otras comparaciones) pueden ser al menos 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 se puede determinar mediante una diversidad de métodos que incluyen diálisis en equilibrio, unión en equilibrio, filtración en gel, ELISA, resonancia de plasmón superficial o espectroscopia (p. ej., utilizando un ensayo de fluorescencia). Condiciones a modo de ejemplo para evaluar la afinidad de unión están en tampón TRIS (TRIS 50 mM, NaCl 150 mM, $CaCl_2$ 5 mM a pH 7,5). Estas técnicas se pueden utilizar para medir la concentración de proteína de unión unida y libre en función de la concentración de proteína de unión (o diana). La concentración de la proteína de unión unida ([Unida]) está relacionada con la concentración de la proteína de unión libre ([Libre]) y la concentración de los sitios de unión para la proteína de unión en la diana, en donde (N) es el número de sitios de unión por molécula diana por la siguiente ecuación:

$$[Unida] = N [Libre]/(1/K_a) + [Libre].$$

No siempre es necesario hacer una determinación exacta de K_a , aunque, ya que a veces es suficiente obtener una medición cuantitativa de la afinidad, p. ej., determinada utilizando un método tal como análisis ELISA o FACS, es proporcional a K_a y, por lo tanto, puede utilizarse para comparaciones, tales como determinar si una afinidad más alta es, por ejemplo, 2 veces más alta, para obtener una medición cualitativa de la afinidad, o para obtener una inferencia de afinidad, p. ej., por actividad en un ensayo funcional, p. ej., 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 utiliza indistintamente con "ligando". Una "proteína de unión a la calicreína plasmática" se refiere a una proteína que puede interactuar con (p. ej., unirse a) la calicreína plasmática e incluye, en particular, proteínas que interactúan de manera preferencial o específica con y/o inhiben la calicreína plasmática. Una proteína inhibe la calicreína plasmática si provoca una disminución en 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 realizaciones, la proteína de unión a la 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 utiliza en esta memoria, el término "complejo" o la expresión "formación de complejos" se refiere a un complejo entre miembros que tienen una afinidad específica entre sí.
- Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido es reemplazado por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales de carácter básico (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales de carácter ácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).
- 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 (p. ej., cualquiera de los veinte aminoácidos naturales) a menos que se especifique lo contrario, p. ej., para referirse a cualquier aminoácido que no sea cisteína. También pueden indicarse otros aminoácidos permitidos, por ejemplo, utilizando paréntesis y barras. Por ejemplo, "(A/W/F/N/Q)" significa que se permiten alanina, triptófano, fenilalanina, asparagina y glutamina en esa posición particular.
- Tal como se utiliza en esta memoria, un "reactivo de detección" se refiere a un resto que se une al resto a ser detectado. Normalmente genera una señal, p. ej., fluorescencia, o produce un compuesto mensurable.
- Un "epítipo" se refiere al sitio en un compuesto diana que está unido por una proteína de unión (p. ej., un anticuerpo tal como un anticuerpo Fab o de longitud completa). En el caso de que el compuesto diana sea una proteína, el sitio puede estar completamente compuesto de componentes de aminoácidos, completamente compuesto de modificaciones químicas de los aminoácidos de la proteína (p. ej., restos glicosilo), o compuesto de combinaciones de los mismos. Epítipos solapantes incluyen al menos un resto de aminoácido común, un grupo glicosilo, un grupo fosfato, un grupo sulfato u otra característica molecular.
- Una primera proteína de unión (p. ej., anticuerpo) "se une al mismo epítipo" como una segunda proteína de unión (p. ej., anticuerpo) si la primera proteína de unión se une al mismo sitio en un compuesto diana que se une la segunda proteína de unión, o se une a un sitio que se solapa (p. ej., un solapamiento del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de solapamiento, p. ej., en términos de secuencia de aminoácidos u otra característica molecular (p. ej., grupo glicosilo, grupo fosfato (o grupo sulfato)) con el sitio al que se une la segunda proteína de unión.
- Una primera proteína de unión (p. ej., anticuerpo) "compite por la unión" con una segunda proteína de unión (p. ej., anticuerpo) si la unión de la primera proteína de unión a su epítipo disminuye (p. ej., en 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 epítipo. La competencia puede ser directa (p. ej., la primera proteína de unión se une a un epítipo que es igual o se solapa con el epítipo unido por la segunda proteína de unión) o indirecta (p. ej., la unión de la primera proteína de unión a su epítipo provoca un cambio estérico en el compuesto diana que disminuye la capacidad de la segunda proteína de unión para unirse a su epítipo).
- Tal como se utiliza en esta memoria, una molécula biológica "funcional" es una molécula biológica en una forma en la que exhibe una propiedad y/o actividad por la cual se caracteriza.
- Cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" entre dos secuencias (el término y la expresión se utilizan indistintamente en esta memoria) se realizan de la siguiente manera. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (p. ej., se pueden introducir huecos en uno o ambos de un primer y un segundo aminoácido o la secuencia de ácidos nucleicos para un alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden ignorarse con fines de comparación). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por extensión de hueco de 4 y una penalización por hueco de desplazamiento de marco de 5. Se comparan los residuos de aminoácidos o los nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o las posiciones de

nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (tal como se utiliza en esta memoria, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

En una realización preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para fines de comparación es al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 60%, e incluso más preferiblemente al menos 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 la inmunoglobulina.

Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "se hibrida en condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad media, alta rigurosidad o condiciones de rigurosidad muy alta" describe condiciones para la hibridación y el lavado. La guía para realizar reacciones de hibridación se puede encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia y pueden utilizarse cualquiera de los dos. Las condiciones de hibridación específicas a las que se hace referencia en ese documento son las siguientes: (1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en 0.2X SSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados se puede aumentar a 55°C en condiciones de baja rigurosidad); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguidas de uno o más lavados en 0.2X SSC, SDS al 0,1% a 60°C; (3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguidas de uno o más lavados en 0.2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C; y (4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad son fosfato sódico 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados a 0,2X SSC, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de rigurosidad muy alta (4) son las condiciones preferidas y las que deben utilizarse, a menos que se especifique lo contrario. La divulgación incluye ácidos nucleicos que se hibridan con una rigurosidad baja, media, alta o muy alta a un ácido nucleico descrito en esta memoria o a un complemento del mismo, p. ej., ácidos nucleicos que codifican una proteína de unión descrita en esta memoria. Los ácidos nucleicos pueden tener la misma longitud o pueden estar 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 esta memoria.

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

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "*in vitro*" se refiere a eventos que se producen en un entorno artificial, p. ej., en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en un cultivo celular, etc., en lugar de dentro de un organismo multicelular.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "*in vivo*" se refiere a eventos que se producen dentro de un organismo multicelular, tal como un ser humano o un animal no humano.

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

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

El término "calicreína" (p. ej., calicreína plasmática) se refiere a peptidasas (enzimas que escinden enlaces péptido en las proteínas), un subgrupo de la familia de serina proteasa. La calicreína plasmática escinde al quininógeno para generar quininas, potentes péptidos pro-inflamatorios.

La expresión "inhibidor de calicreína" se refiere a cualquier agente o molécula que inhibe la calicreína. Por ejemplo, DX-88 (al que también se alude en esta memoria como "PEP-1") es un potente (Ki <1 nM) y específico inhibidor de la calicreína plasmática (NP_000883). (Véase también, p. ej., el documento WO 95/21601 o WO 2003/103475).

Tal como se utiliza en esta memoria, el término "DX-2922" se utiliza de forma indistinta con el término "X101-A01". Otras variantes de este anticuerpo se describen a continuación.

Identificación del anticuerpo	Descripción
X63-G06	Se descubrió un Fab no germinal utilizando ROLIC, el mismo HC pero diferente LC que M160-G12
X81-B01	IgG de línea germinal producida en células HEK 293T
X101-A01	IgG de línea germinal producida en células CHO, la misma secuencia de HC y LC que X81-B01
DX-2922	Nomenclatura alternativa para X101-A01

5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "DX-2930" se utiliza de forma indistinta con el término "X124-G01". Otras variantes de este anticuerpo se describen a continuación.

Identificación del anticuerpo	Descripción
M162-A04	Se descubrió un Fab no de la línea germinal utilizando la presentación de fagos
M199-A08	CDR3 de cadena pesada varió el Fab derivado por la maduración de afinidad de M162-A04
X115-F02	Fab de línea germinal producido en células 293T, la 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 se elimina en X124-G01 (también conocida como DX-2930).

10 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 hecho de materiales biológicos, tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales, que pueden ser capaces de provocar modulación. Los moduladores pueden evaluarse por su actividad potencial como inhibidores o activadores (directa o indirectamente) de una propiedad funcional, actividad o proceso biológico, o una combinación de ellos (p. ej., agonista, antagonista parcial, agonista parcial, agonista inverso, antagonista, agentes antimicrobianos, inhibidores de la infección o proliferación microbiana, y similares) por inclusión en ensayos. En dichos ensayos, muchos moduladores pueden ser rastreados al mismo tiempo. La actividad de un modulador puede ser conocida, desconocida o parcialmente conocida.

15 Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser alterado desde la secuencia de tipo salvaje del agente de unión, p. ej., el anticuerpo, sin abolir o, más preferiblemente, sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que cambiar un residuo de aminoácido "esencial" da como resultado una pérdida sustancial de actividad.

20 Un "paciente", "sujeto" o "huésped" (estos términos se utilizan indistintamente) a ser tratado por el método objeto puede significar un animal humano o no humano. En algunas realizaciones, se sospecha que un sujeto tiene o está en riesgo de padecer un trastorno mediado por calicreína, p. ej., un trastorno mediado por bradiquinina, p. ej., angioedema hereditario (HAE), angioedema idiopático dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, 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 stents, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal inflamatoria, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad de la columna vertebral degenerativa, íleo post-operatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, sepsis, arteria cerebral media aguda (MCA), evento isquémico (accidente cerebrovascular), reestenosis (p. ej., después de angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el plegamiento incorrecto de proteínas, una enfermedad asociada con la angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias, (p. ej., anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, rinitis persistente) y lesiones tisulares (p. ej., quemaduras o lesiones químicas).

El término "precalicreína" y "calicreína preplasma" se utilizan indistintamente en esta memoria y se refieren a la forma zimógeno de la calicreína plasmática activa, que también se conoce como precalicreína.

5 El término "previendo" o "prevenir" una enfermedad en un sujeto se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, p. ej., la administración de un fármaco, de tal manera que se impide al menos un síntoma de la enfermedad, es decir, se administre antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (p. ej., enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) de modo que proteja al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada. "Prevenir" una enfermedad también puede denominarse "profilaxis" o "tratamiento profiláctico".

10 Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "sustancialmente idéntica" (o "sustancialmente homóloga") se utiliza en esta memoria para referirse a una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico que contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes (p. ej., con un cadena lateral similar, p. ej., sustituciones de aminoácidos conservadas) o nucleótidos a una segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos, de modo que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos tengan (o codifiquen proteínas que tengan) actividades similares, p. ej., una actividad de unión, una preferencia de unión, o una actividad biológica. En el caso de los anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad y tiene al menos el 50%,
15 al menos el 25% o al menos el 10% de la afinidad en relación con el mismo antígeno.

Secuencias similares u homólogas (p. ej., al menos aproximadamente el 85% de identidad de secuencia) a las secuencias descritas en esta memoria también forman parte de esta solicitud. En algunas realizaciones, la identidad de secuencia puede ser aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior.

20 Además, existe una identidad sustancial cuando los segmentos de ácido nucleico se hibridan en condiciones de hibridación selectivas (p. ej., condiciones de hibridación altamente rigurosas), con el complemento de la cadena. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

25 Secuencias de motivos para biopolímeros pueden incluir posiciones que pueden ser aminoácidos variados. Por ejemplo, el símbolo "X" en dicho contexto generalmente se refiere a cualquier aminoácido (p. ej., cualquiera de los veinte aminoácidos naturales) a menos que se especifique lo contrario, p. ej., para referirse a cualquier aminoácido que no sea cisteína. También otros aminoácidos se pueden indicar, por ejemplo, utilizando paréntesis y barras. Por ejemplo, "(A/W/F/N/Q)" significa que alanina, triptófano, fenilalanina, asparagina y glutamina se permiten en esa posición particular.

30 La significancia estadística puede determinarse mediante cualquier método de la técnica conocida. Ensayos estadísticos a modo de ejemplo incluyen: el ensayo T de Students, el ensayo no paramétrico 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 "inducir", "inhibir", "potenciar", "elevar", "aumentar", "disminuir" o similares, p. ej., que designan diferencias cualitativas o cuantitativas distinguibles entre dos estados, pueden referirse a una diferencia, p. ej., una diferencia estadísticamente significativa, entre los dos estados.

35 Tal como se utiliza en esta memoria, una "muestra" se refiere a una composición que comprende tejido, p. ej., sangre, plasma o proteína, de un sujeto. Una muestra incluye tanto una muestra inicial sin procesar tomada de un sujeto como procesada posteriormente, p. ej., formas parcialmente purificadas o conservadas. Muestras a modo de ejemplo incluyen sangre, plasma, lágrimas o moco. En algunas realizaciones, la muestra es sangre o plasma.

40 Una "dosificación terapéuticamente eficaz" modula preferiblemente un parámetro mensurable, p. ej., la actividad de la calicreína plasmática, por un grado estadísticamente significativo o al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente en al menos aproximadamente 40%, incluso más preferiblemente en al menos aproximadamente 60%, y aún más preferiblemente en al menos aproximadamente 80% con relación a sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para modular un parámetro mensurable, p. ej., un parámetro asociado a la enfermedad, puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de eficacia en trastornos y afecciones humanas.
45 Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto de modular un parámetro in vitro.

"Tratar" una enfermedad (o afección) en un sujeto o "tratar" un sujeto que tiene una enfermedad se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, p. ej., la administración de un fármaco, de tal manera que al menos un síntoma de la enfermedad se cura, se alivia o disminuye.

50 El término "prevenir" una enfermedad en un sujeto se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, p. ej., la administración de un fármaco, de tal manera que se impida al menos un síntoma de la enfermedad, es decir, se administre antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (p. ej., enfermedad u otro estado no deseado del animal huésped) de modo que proteja al huésped contra el desarrollo de la afección no deseada. A "prevenir" una enfermedad también se puede aludir como "profilaxis" o "tratamiento profiláctico".

Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

- 5 Los títulos, incluidos los títulos alfabéticos o numéricos, son meramente para facilitar la comprensión y la lectura y, en ausencia de una indicación expresa al contrario, no imponen un orden temporal o una jerarquía de preferencias.

Métodos de Ensayo y Kits para Medir el C1-INH en base a la Inhibición de PKal y/o FXII

- 10 En esta memoria se describen métodos y kits para medir el nivel de C1-INH funcional en función de la capacidad del C1-INH de unirse e inhibir la calicreína activa y/o el FXII activo. Un método de este tipo se puede llevar a cabo poniendo en contacto una muestra que contiene C1-INH con un reactivo de captura tal como se describe en esta memoria, y midiendo el nivel de C1-INH en el mismo que se une al reactivo de captura. En algunas realizaciones, también se mide el nivel de C1-INH total (p. ej., el nivel de proteína C1-INH en una muestra, independientemente de si el C1-INH se une a un reactivo de captura tal como se describe en esta memoria).

- 15 Plasma del inhibidor de C1 de la proteasa (C1-INH) generalmente juega un papel importante en la regulación de diversas vías fisiológicas, incluyendo la activación del complemento (p. ej., la inhibición de proteasas de C1r y C1s en el complejo C1), la coagulación de la sangre, la fibrinólisis y la generación de quininas. C1-INH se une e inhibe el Factor XIIa, el Factor XIIf y la calicreína. C1-INH es un miembro de la superfamilia serpina de proteínas y tiene una estructura de 2 dominios. El dominio serpina C-terminal de C1-INH proporciona la actividad inhibidora de la proteína. Una secuencia de aminoácidos a modo de ejemplo de C1-INH humano se muestra a continuación (Nº de acceso NP_000053.2)

```
>gi|73858568|ref|NP_000053.2|precursor del inhibidor C1 de la proteasa del plasma[Homosapiens]
MASRLTLTLLTLLLLLAGDRASSNPNATSSSSSQDPESLQDRGEGKVATTVISKMLFVEPILEVSSLPPTNSTTNSA
TKITANTTDEPTTQPTTEPTTQPTIQPTQPTTQLPTDSPTQPTTGSFCPGFVTLCSDLESHSTEAVLGDALVDFS
LKLYHAFSAMKKVETNMAFSPFSIASLLTQVLLGAGENTKTNLESILSYPKDFTCVHQALKGFTTKGVTSVSVQIF
HSPDLAIRDTFVNASRTLYSSSPRVLSNNSDANLELINTWVAKNTNKKISRLLDLSLPSDTRVLVLLNAYLSAKWK
TTFDPKKTREPFPHFKNSVIKVPMMNSKKYPVAHFIDQTLKAKVGLQLSHNLSLVILVLPQNLKHRLEDMEQALS
PSVFKAIMKLEMSKFPQTLTLPRIKVTTSQDMLSIMEKLEFFDFSYDLNLCGLTEDPDLQVSAMQHQTVLELT
ETGVEAAAASAI SVARTLLVFEVQQPFLFVLWDQQHKFPVFMGRVYDPR (SEQ ID NO:1)
```

- 25 C1-INH activo o "funcional" se refiere a un polipéptido de C1-INH o fragmento de polipéptido de C1-INH que conserva una actividad biológica y/o inmunológica similar, pero no necesariamente idéntica a C1-INH natural, incluidas las formas maduras. En algunas realizaciones, un C1-INH activo o funcional es un polipéptido de C1-INH o un fragmento de polipéptido de C1-INH que se une a uno o más de Factor XIIa, Factor XIIf o calicreína e inhibe la actividad de FXIIa y/o PKal, regulando así el proceso de formación de la quinina.

- 30 En algunas realizaciones, la muestra que se examinó en el método de ensayo descrito en esta memoria es una muestra biológica, p. ej., una muestra biológica obtenida de un sujeto tal como se describe en esta memoria, p. ej., una muestra de fluido corporal tal como una muestra de sangre o una muestra de plasma. Por ejemplo, una proteína de C1-INH adecuada puede proporcionarse en muestras de tejido biológico (p. ej., sangre, plasma, lágrimas, moco), extractos o preparaciones de tejido o tejidos sólidos adquiridos directamente de organismos multicelulares (p. ej., procedimientos *ex vivo*). Por lo tanto, entre otras cosas, los métodos de acuerdo con la invención se pueden utilizar para monitorear y/o caracterizar el C1-INH endógeno en seres humanos y otros organismos multicelulares para el diagnóstico o la medición de biomarcadores.

35 A. Formato de Ensayo

- 40 Los métodos de ensayo descritos en esta memoria permiten la evaluación (p. ej., medición) del nivel de C1-INH que se une a un reactivo de captura, tal como se describe en esta memoria. El nivel (p. ej., la cantidad) de C1-INH que se une al reactivo de captura se puede medir utilizando ensayos descritos en esta memoria y/o ensayos conocidos en la técnica. Los ensayos que se pueden utilizar para evaluar los niveles de C1-INH que se unen al reactivo de captura incluyen, pero no se limitan a inmunoensayos, tales como transferencias Western, ensayos por inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) (p. ej., ELISA en sándwich), radioinmunoensayos, ensayos de detección basados en electroquimioluminiscencia, y técnicas relacionadas. Métodos para realizar estos ensayos a modo de ejemplo son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente (véase, p. ej., Current Protocols in Molecular Biology, edición actual, Wiley Online Library).

- 45 En algunas realizaciones, el nivel de C1-INH que se une al reactivo de captura se determina utilizando un ELISA. Los ELISA son conocidos en la técnica (véase, p. ej., Crowther, John R (2009). "The ELISA Guidebook" 2ª ed.

Humana Press y Lequin R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". Clin. Chem. 51 (12): 2415-8) y los ELISA a modo de ejemplo descritos en esta memoria. Kits para realizar ELISA también son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente (véase, p. ej., los kits ELISA de Life Technologies y BD Biosciences).

- 5 En algunas realizaciones, los ensayos se llevan a cabo en plataformas de bajo rendimiento, incluido el formato de ensayo único. Por ejemplo, se puede utilizar una plataforma de bajo rendimiento para medir el nivel de actividad de C1-INH en muestras biológicas (p. ej., tejidos biológicos, extractos de tejidos) para el diagnóstico o la medición de biomarcadores.

- 10 En algunas realizaciones, los ensayos pueden llevarse a cabo en plataformas de alto rendimiento. En algunas realizaciones, pueden utilizarse placas de múltiples pocillos, p. ej., placas de 24, 48, 96, 384 o más pocillos, para ensayos de alto rendimiento. Se pueden realizar ensayos individuales en cada uno de los pocillos en paralelo. Por lo tanto, generalmente es deseable utilizar un lector de placas para medir múltiples pocillos en paralelo para aumentar el rendimiento del ensayo. En algunas realizaciones, los lectores de placas que son capaces de obtener imágenes de múltiples pocillos (por ejemplo, 4, 16, 24, 48, 96, 384 o más pocillos) en paralelo pueden utilizarse para esta
- 15 plataforma. Por ejemplo, se puede utilizar un lector de placas comercialmente disponible (p. ej., 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 una óptica de alta eficiencia de recolección y una óptica especial diseñada para el análisis de 96 pocillos en paralelo. Lectores de placas paralelas adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a SAFIRE (Tecan, San Jose, CA), FLIPRTETRA® (Molecular Devices, Union City, CA), FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) y CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA). En algunas
- 20 realizaciones, los ensayos de rastreo de alto rendimiento de la invención son automáticos (p. ej., adaptados a ensayos robóticos).

B. Reactivos de captura

- 25 Los reactivos de captura para uso en los métodos de ensayo descritos en esta memoria son capaces de formar un complejo con C1-INH que es funcional en la inhibición de la cascada de formación de quininas, por ejemplo, inhibiendo PKa1, FXII, o ambos. En algunas realizaciones, el reactivo de captura puede comprender uno o ambos de un resto que comprende una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo; o un resto que comprende una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma. En algunas realizaciones, los reactivos de captura se aíslan y/o purifican de una fuente natural. En algunas realizaciones, los reactivos de captura se producen de forma recombinante o sintética. En algunas realizaciones, un reactivo de
- 30 captura está dispuesto en (p. ej., unido a) un sustrato, por ejemplo, un sustrato insoluble. El reactivo de captura puede estar unido al sustrato de forma covalente o no covalente. El reactivo de captura puede unirse directamente al sustrato, o puede unirse indirectamente, p. ej., a través de un enlazador. Ejemplos de enlazadores incluyen, pero no se limitan a cadenas que contienen carbono, polietilenglicol (PEG), ácidos nucleicos, unidades de monosacáridos,
- 35 biotina-avidina y péptidos. En algunas realizaciones, el sustrato es un recipiente que comprende uno o más pocillos, p. ej., una placa de microtitulación. Fragmentos de unión a C1-INH de una forma activa de Factor XII o calicreína se pueden preparar generando fragmentos del reactivo de captura de longitud completa y determinando si los fragmentos se unen a C1-INH.

- 40 En algunas realizaciones, un reactivo de captura comprende un primer resto de unión específica, p. ej., biotina o avidina, que forma un complejo con un segundo resto de unión específica, p. ej., biotina o avidina, dispuesto en (p. ej., unido a) un sustrato, p. ej., un sustrato insoluble.

En algunas realizaciones, el reactivo de captura puede comprender una calicreína plasmática o un fragmento funcional de la misma, un FXII o un fragmento funcional del mismo, o una combinación de los mismos.

(i) Calicreína Plasmática

- 45 La calicreína plasmática es un componente de la serina proteasa del sistema de contacto (Sainz I.M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007). El sistema de contacto es activado por el factor XIIa tras exposición a superficies extrañas o con carga negativa o en superficies de células endoteliales mediante proilcarboxipeptidasas (Sainz I.M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007). La activación de la calicreína plasmática amplifica la coagulación intrínseca a través de su activación por retroalimentación del factor XII y potencia la inflamación a través de la
- 50 producción de la bradiquinina nonapéptido proinflamatoria. Como la quininogenasa primaria en la circulación, la calicreína plasmática es en gran parte responsable de la generación de bradiquinina en la vasculatura.

Secuencias de calicreína plasmática a modo de ejemplo pueden incluir secuencias de aminoácidos de calicreína humana, de ratón o de rata, una secuencia que es 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a una de estas secuencias, o un fragmento de las mismas, p. ej., de una secuencia proporcionada más adelante. En algunas

realizaciones, la calicreína plasmática es aislada de la naturaleza. En algunas realizaciones, la calicreína plasmática se produce por medios recombinantes o sintéticos.

Una secuencia a modo de ejemplo de la calicreína plasmática humana se muestra a continuación (número de acceso NP_000883.2). La calicreína plasmática humana (86 kDa) se purificó a partir de plasma humano y se activó con factor XIIa. El factor XIIa activa la pre-calicreína al escindir la secuencia del polipéptido en un sitio único (entre Arg371-Ile372, el sitio de escisión marcado por "/" en la secuencia que figura a continuación) para generar calicreína plasmática activa, que luego consiste en dos polipéptidos unidos por disulfuro; una cadena pesada de aproximadamente 52 kDa y un dominio catalítico de aproximadamente 34 kDa [Colman y Schmaier, (1997) "Contact System: A Vascular Biology Modulator With Anticoagulant, Profibrinolytic, Antiadhesive, and Proinflammatory Attributes" Blood, 90, 3819-3843].

```
GCLTQLYENAFFRGGDVASMYTPNAQYCMRCTFHPRCLLFSFLPASSINDMEKRFGCFLKDSVTGTLPKVHRTG
AVSGHSLKQCGHQISACHRDIYKGVDMRGVNFVNSKVSSVEECQKRCTSNIRCQFFSYATQTFHKAEYRNNCLLK
YSPGGTPTAIKVL$NVESGFLKPCALSEIGCHMNIFQHLAFSDVDVARVLTDPDAFVCRITICTYHPNCLFFTFYT
NVWKIESQRNVCLLKTSESGTPSSSTPQENTISGYSLLTCKRTPPEPCHSKIYPGVDFGGEELNVT$FVKGVNVCQ
ETCTKMIRCQFFTY$LLPEDCKEEKCKCFLRLSMDGSPTRIA$YGTQSSSGYSLR$LCNTGDN$VCTTKTSTR/IVG
GTNS$WGEWPWQVSLQVKLTAQRHL$CGGSLIGHQWVLTAAHCFDGLPLQDVWRIYSGILNLS$DITKDTPF$SQIKE
LIHQNYKVSEGNHDIALIKLQAPLNYTEFQKPICLPSKGDSTIY$TNCWVTGWGFSKEKGEIQNILQKVNIPLV
TNEECQKRYQDYKITQRMVCAGYKEGGK$DACKGDSGGPLVCKHNGMWR$LVGIT$SWGEGCARREQPGVYTKVAEYM
DWILEKTQSSDGKAQM$QSPA (SEQ ID NO:2)
```

Las secuencias de aminoácidos de pre-calicreína humana, de ratón y rata, y las secuencias de ARNm que codifican las mismas, se ilustran a continuación. Las secuencias de pre-calicreína son las mismas que la calicreína plasmática, excepto que la calicreína plasmática activa (pKal) tiene la cadena polipeptídica única escindida en una sola posición (indicada por la "/") para generar dos cadenas. Las secuencias proporcionadas a continuación son secuencias completas que incluyen secuencias de señales. Tras la secreción de la célula de expresión, se espera que las secuencias de señales se eliminen.

Calicreína plasmática humana (ACCESO: NP_000883.2)

```
>gi|78191798|ref|NP_000883.2| precursor B1 de calicreína plasmática [Homo sapiens]
MILFKQATYFISL$FATV$CGCLTQLYENAFFRGGDVASMYTPNAQYCMRCTFHPRCLLFSFLPASSIND
MEKRFGCFLKDSVTGTLPKVHRTGAVSGHSLKQCGHQISACHRDIYKGVDMRGVNFVNSKVSSVEECQKR
CTSNIRCQFFSYATQTFHKAEYRNNCLLK$YSPGGTPTAIKVL$NVESGFLKPCALSEIGCHMNIFQHLA
FSDVDVARVLTDPDAFVCRITICTYHPNCLFFTFYTNVWKIESQRNVCLLKTSESGTPSSSTPQENTISGYS
LLTCKRTPPEPCHSKIYPGVDFGGEELNVT$FVKGVNVCQETCTKMIRCQFFTY$LLPEDCKEEKCKCFLR
LSMDGSPTRIA$YGTQSSSGYSLR$LCNTGDN$VCTTKTSTR/IVGGTNS$WGEWPWQVSLQVKLTAQRHL$CG
GSLIGHQWVLTAAHCFDGLPLQDVWRIYSGILNLS$DITKDTPF$SQIKEI$LIHQNYKVSEGNHDIALIKLQ
APLNYTEFQKPICLPSKGDSTIY$TNCWVTGWGFSKEKGEIQNILQKVNIPLV$TNEECQKRYQDYKITQR
MVCAGYKEGGK$DACKGDSGGPLVCKHNGMWR$LVGIT$SWGEGCARREQPGVYTKVAEYMDWILEKTQSSDG
KAQM$QSPA (SEQ ID NO:3)
```

20 Calicreína plasmática de ratón (ACCESO: NP_032481.1)

```
>gi|6680584|ref|NP_032481.1| calicreína B, plasma 1 [Mus musculus]
MILEN$RVGYFVSL$FATV$SCGCMTQLYKN$TFFRGGDLAAIYTPDAQY$CQKMCTFHPRCLLFSFLAVT$PPKE
TNKRF$GCFM$KESITGTL$PRIHRTGAI$SGHSLKQCGHQISACHRDIYKGLDMRGSN$FNISKTDNIEECQKL
CTN$NFHCQFFTYATS$AFYRPEYR$KCKLLKHSASGTP$TSIKSADN$LVSGFSLK$SCALSEIGCPMDIFQ$HSA
FADL$NVSQVITPDAFVCRITICTFHPNCLFFTFYTN$EWETESQRNV$CFLKTSK$SGRPS$PPIPQENAI$SGYS
LLTCR$KTRPEPCHSKIY$SGVDFE$GEEELNVT$FVQ$GADVCQETCTK$TIRCQFFIY$SLLPQDCKE$EGCKC$SLR
L$TDG$SPTRITYGMQ$SSGYSLR$LC$KLV$D$SPDCTTKINAR/IVGGTNASL$GEPWQVSLQVKLVSQ$THLCG
GSIIGRQWVLTAAHCFDGI$PYDPVWRIYGGIL$SLSEITKETP$SRIKELI$HQEYKVSEGN$YDIALIKLQ
TPLNYTEFQKPICLPSKADNTIY$TNCWVTGWGYTKEQ$GETQNILQKATIP$LPVNEECQK$KYRDYVINKQ
MICAGYKEGGT$DACKGDSGGPLVCKH$SGRWQLV$GIT$SWGEGCGRK$DQPGVYTKVSEYMDWILEKTQ$SSDV
RALET$SA (SEQ ID NO:4)
```

Calicreína plasmática de rata (ACCESO: NP_036857.2)

```
>gi|162138905|ref|NP_036857.2| calicreína B, plasma 1 [Rattus norvegicus]
MILFKQVGYFVSLFATVSCGCLSQLYANTFFRGGDLAAIYTPDAQHCQKMCFTFHPRCLLFSFLAVSPTKE
TDKRFGCFMKESIITGLPRIHRTGAI SGHSLKQCGHQLSACHQDIYEGLDMRGSNFNISKTDSEECQKL
CTNNIHCQFFTYATKAFHRPEYRKSCLLKRSSSGTPTSIKPVNDLVSGFSLKSCALSEIGCPMDIFQHFA
FADLVN SHVVTDPDAFVCRIVCTFHPNCLFFTFYTNWETESQRNVCFLKT SKSGRPSPPIIQENAVSGYS
LFTCRKARPEPCHFKEYISGVAFEGEELNATFVQGADACQETCTKTIRCQFFTYSLLPQDCKAEGCKCSLR
LSTDGSPTRITYEAQGS SGYSLRLCKVVESSDCTTKINAR/IVGGTNSSLGEWPQVSLQVKLVSONHMC
GSIIGRQWILTAACHCFDGIYPYDWRRIYGGILNLSEITNKTPFSSIKELI IHQKYMSEGSYDIALIKLQ
TPLNYTEFQKPICLPSKADTNTIYTNCWVIGWGYTKERGETQNILQKATIPLVPNEECQKKYRDYVITKQ
MICAGYKEGGIDACKGDSGGPLVCKHSGRWQLVGITSWGEGCARKEQPGVYTKVAEYIDWILEKIQSSKE
RALETPA (SEQ ID NO:5)
```

5 La calicreína plasmática "activa" o "funcional" se refiere a un polipéptido de la calicreína plasmática o a un fragmento del polipéptido de la calicreína plasmática que conserva una actividad biológica y/o inmunológica similar, no necesariamente idéntica a la calicreína plasmática que se produce de forma natural, incluidas las formas maduras. En algunas realizaciones, una calicreína plasmática activa o funcional es un polipéptido de calicreína plasmática o un fragmento de un polipéptido de calicreína plasmática que se une a C1-INH.

(ii) Factor XII

10 El factor XII es una glicoproteína sérica que participa en el inicio de la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y la generación de bradiquinina y angiotensina. La pre-calicreína es escindida por el Factor XII para formar calicreína, que luego activa el Factor XII, dando como resultado la formación de Factor XIIa y fragmentos de Factor XII (Factor XIIf) ("Histidine-rich glycoprotein binds factor XIIa with high affinity and inhibits contact-initiated coagulation" Macquarrie, et al. Blood 117:4134-4141 2011). Se ha demostrado que el inhibidor de C1 (C1-INH) es un importante inhibidor de plasma tanto del Factor XIIa como del Factor XIIf ("Effect of negatively charged activating compounds on inactivation of factor XIIa by C1 inhibitor" Pixley, et al. Arch Biochem Biophys 256(2):490-8 1987).

15 La secuencia de la proteína precursora y la secuencia de ARNm de Factor XII humano se muestran a continuación (números de acceso NM_000505.3 y NP_000496.2), así como la forma activada de Factor XIIa.

```
>gi|145275213|ref|NP_000496.2| precursor de factor XII de coagulación [Homo sapiens]
MRALLLLGFLLVLESTLSIPPWEAPKEHKYKAEHVTVLTVTGEPCHFPFQYHRQLYHKCTHKGRPGPQPWCATT
NFDQDQRWGYCLEPKVKVDHCSKHSQCQGGTCVNMPSGPHCLCPQHLLTGNHCQKEKCFEPQLLRFHFKNEIW
YRTEQAAVARCQCKGPDACQRLASQACRTNPCLHGGRCLEVEGHRLCHCPVGYTGAFCDVDTKASCYDGRGLS
YRGLARTT LSGAPCQPWASEATYRNVTAEQARNWGLGGHAFRCRNPNDIRPWCFLVNRDRLSWEYCDLAQCQT
PTQAAPPTVPSPRLHVPMPAQAPPKQPTRTPPQSQTGALPAKREQPPSLTR/2NGPLSCGQR/2LRKSLSSM
TR/1VVGGGLVALRGAPHYAALYWGHSFCAGSLIAPCWVLTAAHCLQDRPAPEDLTVVLGQERRNHSCEPCQTLAV
RSYRLHEAFSPVSYQHDLALLRLQEDADGSCALLSPYVQPVCLPSGAARPSETTLCQVAGWGHQFEGAEYASFLQ
EAQVPFLSLERCSAPDVHGSSILPGMLCAGFLEGGTDACQ
GDSGGPLVCEQAERRLTLQGIISWGS GCDRNPVYTDVAYYLAWIREHTVS
(SEQ ID NO:6)
```

¹ La escisión en esta posición (353) conduce a FXIIa de longitud completa

20 ² La escisión en estas posiciones adicionales (334 y 343) conduce a una forma activa de FXII conocida como β-FIIa o FXII_f (fragmento de FXIIa)

25 El Factor XII "activo" o "funcional" se refiere a un polipéptido del Factor XII o un fragmento del polipéptido del Factor XII que conserva una actividad biológica y/o inmunológica similar, pero no necesariamente idéntico al Factor XII que se produce de forma natural, incluidas las formas maduras. En algunas realizaciones, un Factor XII activo o funcional es un polipéptido del Factor XII o un fragmento del polipéptido del Factor XII que se une a C1-INH. En algunas realizaciones, el Factor XII activo o funcional es un polipéptido del Factor XIIa o un fragmento del polipéptido del Factor XIIa que se une a C1-INH. En algunas realizaciones, el Factor XII activo o funcional es un polipéptido del Factor XII_f o un fragmento del polipéptido del Factor XII_f que se une a C1-INH.

C. Agentes de detección

Los métodos descritos en esta memoria permiten la detección de la formación de complejos entre un reactivo de captura, p. ej., un reactivo de captura tal como se describe en esta memoria, y C1-INH. La detección de los complejos se puede lograr mediante cualquier método disponible, p. ej., un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo para C1-INH. En algunas realizaciones, se utiliza un anticuerpo secundario, p. ej., un anticuerpo anti-anti-C1-INH. Uno o más anticuerpos se pueden acoplar a un resto de detección. En algunas realizaciones, un resto de detección es o comprende un fluoróforo. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "fluoróforo" (al que también se alude como "marcador fluorescente" o "colorante fluorescente") se refiere a restos que absorben energía luminosa en una longitud de onda de excitación definida y emiten energía luminosa 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 (p. ej., β -galactosidasa) que produce un producto coloreado a partir de un sustrato incoloro.

Tal como se utiliza en esta memoria, los términos "medir" o "medición" o, alternativamente, "detectar" o "detección" significan evaluar la presencia, ausencia, cantidad o cuantía (que puede ser una cuantía eficaz) de una sustancia dentro de una muestra, incluida la derivación de niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de sustancias de este tipo, o la evaluación de los valores o la categorización de un sujeto.

En algunas realizaciones, se realiza un test añadiendo un agente de captura a un sustrato, p. ej., un recipiente de reacción, p. ej., en condiciones tales que el agente de captura se une al sustrato, p. ej., utilizando un ELISA. Se puede añadir una muestra, p. ej., muestra de tejido de un sujeto, p. ej., sangre, plasma o lágrimas, al sustrato que contiene el agente de captura, p. ej., un recipiente de reacción. Cualquier molécula de unión al agente de captura presente puede unirse a las moléculas de agente de captura inmovilizadas. Se puede añadir un anticuerpo o un conjugado de agente de detección de anticuerpos a la mezcla de reacción. La parte del anticuerpo del conjugado se une a cualquier molécula de antígeno (p. ej., C1-INH) que se unió previamente, creando un "sándwich" anticuerpo-antígeno-anticuerpo. Después de separar por lavado cualquier conjugado no unido, se puede añadir una solución de sustrato para ayudar en la detección. Por ejemplo, después de un intervalo establecido, la reacción se puede detener (p. ej., añadiendo NaOH 1 N) y la concentración del producto coloreado formado se puede medir en un espectrofotómetro. La intensidad del color es proporcional a la concentración de antígeno unido.

(i) Anticuerpos

Los anticuerpos se pueden utilizar en los métodos descritos. En algunas realizaciones, un agente de captura es o comprende un anticuerpo. En algunas realizaciones, un agente de detección es o comprende un anticuerpo. En algunas realizaciones, una composición terapéutica para el tratamiento de un trastorno mediado por pKal o bradiquinina es o comprende un anticuerpo.

En algunas realizaciones, un anticuerpo se une específicamente a un antígeno o epítipo diana, p. ej., C1-INH. Un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno o un epítipo es un término bien entendido en la técnica, y métodos para determinar dicha unión específica también son bien conocidos en la técnica. Se dice que un anticuerpo exhibe "unión específica" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con un antígeno diana particular que con dianas alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno o epítipo diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente (o preferentemente) a un antígeno (p. ej., C1-INH) o un epítipo antigénico en su interior es un anticuerpo que se une a este antígeno diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que lo que se une a otros antígenos u otros epítipos en el mismo antígeno. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno diana puede o no unirse de manera específica o preferente a un segundo antígeno diana. Como tal, la "unión específica" o la "unión preferencial" no necesariamente requiere (aunque puede incluir) una unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferencial. En algunos ejemplos, un anticuerpo que "se une específicamente" a un antígeno diana o un epítipo del mismo puede no unirse a otros antígenos u otros epítipos en el mismo antígeno.

En algunas realizaciones, un anticuerpo descrito en esta memoria tiene una afinidad de unión adecuada por un antígeno diana o un epítipo antigénico (p. ej., C1-INH). Tal como se utiliza en esta memoria, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o K_A . La K_A es la recíproca de la constante de disociación (K_D). El anticuerpo descrito en esta memoria puede tener una afinidad de unión (K_D) de al 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 disminuida. La unión de afinidad mayor de un anticuerpo por un primer antígeno en relación con un segundo antígeno se puede indicar mediante una K_A mayor (o una K_D de valor numérico menor) para unirse al primer antígeno que la K_A (o K_D de valor numérico) para unirse al segundo antígeno. En tales casos, el anticuerpo tiene especificidad para el primer antígeno con relación al segundo antígeno. Las diferencias en la afinidad de unión (p. ej., para especificidad u otras

comparaciones) pueden ser al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10.000 o 105 veces.

La afinidad de unión (o especificidad de unión) se puede determinar mediante una diversidad de métodos tal como se describe en esta memoria.

- 5 Tal como se utiliza en esta memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia del dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en esta memoria como VH), y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en esta memoria como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). El término
- 10 "anticuerpo" abarca los fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (p. ej., anticuerpos de cadena sencilla, 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 sus subtipos). Los anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, pero se prefieren de primates (primates humanos y no humanos) y primatizadas.
- 15 Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas "regiones determinantes de complementariedad" ("CDR", por sus siglas en inglés), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas "regiones marco" ("FR"). La extensión de la región marco y las CDR se han 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, Publicación NIH N° 91-3242, y Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol.
- 20 196:901-917, véase también www.hgmp.mrc.ac.uk). En esta memoria se utilizan las definiciones de Kabat. Cada uno de VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir, además, toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de esta manera una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una

25 realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en donde las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras están interconectadas, p. ej., por enlaces disulfuro. En IgGs, la región constante de la cadena pesada incluye tres dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la 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 típicamente median en la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de tipo kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o la citotoxicidad mediada por el complemento.

35 Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR pueden ser humanas, p. ej., HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 y LC CDR3. Cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. HC CDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones marco pueden ser humanas, p. ej., FR1, FR2, FR3 y FR4 de la HC o LC. Por ejemplo, la región Fc puede ser humana. En una

40 realización, todas las regiones marco son humanas, p. ej., tienen una secuencia de un marco de un anticuerpo producido por una célula somática humana, p. ej., una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de línea germinal, p. ej., codificadas por un ácido nucleico de la línea germinal. En una realización, los residuos del marco (FR) de un Fab seleccionado se pueden convertir en el tipo de aminoácido del residuo correspondiente en el gen de la línea germinal de primate más similar, especialmente el gen de la línea germinal humana. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, al menos 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 puede ser humano o efectivamente humano.

La totalidad o parte de un anticuerpo puede ser codificada por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo.

50 Genes de inmunoglobulina humana a modo de ejemplo incluyen los genes kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu de región constante, así como los muchos genes de la región variable de inmunoglobulina. Las "cadenas ligeras" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 KDa o aproximadamente 214 aminoácidos) son codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen kappa o lambda de la región constante en el extremo COOH. Las

55 "cadenas pesadas" de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 KDa o aproximadamente 446 aminoácidos) son codificadas de manera similar por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados anteriormente, p. ej., gamma (que

codifica aproximadamente 330 aminoácidos). La longitud de la HC humana varía considerablemente porque la HC CDR3 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. 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')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de 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 solo 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 la funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite hacerse como una cadena de proteína única en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv). Véanse, *p. ej.*, las patentes de EE.UU. 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.

Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener utilizando cualquier técnica apropiada, incluyendo las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. La expresión "anticuerpo monoespecífico" se refiere a un anticuerpo que muestra una única especificidad y afinidad de unión para una diana particular, *p. ej.*, un epítipo. Esta expresión incluye un "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpos monoclonales" que, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de composición molecular sencilla, independientemente de cómo se generó el anticuerpo.

Tal como se utiliza en esta memoria, una región variable de inmunoglobulina "humanizada" se refiere a una región variable de inmunoglobulina que se modifica para incluir un número suficiente de posiciones de aminoácidos marco humano de modo que la región variable de la inmunoglobulina no provoca una respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Descripciones de inmunoglobulinas "humanizadas" incluyen, por ejemplo, los documentos US 6.407.213 y US 5.693.762.

La constante de inhibición (K_i) proporciona una medida de la potencia inhibidor; es la concentración de inhibidor requerida para reducir la actividad de la enzima a la mitad y no depende de las concentraciones de enzima o sustrato. La K_i aparente (K_{i,app}) se obtiene a diferentes concentraciones de sustrato al medir el efecto inhibidor de diferentes concentraciones de inhibidor (*p. ej.*, proteína de unión inhibidora) en la extensión de la reacción (*p. ej.*, actividad enzimática); si se ajusta el cambio en la constante de velocidad de pseudo-primer orden en función de la concentración del inhibidor a la ecuación de Morrison (Ecuación 1), proporciona una estimación del valor de K_i aparente. La K_i se obtiene a partir del intercepto y extraído de un análisis de regresión lineal de una gráfica de K_{i,app} frente a la concentración de sustrato.

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

Ecuación 1

en que v = velocidad medida; v_o = velocidad en ausencia de inhibidor; K_{i,app} = constante de inhibición aparente; I = concentración total de inhibidor; y E = concentración total de enzima.

D.. Kits

La presente divulgación también proporciona kits para su uso en la evaluación de C1-INH que es funcional en la inhibición de PKal y/o FXII. Dichos kits pueden comprender: (a) un reactivo de captura tal como se describe en esta memoria, y (b) un reactivo de detección que se une a C1-INH, que también se describe en esta memoria, *p. ej.*, un anticuerpo anti-C1-INH y, opcionalmente, (c) C1- INH. En algunas realizaciones, el reactivo de captura comprende (i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo; (ii) una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma; o (iii) una combinación de (i) y (ii). En algunas realizaciones, el reactivo de captura está inmovilizado sobre un sustrato, tal como una microplaca.

En algunas realizaciones, el kit puede comprender instrucciones para su uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en esta memoria. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de cómo utilizar los componentes contenidos en el kit para medir el nivel de C1-INH funcional en una muestra, que puede ser una muestra biológica recogida de un paciente humano.

Las instrucciones relativas al uso del kit generalmente incluyen información en cuanto a la cantidad de cada uno de los componentes y las condiciones adecuadas para realizar los métodos de ensayo descritos en esta memoria. Los componentes en los kits pueden estar en dosis unitarias, paquetes a granel (p. ej., paquetes de dosis múltiples) o dosis sub-unitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son típicamente instrucciones escritas en una etiqueta o en un prospecto (p. ej., una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables las instrucciones legibles por máquina (p. ej., las instrucciones en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

La etiqueta o el prospecto indica que el kit se utiliza para evaluar el nivel de C1-INH funcional basado en la inhibición de PKal y/o FXII. Se pueden proporcionar instrucciones para poner en práctica cualquiera de los métodos descritos en esta memoria.

Los kits de esta invención están en un envase adecuado. El envase adecuado incluye, pero no se limita a viales, botellas, frascos, envase flexible (p. ej., bolsas de Mylar o de plástico selladas), y similares. También se contemplan los envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (p. ej., un atomizador) o un dispositivo de infusión, tal como una minibomba. Un kit puede tener una lumbreira de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener una lumbreira de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de 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 uno o más prospectos en o asociado con el recipiente. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona artículos de manufactura que comprenden el contenido de los kits arriba descritos.

Aplicación de los Métodos de Ensayo en el Diagnóstico y Pronóstico de Enfermedades

Los métodos de ensayo y kits descritos en esta memoria se pueden aplicar para la evaluación de una enfermedad, p. ej., el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad. La evaluación puede incluir la identificación de un sujeto que está en riesgo o tiene una enfermedad tal como se describe en esta memoria, p. ej., un trastorno mediado por pKal, tal como HAE (p. ej., HAE de tipo I y/o de tipo II). La evaluación también puede incluir el monitoreo del tratamiento de una enfermedad, tal como evaluar la efectividad de un tratamiento para un trastorno mediado por PKal, tal como el HAE (p. ej., HAE de tipo I y/o de tipo II).

A. Diagnóstico

En algunas realizaciones, los métodos de ensayo y los kits se realizan para determinar el nivel de C1-INH en una muestra biológica (p. ej., una muestra de sangre o una muestra de plasma) recogida de un sujeto candidato (p. ej., un paciente humano sospechoso de tener un trastorno mediado por PKal, tal como HAE). El nivel de C1-INH se compara luego con un valor de referencia para determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de padecer el trastorno mediado por PKal. El valor de referencia puede ser un nivel de control de C1-INH capaz de unirse a un reactivo de captura tal como se describe en esta memoria (p. ej., pKal o FXII). En algunas realizaciones, el nivel de control es un nivel de C1-INH en una muestra de control que es capaz de unirse a un reactivo de captura, tal como una muestra (p. ej., muestra de sangre o plasma) obtenida de un sujeto sano o de una población de sujetos sanos, que preferiblemente son de la misma especie que el sujeto candidato. Tal como se utiliza en esta memoria, un sujeto sano es un sujeto que aparentemente está libre de la enfermedad diana (p. ej., un trastorno mediado por PKal, tal como HAE) en el momento en que se mide el nivel de C1-INH o no tiene antecedentes de la enfermedad.

El nivel de control también puede ser un nivel predeterminado. Dicho nivel predeterminado puede representar el nivel de C1-INH funcional (capaz de unirse a un reactivo de captura) en una población de sujetos que no tienen o no están en riesgo de contraer la enfermedad diana. También puede representar el nivel de C1-INH funcional en una población de sujetos que probablemente no se beneficiará del tratamiento con un inhibidor de pKal.

El nivel predeterminado puede adoptar una diversidad de formas. Por ejemplo, puede ser un valor de corte único, tal como una mediana o una media. En algunas realizaciones, un nivel predeterminado de este tipo puede establecerse basándose en grupos comparativos, tal como cuando se sabe que un grupo definido tiene una enfermedad diana y se sabe que otro grupo definido no tiene la enfermedad diana. Alternativamente, el nivel predeterminado puede ser un intervalo, p. ej., un intervalo que representa los niveles de C1-INH funcional en una población de control dentro de un percentil predeterminado.

El nivel de control, tal como se describe en esta memoria, se puede determinar por la tecnología de rutina. En algunos ejemplos, el nivel de control se puede obtener realizando un método convencional (p. ej., el mismo ensayo para obtener el nivel de C1-INH capaz de unirse a un reactivo de captura en una muestra de prueba tal como se describe en esta memoria) en una muestra de control, tal como también se describe en esta memoria. En otros

ejemplos, los niveles de C1-INH se pueden obtener de miembros de una población de control y los resultados se pueden analizar, p. ej., mediante un programa computacional, para obtener el nivel de control (un nivel predeterminado) que representa el nivel de C1-INH en la población control.

5 Al comparar el nivel de C1-INH capaz de unirse a un reactivo de captura en una muestra obtenida de un sujeto candidato con el valor de referencia tal como se describe en esta memoria, se puede determinar si el sujeto candidato tiene o está en riesgo de una enfermedad mediada por PKal (p. ej., HAE). Por ejemplo, si el nivel de C1-INH que se une a un reactivo de captura del sujeto candidato se desvía del valor de referencia (p. ej., se reduce en comparación con el valor de referencia), el sujeto candidato podría identificarse como que tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad, p. ej., HAE.

10 Tal como se utiliza en esta memoria, "un nivel elevado o un nivel por encima de un valor de referencia" significa que el nivel de C1-INH que se une a un reactivo de captura es más alto que un valor de referencia, tal como un umbral predeterminado o un nivel de C1-INH que se une a un reactivo de captura en una muestra de control. Niveles de control se describen en detalle en esta memoria. Un nivel elevado de C1-INH que se une a un reactivo de captura incluye un nivel de C1-INH que es, p. ej., 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%,
15 200%, 300%, 400%, 500% o más superior a un valor de referencia. Un nivel elevado de C1-INH que se une a un reactivo de captura también incluye aumentar un fenómeno desde un estado cero (p. ej., C1-INH indetectable o no detectable que se une a un reactivo de captura en una muestra) a un estado distinto de cero (p. ej., algo de C1-INH o detectable que se une a un reactivo de captura en una muestra).

20 Tal como se utiliza en esta memoria, "un nivel disminuido o un nivel por debajo de un valor de referencia" significa que el nivel de C1-INH que se une a un reactivo de captura es más bajo que un valor de referencia, tal como un umbral predeterminado o un C1-INH que se une a un reactivo de captura en una muestra de control. Los niveles de control se describen en detalle en esta memoria. Un nivel reducido de C1-INH que se une a un reactivo de captura incluye un nivel de C1-INH que es, por ejemplo, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70 %, 80%, 90%, 100%,
25 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más inferior a un valor de referencia. Un nivel reducido de C1-INH que se une a un reactivo de captura también incluye la disminución de un fenómeno desde un estado distinto de cero (p. ej., algo de C1-INH o detectable que se une a un reactivo de captura en una muestra) a un estado cero (p. ej., C1-INH indetectable o no detectable que se une a un reactivo de captura en una muestra).

En algunas realizaciones, el sujeto candidato es un paciente humano que tiene un síntoma de un trastorno mediado por pKal, p. ej., los descritos en esta memoria, tal como HAE. Por ejemplo, el sujeto tiene edema, hinchazón, en
30 donde dicha hinchazón es completa o predominantemente periférica; urticaria; enrojecimiento, dolor e hinchazón en ausencia de evidencia de infección; edema no mediado por histamina, ataques recurrentes de hinchazón o una combinación de estos. En otras realizaciones, el sujeto no tiene síntomas de un trastorno mediado por pKal en el momento en el que se recoge 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 aún otras realizaciones, el sujeto es
35 resistente a una terapia antihistamínica, a una terapia con corticosteroides, o a ambas.

En algunas realizaciones, la enfermedad o afección que implica la actividad de la calicreína plasmática es el angioedema hereditario (HAE). El angioedema hereditario (HAE) también se conoce como "edema de Quincke",
40 deficiencia del inhibidor de la esterasa C1, deficiencia del inhibidor de C1 y edema angioneurótico hereditario (HANE, por sus siglas en inglés). El HAE se caracteriza por episodios recurrentes de hinchazón grave (angioedema), que pueden afectar, p. ej., las extremidades, la cara, los genitales, el tracto gastrointestinal y las vías respiratorias. Síntomas de HAE incluyen, p. ej., hinchazón en los brazos, las piernas, los labios, los ojos, la lengua y/o garganta; la obstrucción de las vías respiratorias que puede implicar la inflamación de la garganta y ronquera repentina; episodios repetitivos de calambres abdominales sin causa obvia; y/o hinchazón de los intestinos, que
45 puede ser grave y provocar calambres abdominales, vómitos, deshidratación, diarrea, dolor y/o choque. Aproximadamente un tercio de los individuos con este HAE desarrollan una erupción sin picazón llamada eritema marginado durante un ataque.

La hinchazón de las vías respiratorias puede ser potencialmente mortal y puede provocar la muerte en algunos pacientes. Las tasas de mortalidad se estiman en 15-33%. El HAE conduce a aproximadamente 15.000-30.000 visitas al departamento de emergencias al año.

50 Trauma o estrés, p. ej., procedimientos dentales, enfermedades (p. ej., enfermedades virales, tales como resfriados y gripe), la menstruación y la cirugía pueden desencadenar un ataque de angioedema. Para prevenir ataques agudos de HAE, los pacientes pueden intentar evitar estímulos específicos que hayan provocado ataques previamente. Sin embargo, en muchos casos, un ataque se produce sin un disparador conocido. Típicamente, los síntomas del HAE aparecen por primera vez en la infancia y empeoran durante la pubertad. Por término medio, las
55 personas no tratadas tienen un ataque cada 1 a 2 semanas, y la mayoría de los episodios duran de 3 a 4 días (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema). La frecuencia y la duración de los ataques varían mucho entre las personas con angioedema hereditario, incluso entre las 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, que el tipo I representa aproximadamente el 85 por ciento de los casos, el tipo II representa aproximadamente el 15 por ciento de los casos y el tipo III es muy raro. El tipo III es la forma más recientemente descrita y originalmente se pensó que solo se presentaba en mujeres, pero se identificaron familias con hombres afectados. En algunas realizaciones, los métodos de ensayo descritos en esta memoria pueden aplicarse para diagnosticar HAE de tipo I o HAE de tipo II. Véanse los Ejemplos que figuran más adelante.

El HAE se hereda en un patrón autosómico dominante, de manera que una persona afectada puede heredar la mutación de un parental afectado. También pueden ocurrir nuevas mutaciones en el gen y, por lo tanto, el HAE también puede ocurrir en personas sin antecedentes del trastorno en su familia. Se estima que el 20-25% de los casos resulta de una nueva mutación espontánea.

Mutaciones en el gen SERPING1 provocan un angioedema hereditario de tipo I y tipo II. El gen SERPING1 proporciona instrucciones para producir la proteína inhibidor de C1, que es importante para controlar la inflamación. El inhibidor de C1 bloquea la actividad de determinadas proteínas que fomentan la inflamación. Las mutaciones que provocan angioedema hereditario tipo I conducen a niveles reducidos de inhibidor de C1 en la sangre. En cambio, las mutaciones que provocan el tipo II resultan en la producción de un inhibidor de C1 que funciona de manera anormal. Sin los niveles adecuados de inhibidor de C1 funcional, se generan cantidades excesivas de bradiquinina. La bradiquinina fomenta la inflamación al aumentar la fuga de líquido a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia los tejidos del cuerpo. La acumulación excesiva de líquidos en los tejidos del cuerpo provoca los episodios de hinchazón observados en individuos con angioedema hereditario tipo I y tipo II.

Mutaciones en el gen F12 están asociadas con algunos casos de angioedema hereditario de tipo III. El gen F12 proporciona instrucciones para hacer el factor de coagulación XII. Además de desempeñar un papel crítico en la coagulación de la sangre (coagulación), el factor XII es también un importante estimulador de la inflamación y está implicado en la producción de bradiquinina. Determinadas mutaciones en el gen F12 dan como resultado la producción de factor XII con actividad incrementada. Como resultado, se genera más bradiquinina y las paredes de los vasos sanguíneos se vuelven más permeables, lo que conduce a episodios de hinchazón. La causa de otros casos de angioedema hereditario tipo III sigue siendo desconocida. Mutaciones en uno o más genes aún no identificados pueden ser responsables del trastorno en estos casos.

El HAE puede presentarse de manera similar a otras formas de angioedema que resultan de alergias u otras afecciones médicas, pero difiere significativamente en la causa y el tratamiento. Cuando el angioedema hereditario se diagnostica erróneamente como una alergia, generalmente se trata con antihistamínicos, esteroides y/o epinefrina, que típicamente son ineficaces en el HAE, aunque la epinefrina puede utilizarse para reacciones potencialmente mortales. Los diagnósticos erróneos también han resultado en una cirugía exploratoria innecesaria para pacientes con inflamación abdominal, y en algunos pacientes con HAE, el dolor abdominal se diagnosticó incorrectamente como psicósomático.

Los síntomas de HAE se pueden evaluar, por ejemplo, utilizando cuestionarios, p. ej., cuestionarios que son completados por los pacientes, médicos o miembros de la familia. Cuestionarios de este tipo son conocidos en la técnica e incluyen, p. ej., escalas analógicas visuales. Véase, p. ej., McMillan, C.V. et al. Patient. 2012;5(2):113-26.

Otras enfermedades o afecciones a modo de ejemplo asociadas con la actividad de la calicreína plasmática incluyen angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, 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 stents, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal inflamatoria, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad de la columna vertebral degenerativa, íleo post-operatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, sepsis, arteria cerebral media aguda (MCA), evento isquémico (accidente cerebrovascular), reestenosis (p. ej., tras angioplastia), nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el plegamiento incorrecto de proteínas, una enfermedad asociada con la angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (p. ej., anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, persistente, rinitis) y lesiones tisulares (p. ej., lesiones por quemaduras o productos químicos).

Un sujeto que se identifica como que padece o está en riesgo de padecer un trastorno mediado por PKal puede ser sometido a un tratamiento tal como los descritos en esta memoria.

B. Evaluar la Efectividad del Tratamiento

Los métodos de ensayo descritos en esta memoria también se pueden aplicar para evaluar la efectividad de un tratamiento para un trastorno mediado por PKal (p. ej., HAE). Por ejemplo, se pueden recoger múltiples muestras biológicas (p. ej., muestras de sangre o plasma) de un sujeto al que se realiza un tratamiento antes y después del tratamiento o durante el curso del tratamiento. Los niveles de C1-INH funcional (capaces de inhibir PKal y/o FXII) se pueden medir mediante cualquiera de los métodos de ensayo descritos en esta memoria. Si el nivel del C1-INH funcional aumenta después del tratamiento o en el transcurso del tratamiento (el nivel del C1-INH funcional en una muestra recogida más tarde en comparación con el de una muestra recogida anteriormente) permanece igual o aumenta, esto indica que el tratamiento es efectivo. En algunos ejemplos, el tratamiento implica un agente terapéutico, tal como un agente de unión a calicreína tal como se describe en esta memoria, un antagonista del receptor B2 de bradiquinina como se describe en esta memoria, o un agente de reemplazo de C1-INH tal como se describe en esta memoria. Ejemplos de los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, DX-2930 o DX88.

Si se identifica al sujeto como que no responde al tratamiento, se administra una dosis y/o frecuencia de dosificación más alta del agente terapéutico al sujeto identificado. En algunas realizaciones, la dosis o frecuencia de dosificación del agente terapéutico se mantiene, disminuye o cesa en un sujeto identificado como sensible al tratamiento o que no necesita tratamiento adicional. Alternativamente, se puede aplicar un tratamiento diferente al sujeto que se encuentra que no responde al primer tratamiento.

Tratamiento

También se describen en esta memoria métodos para tratar a un sujeto que padece o está en riesgo de padecer un trastorno mediado por PKal, tal como HAE. El sujeto puede tener un nivel reducido de C1-INH funcional (capaz de inhibir PKal o FXII) en comparación con un valor de referencia (p. ej., tal como se describe en esta memoria), que puede determinarse por cualquiera de los métodos de ensayo descritos en esta memoria.

Un sujeto en riesgo de o que padece de (p. ej., que tiene) un trastorno mediado por pK₁ o mediado por radiquinina se puede tratar con cualquier agente terapéutico apropiado. En algunas realizaciones, los métodos incluyen la selección de un tratamiento para un sujeto basándose en el resultado del ensayo. Los ensayos divulgados permiten la detección de interacciones entre el C1-INH funcional presente en una muestra y un componente activado de la vía de bradiquinina, p. ej., la calicreína plasmática, el Factor XIIa y el Factor XIIIa, entre otros. Los niveles bajos de tales interacciones son indicativos de niveles bajos de C1-INH funcional en una muestra. En algunas realizaciones, se selecciona un tratamiento, p. ej., con un agente de unión a calicreína, p. ej., con un agente terapéutico de reemplazo de C1-INH, para un sujeto cuya muestra tiene menos del 90%, menos del 85%, menos del 80%, menos más del 75%, menos del 70%, menos del 65%, menos del 60%, menos del 55%, menos del 55%, menos del 50%, menos del 45%, menos del 40%, menos del 35%, menos más del 30%, menos del 25%, menos del 20%, menos del 15%, menos del 10% o menos del 5% de la actividad de unión funcional de C1-INH en comparación con una muestra de control o referencia.

En algunas realizaciones, el método comprende una o ambas de la selección o la administración de un agente terapéutico, p. ej., un agente de unión a calicreína tal como se describe en esta memoria, p. ej., un antagonista del receptor B2 de bradiquinina tal como se describe en esta memoria, p. ej., un agente de reemplazo de C1-INH tal como se describe en esta memoria, para la administración al sujeto en base al resultado del ensayo.

En algunas realizaciones, una proteína o polipéptido de unión a calicreína plasmática se administra a un sujeto. En algunas realizaciones, el agente de unión a calicreína es un inhibidor de la calicreína, p. ej., un péptido, un inhibidor de moléculas pequeñas, un anticuerpo de calicreína o un fragmento del mismo. En algunas realizaciones, se administra un antagonista del receptor B2 de bradiquinina a un sujeto. En algunas realizaciones, se administra un agente terapéutico de reemplazo de C1-INH a un sujeto.

El agente terapéutico, p. ej., el inhibidor de calicreína, p. ej., el antagonista del receptor B2 de bradiquinina, p. ej., el agente de reemplazo de C1-INH, se puede administrar junto con otra terapia como parte de una terapia de combinación para el tratamiento de la enfermedad o afección que implica la actividad de calicreína plasmática y/o bradiquinina. Terapia de combinación, p. ej., con uno o más de un inhibidor de la calicreína, antagonista del receptor B2 de bradiquinina o agente de reemplazo de C1-INH, p. ej., con uno o más de un inhibidor de calicreína, antagonista del receptor B2 de bradiquinina o agente de reemplazo de C1-INH y otra terapia, se puede proporcionar en múltiples configuraciones diferentes. El primer agente puede administrarse antes o después de la administración de la otra terapia. En algunas situaciones, el primer agente y otra terapia (p. ej., un agente terapéutico) se administran simultáneamente o en una proximidad temporal cercana (p. ej., un corto intervalo de tiempo entre las inyecciones, tales como durante la misma sesión de tratamiento). El primer agente y la otra terapia también pueden administrarse a mayores intervalos temporales.

Agentes de unión a calicreína plasmática

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

Un cierto número de inhibidores de proteínas útiles de calicreína, ya sea la calicreína tisular y/o la plasmática, incluyen un dominio Kunitz. Tal como se utiliza en esta memoria, un "dominio Kunitz" es un dominio polipeptídico que tiene al menos 51 aminoácidos y que contiene al menos dos, y preferiblemente tres disulfuros. El dominio se pliega de modo que la primera y la sexta cisteínas, la segunda y la cuarta, y la tercera y quinta cisteínas formen enlaces disulfuro (p. ej., en un dominio Kunitz que tiene 58 aminoácidos las cisteínas pueden estar presentes en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 5, 14, 30, 38, 51 y 55, de acuerdo con el número de secuencias homólogas de BPTI proporcionadas más adelante, y pueden formarse disulfuros entre las cisteínas en las posiciones 5 y 55, 14 y 38, y 30 y 51) o, si están presentes dos disulfuros, pueden formarse entre un subconjunto correspondiente de cisteínas de los mismos. La separación entre cisteínas respectivas puede estar dentro de 7, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 aminoácidos de la siguiente separación entre las posiciones correspondientes a: 5 a 55, 14 a 38 y 30 a 51, de acuerdo con la numeración de la secuencia BPTI proporcionada más adelante. La secuencia BPTI se puede utilizar como referencia para referirse a posiciones específicas en cualquier dominio Kunitz genérico. La comparación de un dominio Kunitz de interés para BPTI se puede realizar identificando el mejor alineamiento de ajuste en el que se maximiza el número de cisteínas alineadas. La comparación de un dominio de Kunitz de interés para BPTI se puede realizar identificando el mejor alineamiento de ajuste en el que se maximiza el número de cisteínas alineadas.

La estructura en 3D (en alta resolución) del dominio Kunitz de BPTI es conocida. Una de las estructuras de rayos X está depositada en el Banco de Datos de Proteínas Brookhaven como "6PTI". Se conoce la estructura en 3D de algunos homólogos de BPTI (Eigenbrot *et al.*, (1990) Protein Engineering, 3(7):591-598; Hynes *et al.*, (1990) Biochemistry, 29:10018-10022). Al menos ochenta y una secuencias del dominio Kunitz son conocidas. Homólogos humanos conocidos incluyen tres dominios Kunitz de LACI también conocidos 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 Kunitz del inhibidor Inter- α -tripsina, APP-I (Kido *et al.*, (1988) J. Biol. Chem., 263 (34): 18104-18107), un dominio Kunitz a partir de colágeno, tres dominios Kunitz de TFPI-2 (Sprecher *et al.*, (1994) PNAS USA, 91:3353-3357), los dominios Kunitz del inhibidor del factor de crecimiento de hepatocitos tipo 1, los dominios Kunitz del inhibidor del factor de crecimiento del hepatocito tipo 2, los dominios Kunitz descritos en la publicación de patente de EE.UU. Nº: 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 Kunitz.

Tabla 1: Dominios Kunitz Naturales a modo de Ejemplo

<p>LACI: (SEQ ID NO. 7)</p>	<pre> 1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedeehitit dtelpplklM 51 HSFCFAKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC 101 KKMCTRDNan riiktllqge kpdfCfleeD pgiCrgyitr yfynnqtkqC 151 erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn gfvqdnlygtq lnavnnsltP 201 qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpkyysgC 251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm La secuencia 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 negritas </pre>
<p>BPTI (SEQ ID NO:8)</p>	<pre> 1 2 3 4 5 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA </pre>

A los dominios Kunitz anteriores se les alude como 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 reseña en Wun *et al.* (J. Biol. Chem., 1988, 263(13):6001-6004). Girard *et al.* (Nature, 1989, 338:518-20) informa sobre estudios de mutación en los que se alteraron los

residuos de P1 de cada uno de los tres dominios Kunitz. LACI-K1 inhibe el Factor VIIa (F.VIIa) cuando F.VIIa se compleja con el factor tisular y LACI-K2 inhibe el Factor Xa.

Proteínas que contienen dominios Kunitz a modo de ejemplo incluyen los siguientes, con los Números de Acceso SWISS-PROT entre paréntesis:

A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),
 A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAIISC (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 (O95925), EPPI_MOUSE (Q9DA01),
 HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
 IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
 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),
 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),
 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 (O43278), SPT1_MOUSE (Q9R097), SPT2_HUMAN (O43291),
 SPT2_MOUSE (Q9WU03), TFP2_HUMAN (P48307), TFP2_MOUSE (O35536),
 TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),
 TFPI_RABIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

5

Se puede utilizar una diversidad de métodos para identificar un dominio Kunitz a partir de una base de datos de secuencias. Por ejemplo, se puede buscar una secuencia de aminoácidos conocida de un dominio Kunitz, una secuencia de consenso o un motivo (p. ej., el Motivo ProSite) en las bases de datos de secuencias GenBank (Centro Nacional de Información Biotecnológica, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda MD), p. ej., utilizando BLAST; frente a la base de datos Pfam de HMM (siglas en inglés de Modelos Ocultos de Markov) (p. ej., utilizando parámetros por defecto para la búsqueda de Pfam; frente a la base de datos SMART; o frente a la base de datos ProDom. Por ejemplo, el Número de Acceso Pfam PF00014 de la Versión 9 de Pfam proporciona numerosos dominios Kunitz y un HMM para identificar los dominios Kunitz. Se puede encontrar una descripción de la base de datos Pfam en Sonhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28(3):405-420 y se puede encontrar una descripción detallada de los HMM, 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 (sigla en inglés de Herramienta de Investigación de Arquitectura Modular Simple, EMBL, Heidelberg, DE) de los HMM, tal como se describe en 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 SMART contiene dominios identificados mediante la creación de perfiles con los modelos 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 monitorizada. La base de datos de dominios de proteínas ProDom consiste en una compilación automática de dominios homólogos (Corpet *et al.* (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). Las versiones actuales de ProDom se crean utilizando búsquedas PSI-BLAST recursivas (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 uno de los dominios. Prosite enumera el dominio Kunitz como un motivo e identifica proteínas que incluyen un dominio Kunitz. Véase, p. ej., Falquet *et al.* *Nucleic Acids Res.* 30:235-238 (2002).

Los dominios Kunitz interactúan con la proteasa diana utilizando, principalmente, aminoácidos en dos regiones de bucle ("bucles de unión"). La primera región de bucle se encuentra entre los residuos correspondientes a los aminoácidos 13-20 de BPTI. La segunda región de bucle está entre aproximadamente los residuos correspondientes

a los aminoácidos 31-39 de BPTI. Un banco a modo de ejemplo de dominios Kunitz varía una o más posiciones de aminoácidos en la primera y/o segunda regiones del bucle. Posiciones particularmente útiles a variar, cuando se rastrean los dominios Kunitz que interactúan con calicreína o cuando se seleccionan las variantes de afinidad mejoradas, incluyen: posiciones 13, 15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 y 39 con respecto a la secuencia de BPTI. Se espera que al menos algunas de estas posiciones estén en contacto cercano con la proteasa diana. También es útil variar otras posiciones, p. ej., posiciones que son adyacentes a las posiciones antes mencionadas en la estructura tridimensional.

La "región de marco" de un dominio Kunitz se define como aquellos residuos que son una parte del dominio Kunitz, pero excluyendo específicamente residuos en la primera y segunda regiones de bucles de unión, es decir, aproximadamente los residuos correspondiente a los aminoácidos 13-20 de BPTI y 31-39 de BPTI. A la inversa, los residuos que no están en el bucle de unión pueden tolerar un intervalo más amplio de sustitución de aminoácidos (p. ej., sustituciones conservativas y/o no conservativas).

En una realización, estos dominios Kunitz son formas variantes de la estructura en bucle incluyendo el dominio Kunitz 1 de una proteína inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína (LACI, por sus siglas en inglés) humana. LACI contiene tres estructuras internas de bucles peptídicos bien definidas que son paradigmas de los dominios Kunitz (Girard, T. et al., 1989. Nature, 338:518-520). Se han rastreado y aislado variantes del dominio Kunitz 1 de LACI descritas en esta memoria, y se unen a la calicreína con afinidad y especificidad mejoradas (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N°s 5.795.865 y 6.057.287). Estos métodos también pueden aplicarse a otros marcos de dominios Kunitz para obtener otros dominios Kunitz que interactúan con la calicreína, p. ej., la calicreína plasmática. Moduladores útiles de la función de la calicreína se unen y/o inhiben típicamente a la calicreína, según se determina utilizando ensayos de unión e inhibición de la calicreína.

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

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

En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína se une e inhibe la calicreína plasmática, p. ej., la calicreína plasmática humana y/o la calicreína murina. Proteínas de unión a la calicreína plasmática a modo de ejemplo se describen en la publicación de EE.UU. N° 20120201756. En algunas realizaciones, la proteína de unión a la calicreína es un anticuerpo (p. ej., un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligeras y/o pesadas de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (a la que se alude también en esta memoria como 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 (a la que se alude también en esta memoria como DX-2930), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas realizaciones, la proteína de unión a la calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítipo que M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (a la que se alude también en esta memoria como 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, X125 -G01 (a la que se alude también en esta memoria como DX-2930), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas realizaciones, la proteína de unión a la calicreína plasmática es DX-2930. Véase también el documento US 20120201756.

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

Región variable de la cadena pesada de DX-2930:

```
EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S H Y I M M W R Q A P G K G L E W V S G I Y S S G G I T V Y A D
S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A Y R R I G V P R R D E F D I W G Q G T M V T V S S
(SEQ ID NO: 9)
```

Región variable de la cadena ligera de DX-2930:

DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRF
SGSGSGTEFTLTISLQLPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEI (SEQ ID NO: 10)

En algunos aspectos, un polipéptido de unión a calicreína (p. ej., polipéptido inhibidor) se une a la forma activa de la calicreína plasmática. Agentes de la calicreína plasmática del polipéptido a modo de ejemplo se describen en la Patente de EE.UU. N° 5.795.865, la Patente de EE.UU. N° 5.994.125, la Patente de EE. UU. N° 6.057.287, la Patente de EE.UU. N° 6.333.402, la Patente de EE. UU. N° 7.628.983 y la Patente de EE.UU. N° 8.283.321, la Patente de EE.UU. N° 8.124.586, la Patente de EE.UU. N° 7.064.107 N° 7.276.480, la Patente de EE.UU. N° 7.851.442, la Patente de EE.UU. N° 8.124.586, la Patente de EE.UU. N° 7.811.991 y la Publicación de EE.UU. N° 20110086801. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a calicreína es DX-88 (un inhibidor de la calicreína que se produce de forma no natural, también conocido como KALBITOR® (ecallantide), SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, el inhibidor de la calicreína comprende o consiste en una secuencia de aproximadamente 58 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de SEQ ID NO: 11 o el polipéptido DX-88 que tiene la secuencia de 60 aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

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:11)

En algunas realizaciones, la proteína de unión a la calicreína plasmática es EPIKAL-2 (SEQ ID NO: 12), que es un inhibidor de la calicreína que se produce de forma no natural que tiene una secuencia de aminoácidos de 58 residuos (residuos 3-60 de SEQ ID NO: 11) y con sustituciones de aminoácidos de Ile a Ser en el residuo 34 y Glu en 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:12)

En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia con una proteína de unión descrita en esta memoria. En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia en las regiones marco de HC y/o LC (p. ej., FR1, 2, 3 y/o 4 de HC y/o LC) a una proteína de unión descrita en esta memoria. En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia en las CDR de HC y/o LC (p. ej., CDR1, 2 y/o 3 de HC y/o LC) para una proteína de unión descrita en esta memoria. En algunas realizaciones, una proteína de unión a calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia en la región constante (p. ej., CH1, CH2, CH3 y/o CL1) a una proteína de unión descrita en esta memoria.

Antagonistas del Receptor B2 de Bradiquinina

En algunas realizaciones, un antagonista del receptor B2 de bradiquinina se administra a un sujeto. Antagonistas del receptor B2 de bradiquinina a modo de ejemplo incluyen Incatibant (Firazyr®), que es un fármaco peptidomimético que contiene 10 aminoácidos que bloquean la unión de bradiquinina nativa al receptor B2 de bradiquinina.

Agentes de reemplazo de C1-INH

En alguna realización, un agente de reemplazo de C1-INH se administra a un sujeto. Agentes de reemplazo de C1-INH a modo de ejemplo están disponibles públicamente e incluyen, por ejemplo, Berinert®, que es un concentrado de C1-INH purificado nanofiltrado y pasteurizado humano.

Terapias con inhibidores de C1, así como otras terapias para el HAE, se describen en Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925.

El tratamiento agudo de ataques de HAE se proporciona para detener la progresión del edema lo más rápidamente posible. El concentrado de inhibidor de C1 de la sangre del donante, que se administra por vía intravenosa, es un tratamiento agudo; sin embargo, este tratamiento no está disponible en muchos países. En situaciones de emergencia en las que no está disponible el concentrado de inhibidor de C1, se puede utilizar plasma fresco congelado (FFP) como alternativa, ya que también contiene inhibidor de C1.

5 Inhibidor de C1 purificado, derivado de la sangre humana, se ha utilizado en Europa desde 1979. Varios tratamientos con inhibidores de C1 están ahora disponibles en los EE.UU. y dos productos de inhibidores de C1 están ahora disponibles en Canadá. Berinert P (CSL Behring), que está pasteurizado, fue aprobado por la FDA en 2009 para ataques agudos. Cinryze (ViroPharma), que está nanofiltrado, fue aprobado por la FDA en 2008 para la profilaxis. Rhucin (Pharming) es un inhibidor de C1 recombinante en desarrollo que no conlleva el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas debido a patógenos transmitidos por la sangre humana.

El tratamiento de un ataque agudo de HAE también puede incluir medicamentos para aliviar el dolor y/o fluidos por vía intravenosa.

10 Otras modalidades de tratamiento pueden estimular la síntesis de inhibidor de C1, o reducir el consumo de inhibidor de C1. Medicaciones con andrógenos, tales como danazol, pueden reducir la frecuencia y la gravedad de los ataques al estimular la producción de inhibidor de C1.

Helicobacter pylori puede desencadenar ataques abdominales. Los antibióticos para tratar *H. pylori* disminuirán los ataques abdominales.

15 Tratamientos más recientes atacan la cascada de contacto. Ecallantide (KALBITOR®, DX-88, Dyax) inhibe la calicreína plasmática y ha sido aprobado en los EE. UU. Icatibant (FIRAZYR®, Shire) inhibe el receptor B2 de bradiquinina y ha sido aprobado en Europa y EE.UU.

20 El diagnóstico de HAE puede depender, p. ej., de antecedentes familiares y/o análisis de sangre. Los hallazgos de laboratorio asociados con HAE tipos I, II y III se describen, p. ej., en Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925. En el HAE de tipo I el nivel de inhibidor de C1 disminuye, al igual que el nivel de C4, mientras que el nivel de C1q es normal. En el HAE de tipo II el nivel de inhibidor de C1 es normal o está aumentado; sin embargo, la función del inhibidor de C1 es anormal. El nivel de C4 disminuye y el nivel de C1q es normal. En el tipo III, los niveles de inhibidor de C1, C4 y C1q pueden ser todos normales.

Terapias con inhibidores de C1, así como otras terapias para HAE, se describen en Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925.

25 Se proporcionan a continuación tratamientos a modo de ejemplo para HAE. Se proporciona el tratamiento agudo de los ataques de HAE para detener la progresión del edema lo más rápidamente posible. Concentrado de inhibidor de C1 de la sangre del donante, que se administra por vía intravenosa, es un tratamiento agudo; sin embargo, este tratamiento no está disponible en muchos países. En situaciones de emergencia, en las que el concentrado de inhibidor de C1 no está disponible, se puede utilizar plasma fresco congelado (FFP) como alternativa, ya que también contiene inhibidor de C1.

35 Inhibidor de C1 purificado, derivado de la sangre humana, se ha utilizado en Europa desde 1979. Varios tratamientos con inhibidores de C1 están ahora disponibles en los EE.UU. y dos productos inhibidores de C1 están ahora disponibles en Canadá. Berinert P (CSL Behring), que está pasteurizado, fue aprobado por la FDA en 2009 para ataques agudos. Cinryze (ViroPharma), que está nanofiltrado, fue aprobado por la FDA en 2008 para la profilaxis. Rhucin (Pharming) es un inhibidor de C1 recombinante en desarrollo que no conlleva el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas debido a patógenos transmitidos por la sangre humana.

El tratamiento de un ataque agudo de HAE también puede incluir medicamentos para el alivio del dolor y/o fluidos por vía intravenosa.

40 Otras modalidades de tratamiento pueden estimular la síntesis de inhibidor de C1, o reducir el consumo de inhibidor de C1. Medicamentos con andrógenos, tales como danazol, pueden reducir la frecuencia y la gravedad de los ataques al estimular la producción de inhibidor de C1.

Helicobacter pylori puede desencadenar ataques abdominales. Antibióticos para tratar *H. pylori* disminuirán los ataques abdominales.

45 Tratamientos más recientes atacan la cascada de contacto. Ecallantide (KALBITOR®, DX-88, Dyax) inhibe la calicreína plasmática y ha sido aprobado en los EE. UU. Icatibant (FIRAZYR®, Shire) inhibe el receptor B2 de bradiquinina y ha sido aprobado en Europa y EE.UU.

50 El diagnóstico de HAE puede depender, p. ej., de antecedentes familiares y/o análisis de sangre. Los hallazgos de laboratorio asociados con HAE tipos I, II y III se describen, p. ej., en Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925. En el HAE de tipo I el nivel de inhibidor de C1 disminuye, al igual que el nivel de C4, mientras que el nivel de C1q es normal. En el HAE de tipo II el nivel de inhibidor de C1 es normal o está aumentado; sin embargo, la

función del inhibidor de C1 es anormal. El nivel de C4 disminuye y el nivel de C1q es normal. En el tipo III, los niveles de inhibidor de C1, C4 y C1q pueden ser todos normales.

Los siguientes ejemplos proporcionan una ilustración adicional y no son limitantes.

EJEMPLOS

5 **Ejemplo 1. ELISA complejo que utiliza factor XII activado y/o calicreína plasmática para la cuantificación de C1-INH funcional en plasma**

Se ha demostrado que una anomalía funcional de inhibidor de C1, C1-INH, está presente en el angioedema hereditario (HAE) de tipo II, que hace que el inhibidor sea ineficaz. El HAE de tipo I tiene niveles de proteína C1-INH totales bajos. El HAE de tipo III está asociado con niveles normales de C1-INH. ("Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: The role of C1 inhibitor therapy." Kaplan, A., The Journal of Allergy and Clinical Immunology 126(5):918-25 2010). El C1-INH inhibe el factor XIIa, un fragmento del factor XII (XIIa), calicreína y plasmina. En ausencia de la función de C1-INH, hay una marcada activación de la cascada formadora de bradiquinina que resulta en un angioedema grave. El HAE tipo I se caracteriza generalmente por niveles disminuidos de C1-INH total. El HAE tipo II se caracteriza generalmente por niveles normales a niveles elevados de C1-INH, sin embargo, la función del C1-INH es anormal. El mecanismo que provoca el HAE de tipo III está menos caracterizado y el HAE de Tipo III se ha descrito predominantemente en pacientes de sexo femenino.

El angioedema hereditario (HAE) se puede diagnosticar utilizando un ensayo, p. ej., ensayo cromogénico o ELISA, para la inhibición del primer componente activado del complemento (p. ej., un ensayo funcional para inhibidor de C1). En algunos casos se utiliza un ensayo basado en la captura de C1s de C1INH. Ensayos diagnósticos de HAE cromogénicos existentes generalmente se consideran preferibles, pero ambos métodos tienen limitaciones. Es más probable que el ensayo cromogénico tenga un falso positivo ocasional, mientras que el ELISA complejo tiene un valor predictivo negativo de solo 62%. Además, una limitación teórica para los métodos de diagnóstico existentes es que la actividad inhibidora de C1-INH en el primer componente activado del complemento tiene poca relación con la etiología de la enfermedad de HAE.

Los autores de la invención han desarrollado metodologías que detectan la función del inhibidor de C1 como un inhibidor en la vía de la formación de bradiquinina, que se relaciona directamente con el papel patógeno del inhibidor de C1 para provocar angioedema. Los ensayos proporcionados permiten el análisis de la capacidad o incapacidad de C1-INH de inhibir factor XII activado y la calicreína plasmática, que provocan una sobreproducción de bradiquinina, que a su vez provoca angioedema. El presente ejemplo describe ensayos para el C1-INH funcional mediante ELISA complejo para examinar la inhibición de cualquiera de factor XII activado, calicreína plasmática o ambos. Estos ensayos tienen una excelente sensibilidad para el diagnóstico de HAE de tipos I y II.

El enfoque de los autores de la invención fue biotilar la enzima activa, unirla a una placa recubierta con avidina, incubar con el plasma (normal para un control, supuestamente plasma de HAE como lo desconocido) y medir el complejo enzima-C1-INH. Emplearon un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina contra C1-INH para la detección de C1-INH unido. Para la cuantificación de C1-INH, se trazó una curva estándar sustituyendo cantidades conocidas de C1-INH, en tampón, en lugar de plasma. Es importante destacar que, si otros tipos de angioedema (p. ej., HAE de tipo III) tuvieran un C1-INH mutante que inhibe C1s, pero no factor XII activado o calicreína, los ensayos proporcionados permitirían la detección de la anomalía, mientras que el diagnóstico se omitiría empleando cualquiera de los ensayos actualmente disponibles. Alrededor del 5% de los pacientes tienen un nivel normal de C4, aunque el C1-INH es anormal. En el tipo II, los ensayos funcionales proporcionados son importantes para el diagnóstico porque los niveles de proteína C1-INH son normales. El o los métodos proporcionados serían particularmente útiles en esta circunstancia. Las Figuras 1 y 2 contrastan los HAE de tipo I y II con dos controles normales que demuestran la facilidad con la que se puede hacer el diagnóstico. El C1-INH funcional nunca se ha medido en pacientes con HAE de tipo III basado en enzimas formadoras de bradiquinina y demostraron que es normal (~40%).

Placas Immulon 2HB se recubrieron con 5 µg/ml de avidina en un tampón de recubrimiento (100 µl) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces utilizando PBS-Tween (200 µl/en cada caso). Posteriormente, se añadieron 200 µl de BSA al 1% en PBS para bloquear los sitios no utilizados. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 h. Las placas se lavaron tres veces utilizando PBS-Tween (200 µl/ en cada caso). Se añadieron a las placas: 25 µl de patrones o muestras, 25 µl de Factor XIII biotilado y/o calicreína biotilada (1 µg/ml) y 50 µl de tampón de unión. Las placas se mezclaron y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces utilizando PBS-Tween (200 µl/en cada caso). Se añadió un anticuerpo policlonal contra C1-INH y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces utilizando PBS-Tween (200 µl/en cada caso). Se añadió anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron tres veces utilizando PBS-Tween (200 µl/en cada caso). Se añadió sustrato para el desarrollo del color y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se leyó la DO a 450 nm y se realizaron cálculos utilizando la curva patrón.

Tal como se muestra en las Figuras 1 y 2, los ensayos ELISA complejos identificaron correctamente a los pacientes con HAE de Tipo I y de Tipo II con C1-INH funcional bajo en comparación con controles normales. Una consideración en el desarrollo del ensayo fue que es beneficioso emplear un ensayo que cuantifique el C1-INH funcional en base a una enzima que es un requisito para la formación de bradiquinina. El ensayo puede emplear una de las formas activadas de Factor XII (Factor XIIa o factor XIIf) o calicreína plasmática. Excepto por el C1-INH, el Factor XIIa no tiene otro inhibidor significativo en el plasma. Además de la inhibición por C1-INH, la calicreína plasmática también es inhibida por alfa 2 macroglobulina. Sin embargo, los ensayos ELISA complejos que detectan la interacción funcional entre C1-INH y Factor XIIa o calicreína funcionaron bien, ya que solo se detecta esa fracción de calicreína (~60%) que es inhibida por C1-INH.

5 Ejemplo 2. Ensayo de diagnóstico para el angioedema hereditario basado en la inhibición de factor XII activado y/o la calicreína plasmática

Métodos

Pacientes y toma de muestras: El diagnóstico de HAE fue confirmado por la presentación clínica, bajo nivel de proteínas C1-INH y/o funcional (utilizando el ensayo comercial). Plasma citrato de 42 pacientes con HAE y 23 controles sanos se separó por centrifugación de sangre recién tomada a 2000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Todas las muestras se dividieron inmediatamente en partes alícuotas y se almacenaron a -80°C. Las muestras se manipularon de manera similar en todos los sitios participantes (Odense, Dinamarca; Budapest, Hungría) y se transportaron durante la noche en hielo seco. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética y la Agencia de Protección de Datos en ambos sitios participantes.

Factor XIIa humano purificado y Calicreína se obtuvieron de Enzyme Research Laboratories (South Bend, IN), el reactivo de biotilación se obtuvo de Thermo Scientific (Rockford, IL) y todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma chemical company (St. Louis, MO).

Biotilación de proteínas: Las proteínas se biotilaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. En síntesis, se disolvió un mg de proteína (calicreína o factor XII) en 0,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Aproximadamente 27 µl de Sulfo-NHS-LC-Biotina 10 mM recién preparada se añadieron a la solución de proteínas y se incubaron en hielo durante dos horas. El exceso de biotina que no ha reaccionado e hidrolizada se separó utilizando una columna de desalinización por centrifugación. El marcaje de las proteínas se confirmó mediante ELISA y la concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de Bradford (8).

ELISA para la determinación cuantitativa de C1-INH en plasma: Placas de Immulon 2HB se revistieron con 5 µg/ml de anticuerpos policlonales contra C1-INH. Después de bloquear con BSA al 1% en PBS, se añadieron muestras y patrones y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. El C1-INH unido se sondó con un anticuerpo monoclonal conjugado con fosfatasa alcalina contra C1-INH, seguido de un desarrollo de color utilizando 5-bromo-4-clorindolilfosfato/nitroblue tetrazolio (BCIP/NBT).

Cuantificación de C1-INH funcional en plasma basada en la inhibición de calicreína y factor XII: Placas Immulon 2HB se recubrieron con 5 µg/ml de avidina en un tampón de recubrimiento (100 µl) durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces utilizando PBS-Tween (200 µl/en cada caso). Posteriormente, se añadieron 200 µl de BSA al 1% en PBS para bloquear los sitios no utilizados. Las placas se incubaron a 37°C durante 1 h y se lavaron tres veces con PBS-Tween (200 µl/en cada caso). Las muestras o patrones se añadieron a las placas junto con la proteína biotilada (25 µl de patrones o muestras, 25 µl de Factor XII biotilado o calicreína biotilada (1 µg/ml) y 50 µl de tampón de unión) y se mezclaron e incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron nuevamente tres veces utilizando PBS-Tween (200 µl/en cada caso) y se añadió un anticuerpo policlonal contra C1-INH y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron de nuevo y se añadió anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido del desarrollo de color utilizando un sustrato de fosfatasa BCIP/NBT. Se leyó la DO a 450 nm y se realizaron cálculos utilizando la curva patrón. El método se resume paso a paso en la Figura 1.

ELISA funcional basado en la inhibición del complemento: El kit ELISA se adquirió de Quidel Corporation para medir la cantidad de C1-INH funcional. Este ensayo se basa en la capacidad del C1-INH del plasma de inhibir C1s activado (ELISA complejo). El ensayo se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Resultados

Diagnóstico de HAE por inhibición de C1s: Se analizaron 23 muestras de controles normales y 42 muestras de pacientes con HAE de tipo I o de tipo II utilizando un ensayo comercial existente (ELISA complejo). De acuerdo con la interpretación del ensayo, "normal" fue de 68-100% de C1-INH mientras que "anormal" fue inferior a 67%. Las instrucciones indicaron que las muestras entre 41% y 67% debían repetirse, ya que se consideran equívocas, pero si el valor de repetición estaba dentro de estas dos cifras, se informó que era anormal. Los patrones se suministraron

como un porcentaje de lo normal, es decir, los patrones fueron 0%, 23%, 44%, 66% y 88% y las incógnitas se leyeron fuera de la curva. Las muestras de control normales variaron entre 80% y 100%, mientras que las muestras de HAE variaron entre 0 y 81%. La media y la desviación estándar para las muestras de HAE fue de $38 \pm 17\%$. El diagnóstico en dos de los pacientes con HAE se habría perdido utilizando este ensayo.

5 **Diagnóstico de HAE por inhibición de caliceína o factor XIIa:** Los resultados empleando la inhibición de caliceína plasmática o la inhibición de factor XIIa expresada como mg/ml de formación de complejos se muestran en las FIGs. 4B y 4C, respectivamente, en donde se compararon controles normales con muestras obtenidas de pacientes con HAE de tipos I y II. La media y la desviación estándar para el factor XIIa-C1-INH en $\mu\text{g/ml}$ fueron: normal, $63,1 + 12,4$; y HAE de tipos I y II, $6,1 + 5,4$. El valor "P" que compara los HAE de tipos I y II con los controles normales fue $< 0,0001$. Los resultados obtenidos al analizar los complejos de caliceína-C1-INH fueron sorprendentemente similares, sin solapamiento entre los grupos de HAE y control.

15 Los resultados en esta memoria demuestran que los ensayos basados en la inhibición de caliceína o factor XIIa identificaron correctamente todos los pacientes con HAE de tipo I y tipo II testados, que mostraron un nivel inferior de C1-INH funcional en comparación con los controles normales (FIGs. 3 y 4). Por lo tanto, los métodos de ensayo descritos en esta memoria son significativamente sensibles en comparación con los métodos convencionales para determinar el nivel de C1-INH funcional e identificar a los pacientes que tienen una enfermedad mediada por PKal (p. ej., HAE) basada en el nivel de C1-INH que es funcional para inhibir PKal y/o FXII.

20 El enfoque utilizado en esta memoria fue biotinar la enzima activa, unirla a una placa recubierta con avidina, incubar con el plasma (normal para un control, supuestamente plasma de HAE como la incógnita) y medir el complejo enzima-C1-INH. Anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina para C1-INH se utilizó para la detección de C1-INH unido. Para la cuantificación de C1-INH, se trazó una curva patrón sustituyendo cantidades conocidas de C1-INH en tampón, en lugar de plasma. Además, si otros tipos de angioedema (HAE de tipo III, por ejemplo) tuvieran un C1-INH mutante que inhibe C1s, pero no factor XII activado o caliceína, esta anomalía podría detectarse utilizando este método, mientras que el diagnóstico no se detectaría empleando ninguno de los métodos actualmente disponibles.

25 Los ensayos descritos en esta memoria tienen la posibilidad de suplantarse los métodos comerciales actuales para el diagnóstico de HAE de tipos I y II, ya que ambos ensayos parecen ser más sensibles para la detección de C1-INH disfuncional que la inhibición de C1s y también podrían utilizarse para evaluar pacientes en los que se obtiene un resultado equívoco empleando otra metodología. Aproximadamente el 5% de los pacientes tienen un nivel normal de C4 cuando son asintomáticos, a pesar de que el C1-INH es anormal, y el diagnóstico de pacientes con HAE de tipo II dependería de un ensayo funcional, ya que el nivel de proteínas es típicamente normal o incluso elevado. Los ensayos descritos en esta memoria serían particularmente útiles en esta circunstancia. En conclusión, el diagnóstico de HAE de tipos I y II se puede determinar mediante la inhibición de enzimas de la cascada formadora de bradiquinina, de modo que el diagnóstico se realice mediante una evaluación funcional directamente relacionada con la anomalía que conduce a un angioedema.

35 Referencias:

1. Frank MM, Gelfand JA, Atkinson JP. Hereditary angioedema: the clinical syndrome and its management. *Ann Intern Med*, 1976; 84: 580-593.
2. Zuraw, B. Clinical practice. Hereditary angioedema. *New Eng J Med*, 2008; 359: 1027-1036.
3. Wagenaar-Bos IGA et al. Functional C1-inhibitor diagnostics in hereditary angioedema: assay evaluation and recommendations. *J Immunol Methods*, 2008; 338: 14-20.
4. Kaplan AP, Joseph K. The bradykinin-forming cascade and its role in hereditary angioedema. *Ann Allergy, Asthma & Immunol*, 2010; 104: 193-204.
5. Gigli, I., Mason, J. W., Colman, R. W. y Austen, K. F. (1970). Interaction of plasma kallikrein with the C1 inhibitor. *Journal of Immunology*, 104(3), 574-581.
- 45 6. Kaplan AP, Joseph K. Kinin formation in C1 inhibitor deficiency. *J Allergy Clin Immunol*, 2010; 125: 1411-1412.
7. Ziccardi, R. J. (1982). Spontaneous activation of the first component of human complement (C1) by an intramolecular autocatalytic mechanism. *Journal of Immunology*, 128(6), 2500-2504.
8. Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analyt. Biochem.* 1976; 72:248-254.
- 50 9. Tarzi MD, Hickey A, Forster T, Mohammadi M, Longhurst HJ. An evaluation of tests used for the diagnosis and monitoring of C1 inhibitor deficiency: normal serum C4 does not exclude hereditary angio-oedema. *Clin Exp Immunol.* 2007;149:513-516.

Otras realizaciones

55 Todas las características descritas en esta memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada una de las características descritas en esta memoria descriptiva puede ser reemplazada por una característica alternativa que tenga el mismo propósito, equivalente o similar. Por lo tanto, a menos que se indique expresamente

ES 2 718 347 T3

lo contrario, cada una de las características descritas es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

Listado de secuencias

<110> DYAX CORP. Joseph, Kusumam Kaplan, Allen P

5 <120> ENSAYOS DE EVALUACIÓN Y TRATAMIENTO DE TRASTORNOS MEDIADOS POR PKAL

<130> D0617.70058WO00

<140> TBD
< 141> 17-01-2014

10 <150>US 61/754,600
< 151> 20-01-2013

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
< 211> 500
< 212> PRT
< 213> Homo sapiens

<400> 1
Met Ala Ser Arg Leu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Arg Ala Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln
20 25 30

Asp Pro Glu Ser Leu Gln Asp Arg Gly Glu Gly Lys Val Ala Thr Thr
35 40 45

Val Ile Ser Lys Met Leu Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser
50 55 60

Leu Pro Thr Thr Asn Ser Thr Thr Asn Ser Ala Thr Lys Ile Thr Ala
65 70 75 80

Asn Thr Thr Asp Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr
85 90 95

Gln Pro Thr Ile Gln Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp
100 105 110

Ser Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr
115 120 125

Leu Cys Ser Asp Leu Glu Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp
130 135 140

ES 2 718 347 T3

Ala Leu Val Asp Phe Ser Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met
 145 150 155 160

Lys Lys Val Glu Thr Asn Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser
 165 170 175

Leu Leu Thr Gln Val Leu Leu Gly Ala Gly Glu Asn Thr Lys Thr Asn
 180 185 190

Leu Glu Ser Ile Leu Ser Tyr Pro Lys Asp Phe Thr Cys Val His Gln
 195 200 205

Ala Leu Lys Gly Phe Thr Thr Lys Gly Val Thr Ser Val Ser Gln Ile
 210 215 220

Phe His Ser Pro Asp Leu Ala Ile Arg Asp Thr Phe Val Asn Ala Ser
 225 230 235 240

Arg Thr Leu Tyr Ser Ser Ser Pro Arg Val Leu Ser Asn Asn Ser Asp
 245 250 255

Ala Asn Leu Glu Leu Ile Asn Thr Trp Val Ala Lys Asn Thr Asn Asn
 260 265 270

Lys Ile Ser Arg Leu Leu Asp Ser Leu Pro Ser Asp Thr Arg Leu Val
 275 280 285

Leu Leu Asn Ala Ile Tyr Leu Ser Ala Lys Trp Lys Thr Thr Phe Asp
 290 295 300

Pro Lys Lys Thr Arg Met Glu Pro Phe His Phe Lys Asn Ser Val Ile
 305 310 315 320

Lys Val Pro Met Met Asn Ser Lys Lys Tyr Pro Val Ala His Phe Ile
 325 330 335

Asp Gln Thr Leu Lys Ala Lys Val Gly Gln Leu Gln Leu Ser His Asn
 340 345 350

Leu Ser Leu Val Ile Leu Val Pro Gln Asn Leu Lys His Arg Leu Glu
 355 360 365

Asp Met Glu Gln Ala Leu Ser Pro Ser Val Phe Lys Ala Ile Met Glu
 370 375 380

Lys Leu Glu Met Ser Lys Phe Gln Pro Thr Leu Leu Thr Leu Pro Arg
 385 390 395 400

ES 2 718 347 T3

Ile Lys Val Thr Thr Ser Gln Asp Met Leu Ser Ile Met Glu Lys Leu
 405 410 415

Glu Phe Phe Asp Phe Ser Tyr Asp Leu Asn Leu Cys Gly Leu Thr Glu
 420 425 430

Asp Pro Asp Leu Gln Val Ser Ala Met Gln His Gln Thr Val Leu Glu
 435 440 445

Leu Thr Glu Thr Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Ser Ala Ile Ser Val
 450 455 460

Ala Arg Thr Leu Leu Val Phe Glu Val Gln Gln Pro Phe Leu Phe Val
 465 470 475 480

Leu Trp Asp Gln Gln His Lys Phe Pro Val Phe Met Gly Arg Val Tyr
 485 490 495

Asp Pro Arg Ala
 500

<210> 2
 <211> 619
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Gly Cys Leu Thr Gln Leu Tyr Glu Asn Ala Phe Phe Arg Gly Gly Asp
 1 5 10 15

Val Ala Ser Met Tyr Thr Pro Asn Ala Gln Tyr Cys Gln Met Arg Cys
 20 25 30

Thr Phe His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Pro Ala Ser Ser
 35 40 45

Ile Asn Asp Met Glu Lys Arg Phe Gly Cys Phe Leu Lys Asp Ser Val
 50 55 60

Thr Gly Thr Leu Pro Lys Val His Arg Thr Gly Ala Val Ser Gly His
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Gln Cys Gly His Gln Ile Ser Ala Cys His Arg Asp Ile
 85 90 95

Tyr Lys Gly Val Asp Met Arg Gly Val Asn Phe Asn Val Ser Lys Val
 100 105 110

ES 2 718 347 T3

Ser Ser Val Glu Glu Cys Gln Lys Arg Cys Thr Ser Asn Ile Arg Cys
115 120 125

Gln Phe Phe Ser Tyr Ala Thr Gln Thr Phe His Lys Ala Glu Tyr Arg
130 135 140

Asn Asn Cys Leu Leu Lys Tyr Ser Pro Gly Gly Thr Pro Thr Ala Ile
145 150 155 160

Lys Val Leu Ser Asn Val Glu Ser Gly Phe Ser Leu Lys Pro Cys Ala
165 170 175

Leu Ser Glu Ile Gly Cys His Met Asn Ile Phe Gln His Leu Ala Phe
180 185 190

Ser Asp Val Asp Val Ala Arg Val Leu Thr Pro Asp Ala Phe Val Cys
195 200 205

Arg Thr Ile Cys Thr Tyr His Pro Asn Cys Leu Phe Phe Thr Phe Tyr
210 215 220

Thr Asn Val Trp Lys Ile Glu Ser Gln Arg Asn Val Cys Leu Leu Lys
225 230 235 240

Thr Ser Glu Ser Gly Thr Pro Ser Ser Ser Thr Pro Gln Glu Asn Thr
245 250 255

Ile Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Thr Cys Lys Arg Thr Leu Pro Glu Pro
260 265 270

Cys His Ser Lys Ile Tyr Pro Gly Val Asp Phe Gly Gly Glu Glu Leu
275 280 285

Asn Val Thr Phe Val Lys Gly Val Asn Val Cys Gln Glu Thr Cys Thr
290 295 300

Lys Met Ile Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Ser Leu Leu Pro Glu Asp
305 310 315 320

Cys Lys Glu Glu Lys Cys Lys Cys Phe Leu Arg Leu Ser Met Asp Gly
325 330 335

Ser Pro Thr Arg Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Gly Ser Ser Gly Tyr Ser
340 345 350

Leu Arg Leu Cys Asn Thr Gly Asp Asn Ser Val Cys Thr Thr Lys Thr
355 360 365

ES 2 718 347 T3

Ser Thr Arg Ile Val Gly Gly Thr Asn Ser Ser Trp Gly Glu Trp Pro
 370 375 380

Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Lys Leu Thr Ala Gln Arg His Leu Cys
 385 390 395 400

Gly Gly Ser Leu Ile Gly His Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys
 405 410 415

Phe Asp Gly Leu Pro Leu Gln Asp Val Trp Arg Ile Tyr Ser Gly Ile
 420 425 430

Leu Asn Leu Ser Asp Ile Thr Lys Asp Thr Pro Phe Ser Gln Ile Lys
 435 440 445

Glu Ile Ile Ile His Gln Asn Tyr Lys Val Ser Glu Gly Asn His Asp
 450 455 460

Ile Ala Leu Ile Lys Leu Gln Ala Pro Leu Asn Tyr Thr Glu Phe Gln
 465 470 475 480

Lys Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Thr Ser Thr Ile Tyr Thr
 485 490 495

Asn Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Phe Ser Lys Glu Lys Gly Glu Ile
 500 505 510

Gln Asn Ile Leu Gln Lys Val Asn Ile Pro Leu Val Thr Asn Glu Glu
 515 520 525

Cys Gln Lys Arg Tyr Gln Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Arg Met Val Cys
 530 535 540

Ala Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly
 545 550 555 560

Gly Pro Leu Val Cys Lys His Asn Gly Met Trp Arg Leu Val Gly Ile
 565 570 575

Thr Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Arg Glu Gln Pro Gly Val Tyr
 580 585 590

Thr Lys Val Ala Glu Tyr Met Asp Trp Ile Leu Glu Lys Thr Gln Ser
 595 600 605

Ser Asp Gly Lys Ala Gln Met Gln Ser Pro Ala
 610 615

<210> 3
 <211> 638
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 718 347 T3

<400> 3

Met Ile Leu Phe Lys Gln Ala Thr Tyr Phe Ile Ser Leu Phe Ala Thr
 1 5 10 15

Val Ser Cys Gly Cys Leu Thr Gln Leu Tyr Glu Asn Ala Phe Phe Arg
 20 25 30

Gly Gly Asp Val Ala Ser Met Tyr Thr Pro Asn Ala Gln Tyr Cys Gln
 35 40 45

Met Arg Cys Thr Phe His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Pro
 50 55 60

Ala Ser Ser Ile Asn Asp Met Glu Lys Arg Phe Gly Cys Phe Leu Lys
 65 70 75 80

Asp Ser Val Thr Gly Thr Leu Pro Lys Val His Arg Thr Gly Ala Val
 85 90 95

Ser Gly His Ser Leu Lys Gln Cys Gly His Gln Ile Ser Ala Cys His
 100 105 110

Arg Asp Ile Tyr Lys Gly Val Asp Met Arg Gly Val Asn Phe Asn Val
 115 120 125

Ser Lys Val Ser Ser Val Glu Glu Cys Gln Lys Arg Cys Thr Ser Asn
 130 135 140

Ile Arg Cys Gln Phe Phe Ser Tyr Ala Thr Gln Thr Phe His Lys Ala
 145 150 155 160

Glu Tyr Arg Asn Asn Cys Leu Leu Lys Tyr Ser Pro Gly Gly Thr Pro
 165 170 175

Thr Ala Ile Lys Val Leu Ser Asn Val Glu Ser Gly Phe Ser Leu Lys
 180 185 190

Pro Cys Ala Leu Ser Glu Ile Gly Cys His Met Asn Ile Phe Gln His
 195 200 205

Leu Ala Phe Ser Asp Val Asp Val Ala Arg Val Leu Thr Pro Asp Ala

ES 2 718 347 T3

Gln Ile Lys Glu Ile Ile Ile His Gln Asn Tyr Lys Val Ser Glu Gly
465 470 475 480

Asn His Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Gln Ala Pro Leu Asn Tyr Thr
485 490 495

Glu Phe Gln Lys Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Thr Ser Thr
500 505 510

Ile Tyr Thr Asn Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Phe Ser Lys Glu Lys
515 520 525

Gly Glu Ile Gln Asn Ile Leu Gln Lys Val Asn Ile Pro Leu Val Thr
530 535 540

Asn Glu Glu Cys Gln Lys Arg Tyr Gln Asp Tyr Lys Ile Thr Gln Arg
545 550 555 560

Met Val Cys Ala Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly
565 570 575

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys His Asn Gly Met Trp Arg Leu
580 585 590

Val Gly Ile Thr Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Arg Glu Gln Pro
595 600 605

Gly Val Tyr Thr Lys Val Ala Glu Tyr Met Asp Trp Ile Leu Glu Lys
610 615 620

Thr Gln Ser Ser Asp Gly Lys Ala Gln Met Gln Ser Pro Ala
625 630 635

<210> 4
< 211> 638
< 212> PRT
< 213> Mus musculus

5

<400> 4
Met Ile Leu Phe Asn Arg Val Gly Tyr Phe Val Ser Leu Phe Ala Thr
1 5 10 15

Val Ser Cys Gly Cys Met Thr Gln Leu Tyr Lys Asn Thr Phe Phe Arg
20 25 30

Gly Gly Asp Leu Ala Ala Ile Tyr Thr Pro Asp Ala Gln Tyr Cys Gln
35 40 45

ES 2 718 347 T3

Lys Met Cys Thr Phe His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Ala
 50 55 60
 Val Thr Pro Pro Lys Glu Thr Asn Lys Arg Phe Gly Cys Phe Met Lys
 65 70 75 80
 Glu Ser Ile Thr Gly Thr Leu Pro Arg Ile His Arg Thr Gly Ala Ile
 85 90 95
 Ser Gly His Ser Leu Lys Gln Cys Gly His Gln Ile Ser Ala Cys His
 100 105 110
 Arg Asp Ile Tyr Lys Gly Leu Asp Met Arg Gly Ser Asn Phe Asn Ile
 115 120 125
 Ser Lys Thr Asp Asn Ile Glu Glu Cys Gln Lys Leu Cys Thr Asn Asn
 130 135 140
 Phe His Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Ser Ala Phe Tyr Arg Pro
 145 150 155 160
 Glu Tyr Arg Lys Lys Cys Leu Leu Lys His Ser Ala Ser Gly Thr Pro
 165 170 175
 Thr Ser Ile Lys Ser Ala Asp Asn Leu Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys
 180 185 190
 Ser Cys Ala Leu Ser Glu Ile Gly Cys Pro Met Asp Ile Phe Gln His
 195 200 205
 Ser Ala Phe Ala Asp Leu Asn Val Ser Gln Val Ile Thr Pro Asp Ala
 210 215 220
 Phe Val Cys Arg Thr Ile Cys Thr Phe His Pro Asn Cys Leu Phe Phe
 225 230 235 240
 Thr Phe Tyr Thr Asn Glu Trp Glu Thr Glu Ser Gln Arg Asn Val Cys
 245 250 255
 Phe Leu Lys Thr Ser Lys Ser Gly Arg Pro Ser Pro Pro Ile Pro Gln
 260 265 270
 Glu Asn Ala Ile Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Thr Cys Arg Lys Thr Arg
 275 280 285
 Pro Glu Pro Cys His Ser Lys Ile Tyr Ser Gly Val Asp Phe Glu Gly
 290 295 300

ES 2 718 347 T3

Glu Glu Leu Asn Val Thr Phe Val Gln Gly Ala Asp Val Cys Gln Glu
 305 310 315 320
 Thr Cys Thr Lys Thr Ile Arg Cys Gln Phe Phe Ile Tyr Ser Leu Leu
 325 330 335
 Pro Gln Asp Cys Lys Glu Glu Gly Cys Lys Cys Ser Leu Arg Leu Ser
 340 345 350
 Thr Asp Gly Ser Pro Thr Arg Ile Thr Tyr Gly Met Gln Gly Ser Ser
 355 360 365
 Gly Tyr Ser Leu Arg Leu Cys Lys Leu Val Asp Ser Pro Asp Cys Thr
 370 375 380
 Thr Lys Ile Asn Ala Arg Ile Val Gly Gly Thr Asn Ala Ser Leu Gly
 385 390 395 400
 Glu Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Gln Val Lys Leu Val Ser Gln Thr
 405 410 415
 His Leu Cys Gly Gly Ser Ile Ile Gly Arg Gln Trp Val Leu Thr Ala
 420 425 430
 Ala His Cys Phe Asp Gly Ile Pro Tyr Pro Asp Val Trp Arg Ile Tyr
 435 440 445
 Gly Gly Ile Leu Ser Leu Ser Glu Ile Thr Lys Glu Thr Pro Ser Ser
 450 455 460
 Arg Ile Lys Glu Leu Ile Ile His Gln Glu Tyr Lys Val Ser Glu Gly
 465 470 475 480
 Asn Tyr Asp Ile Ala Leu Ile Lys Leu Gln Thr Pro Leu Asn Tyr Thr
 485 490 495
 Glu Phe Gln Lys Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Ala Asp Thr Asn Thr
 500 505 510
 Ile Tyr Thr Asn Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Thr Lys Glu Gln
 515 520 525
 Gly Glu Thr Gln Asn Ile Leu Gln Lys Ala Thr Ile Pro Leu Val Pro
 530 535 540
 Asn Glu Glu Cys Gln Lys Lys Tyr Arg Asp Tyr Val Ile Asn Lys Gln
 545 550 555 560

ES 2 718 347 T3

Met Ile Cys Ala Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Thr Asp Ala Cys Lys Gly
565 570 575

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Lys His Ser Gly Arg Trp Gln Leu
580 585 590

Val Gly Ile Thr Ser Trp Gly Glu Gly Cys Gly Arg Lys Asp Gln Pro
595 600 605

Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Glu Tyr Met Asp Trp Ile Leu Glu Lys
610 615 620

Thr Gln Ser Ser Asp Val Arg Ala Leu Glu Thr Ser Ser Ala
625 630 635

<210> 5
<211> 638
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

5

<400> 5
Met Ile Leu Phe Lys Gln Val Gly Tyr Phe Val Ser Leu Phe Ala Thr
1 5 10 15

Val Ser Cys Gly Cys Leu Ser Gln Leu Tyr Ala Asn Thr Phe Phe Arg
20 25 30

Gly Gly Asp Leu Ala Ala Ile Tyr Thr Pro Asp Ala Gln His Cys Gln
35 40 45

Lys Met Cys Thr Phe His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Ser Phe Leu Ala
50 55 60

Val Ser Pro Thr Lys Glu Thr Asp Lys Arg Phe Gly Cys Phe Met Lys
65 70 75 80

Glu Ser Ile Thr Gly Thr Leu Pro Arg Ile His Arg Thr Gly Ala Ile
85 90 95

Ser Gly His Ser Leu Lys Gln Cys Gly His Gln Leu Ser Ala Cys His
100 105 110

Gln Asp Ile Tyr Glu Gly Leu Asp Met Arg Gly Ser Asn Phe Asn Ile
115 120 125

Ser Lys Thr Asp Ser Ile Glu Glu Cys Gln Lys Leu Cys Thr Asn Asn
130 135 140

ES 2 718 347 T3

Ile His Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Lys Ala Phe His Arg Pro
 145 150 155 160

Glu Tyr Arg Lys Ser Cys Leu Leu Lys Arg Ser Ser Ser Gly Thr Pro
 165 170 175

Thr Ser Ile Lys Pro Val Asp Asn Leu Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys
 180 185 190

Ser Cys Ala Leu Ser Glu Ile Gly Cys Pro Met Asp Ile Phe Gln His
 195 200 205

Phe Ala Phe Ala Asp Leu Asn Val Ser His Val Val Thr Pro Asp Ala
 210 215 220

Phe Val Cys Arg Thr Val Cys Thr Phe His Pro Asn Cys Leu Phe Phe
 225 230 235 240

Thr Phe Tyr Thr Asn Glu Trp Glu Thr Glu Ser Gln Arg Asn Val Cys
 245 250 255

Phe Leu Lys Thr Ser Lys Ser Gly Arg Pro Ser Pro Pro Ile Ile Gln
 260 265 270

Glu Asn Ala Val Ser Gly Tyr Ser Leu Phe Thr Cys Arg Lys Ala Arg
 275 280 285

Pro Glu Pro Cys His Phe Lys Ile Tyr Ser Gly Val Ala Phe Glu Gly
 290 295 300

Glu Glu Leu Asn Ala Thr Phe Val Gln Gly Ala Asp Ala Cys Gln Glu
 305 310 315 320

Thr Cys Thr Lys Thr Ile Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Ser Leu Leu
 325 330 335

Pro Gln Asp Cys Lys Ala Glu Gly Cys Lys Cys Ser Leu Arg Leu Ser
 340 345 350

Thr Asp Gly Ser Pro Thr Arg Ile Thr Tyr Glu Ala Gln Gly Ser Ser
 355 360 365

Gly Tyr Ser Leu Arg Leu Cys Lys Val Val Glu Ser Ser Asp Cys Thr
 370 375 380

Thr Lys Ile Asn Ala Arg Ile Val Gly Gly Thr Asn Ser Ser Leu Gly

ES 2 718 347 T3

<400> 6

Met Arg Ala Leu Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Val Ser Leu Glu Ser
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Pro Pro Trp Glu Ala Pro Lys Glu His Lys Tyr Lys
 20 25 30

Ala Glu Glu His Thr Val Val Leu Thr Val Thr Gly Glu Pro Cys His
 35 40 45

Phe Pro Phe Gln Tyr His Arg Gln Leu Tyr His Lys Cys Thr His Lys
 50 55 60

Gly Arg Pro Gly Pro Gln Pro Trp Cys Ala Thr Thr Pro Asn Phe Asp
 65 70 75 80

Gln Asp Gln Arg Trp Gly Tyr Cys Leu Glu Pro Lys Lys Val Lys Asp
 85 90 95

His Cys Ser Lys His Ser Pro Cys Gln Lys Gly Gly Thr Cys Val Asn
 100 105 110

Met Pro Ser Gly Pro His Cys Leu Cys Pro Gln His Leu Thr Gly Asn
 115 120 125

His Cys Gln Lys Glu Lys Cys Phe Glu Pro Gln Leu Leu Arg Phe Phe
 130 135 140

His Lys Asn Glu Ile Trp Tyr Arg Thr Glu Gln Ala Ala Val Ala Arg
 145 150 155 160

Cys Gln Cys Lys Gly Pro Asp Ala His Cys Gln Arg Leu Ala Ser Gln
 165 170 175

Ala Cys Arg Thr Asn Pro Cys Leu His Gly Gly Arg Cys Leu Glu Val
 180 185 190

Glu Gly His Arg Leu Cys His Cys Pro Val Gly Tyr Thr Gly Ala Phe
 195 200 205

Cys Asp Val Asp Thr Lys Ala Ser Cys Tyr Asp Gly Arg Gly Leu Ser
 210 215 220

ES 2 718 347 T3

Tyr Arg Gly Leu Ala Arg Thr Thr Leu Ser Gly Ala Pro Cys Gln Pro
 225 230 235 240
 Trp Ala Ser Glu Ala Thr Tyr Arg Asn Val Thr Ala Glu Gln Ala Arg
 245 250 255
 Asn Trp Gly Leu Gly Gly His Ala Phe Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp
 260 265 270
 Ile Arg Pro Trp Cys Phe Val Leu Asn Arg Asp Arg Leu Ser Trp Glu
 275 280 285
 Tyr Cys Asp Leu Ala Gln Cys Gln Thr Pro Thr Gln Ala Ala Pro Pro
 290 295 300
 Thr Pro Val Ser Pro Arg Leu His Val Pro Leu Met Pro Ala Gln Pro
 305 310 315 320
 Ala Pro Pro Lys Pro Gln Pro Thr Thr Arg Thr Pro Pro Gln Ser Gln
 325 330 335
 Thr Pro Gly Ala Leu Pro Ala Lys Arg Glu Gln Pro Pro Ser Leu Thr
 340 345 350
 Arg Asn Gly Pro Leu Ser Cys Gly Gln Arg Leu Arg Lys Ser Leu Ser
 355 360 365
 Ser Met Thr Arg Val Val Gly Gly Leu Val Ala Leu Arg Gly Ala His
 370 375 380
 Pro Tyr Ile Ala Ala Leu Tyr Trp Gly His Ser Phe Cys Ala Gly Ser
 385 390 395 400
 Leu Ile Ala Pro Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Gln Asp
 405 410 415
 Arg Pro Ala Pro Glu Asp Leu Thr Val Val Leu Gly Gln Glu Arg Arg
 420 425 430
 Asn His Ser Cys Glu Pro Cys Gln Thr Leu Ala Val Arg Ser Tyr Arg
 435 440 445
 Leu His Glu Ala Phe Ser Pro Val Ser Tyr Gln His Asp Leu Ala Leu
 450 455 460
 Leu Arg Leu Gln Glu Asp Ala Asp Gly Ser Cys Ala Leu Leu Ser Pro
 465 470 475 480

ES 2 718 347 T3

Tyr Val Gln Pro Val Cys Leu Pro Ser Gly Ala Ala Arg Pro Ser Glu
 485 490 495

Thr Thr Leu Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly His Gln Phe Glu Gly Ala
 500 505 510

Glu Glu Tyr Ala Ser Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Pro Phe Leu Ser
 515 520 525

Leu Glu Arg Cys Ser Ala Pro Asp Val His Gly Ser Ser Ile Leu Pro
 530 535 540

Gly Met Leu Cys Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Thr Asp Ala Cys Gln
 545 550 555 560

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Asp Gln Ala Ala Glu Arg
 565 570 575

Arg Leu Thr Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Ser Gly Cys Gly Asp
 580 585 590

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Asp Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Trp
 595 600 605

Ile Arg Glu His Thr Val Ser
 610 615

<210> 7
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 7
 Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu
 20 25 30

Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
 35 40 45

Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
 50 55 60

ES 2 718 347 T3

Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
65 70 75 80

Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser
85 90 95

Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
100 105 110

Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
115 120 125

Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
130 135 140

Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly
145 150 155 160

Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
165 170 175

Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
180 185 190

Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
195 200 205

Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly
210 215 220

Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly
225 230 235 240

Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn
245 250 255

Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile
260 265 270

Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys
275 280 285

Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met
290 295 300

<210> 8
<211> 58
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido sintético

ES 2 718 347 T3

<400> 8
 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

5

<210> 9
 < 211> 122
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial

<220>
 < 223> Polipéptido sintético

<400> 9
 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

10

Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 < 211> 105
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial

15

<220>
 < 223> Polipéptido sintético

ES 2 718 347 T3

<400> 10

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> 11

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 11

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

<210> 12

<211> 58

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

10

15

ES 2 718 347 T3

<400> 12

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 método, que comprende:
poner en contacto una muestra que contiene inhibidor de C1 de la proteasa del plasma (C1-INH) con un reactivo de captura, que está inmovilizado sobre un sustrato, y
5 medir en la muestra un nivel de C1-INH funcional que se une al reactivo de captura; en donde el reactivo de captura comprende:
- i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo,
 - ii) una forma activa de calicreína plasmática, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma, o
 - iii) una combinación de i) y ii).
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que el nivel de C1-INH funcional que se une al agente de captura se mide utilizando un agente de detección que se une a C1-INH, que opcionalmente es un anticuerpo que se une a C1-INH.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el nivel de C1-INH funcional que se une al agente de captura se mide mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).
- 15 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra que contiene C1-INH funcional se obtiene de un sujeto, en el que opcionalmente la muestra es una muestra de sangre o una muestra de plasma, y en el que opcionalmente el sujeto tiene un síntoma de un trastorno mediado por pKal, el síntoma se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: edema, ataques recurrentes de hinchazón; hinchazón, en donde dicha hinchazón es completa o predominantemente periférica; urticaria; enrojecimiento, dolor e hinchazón en ausencia de evidencia de infección; y edema no mediado por histamina; u, opcionalmente, en el que opcionalmente el sujeto no
20 tiene síntomas de un trastorno mediado por pKal en el momento en que se recoge la muestra, no tiene antecedentes de un síntoma de un trastorno mediado por pKal, o no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal.
5. El método de la reivindicación 4, en el que el método comprende, además,
identificar al sujeto que está en riesgo de padecer o padece un trastorno mediado por pKal si el nivel de C1-INH funcional que se une al reactivo de captura en la muestra se reduce en comparación con un valor de referencia,
25 en el que el trastorno mediado por pKal se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, 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 stents, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica y enfermedad cardíaca coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal inflamatoria, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad de la columna vertebral degenerativa, íleo post-operatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario (HAE), embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, sepsis, arteria cerebral media aguda (MCA), evento isquémico (accidente cerebrovascular), reestenosis,
30 nefritis por lupus eritematoso sistémico, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el plegamiento incorrecto de proteínas, una enfermedad asociada con la angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias y lesiones tisulares.
- 35 6. El método de la reivindicación 5, en el que el sujeto es resistente a una terapia antihistamínica, a una terapia con corticosteroides, o a ambas.
7. Un kit para detectar inhibidor de C1 de la proteasa del plasma (C1-INH) funcional capaz de unirse a un reactivo de captura, que comprende:
- a) un reactivo de captura inmovilizado sobre un sustrato, comprendiendo el reactivo de captura:
 - i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo;
 - 45 ii) una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma; o
 - iii) una combinación de i) y ii);
 - b) un reactivo de detección que se une a C1-INH; y opcionalmente
 - c) C1-INH.
8. El kit de la reivindicación 7, en donde el reactivo de detección es un anticuerpo anti-C1-INH.
- 50 9. Un método para evaluar un tratamiento de un trastorno mediado por pKal en un sujeto, que comprende:
medir el nivel de inhibidor de C1 de la proteasa del plasma (C1-INH) funcional que es capaz de inhibir la calicreína plasmática, Factor XII, o ambos en muestras recogidas del sujeto antes y después del tratamiento o durante el curso del tratamiento, siendo preferiblemente la muestra una muestra de sangre o una muestra de plasma; en el que los niveles de C1-INH funcional se miden por el método de una cualquiera de las reivindicaciones
55 1-3; y

evaluar la efectividad del tratamiento en base al nivel de C1-INH funcional, en donde un aumento del nivel de C1-INH funcional después del tratamiento o en el transcurso del tratamiento indica que el tratamiento es efectivo en el sujeto;

en donde preferiblemente el sujeto es un paciente humano con HAE.

- 5 10. El método de la reivindicación 9, en el que el tratamiento implica un agente de unión a calicreína, un antagonista del receptor B2 de bradiquinina o un agente de reemplazo de C1-INH, preferiblemente el tratamiento implica DX-88, DX-2930 o EPIKAL-2.
- 10 11. El método de cualquiera de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el nivel de C1-INH funcional se mide mediante un proceso que comprende:
poner en contacto las muestras recogidas del sujeto con un reactivo de captura, que está inmovilizado sobre un sustrato; y
medir un nivel de C1-INH funcional en la muestra que se une al reactivo de captura;
en el que el reactivo de captura comprende:
15 i) una forma activa de Factor XII, o un fragmento de unión a C1-INH del mismo;
ii) una forma activa de calicreína, o un fragmento de unión a C1-INH de la misma; o
iii) una combinación de i) y ii);
12. El método de la reivindicación 11, en el que los niveles de C1-INH funcional se miden utilizando un agente de detección que se une a C1-INH, que opcionalmente es un anticuerpo que se une a C1-INH.
- 20 13. El método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en el que el nivel de C1-INH funcional se mide mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

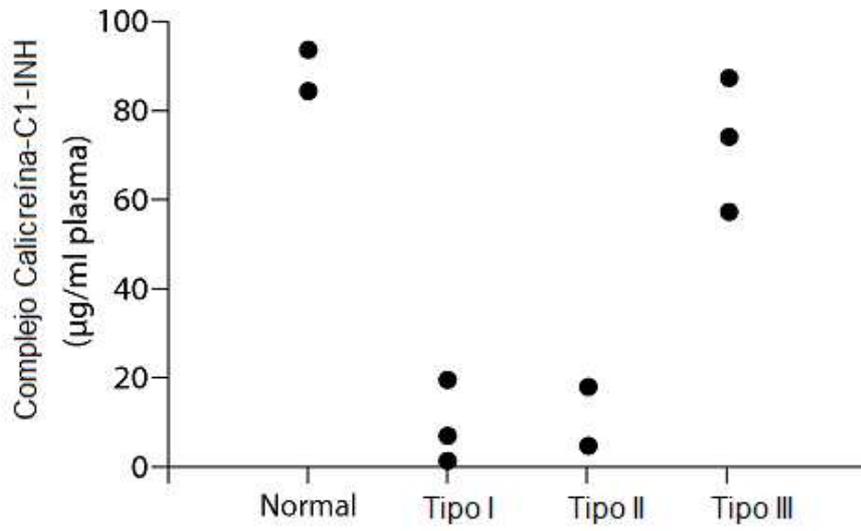


Fig. 1

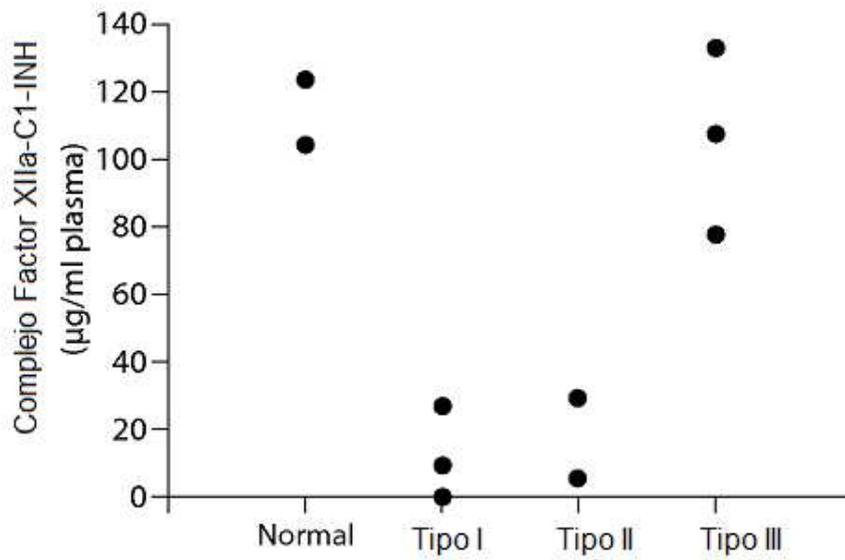


Fig. 2

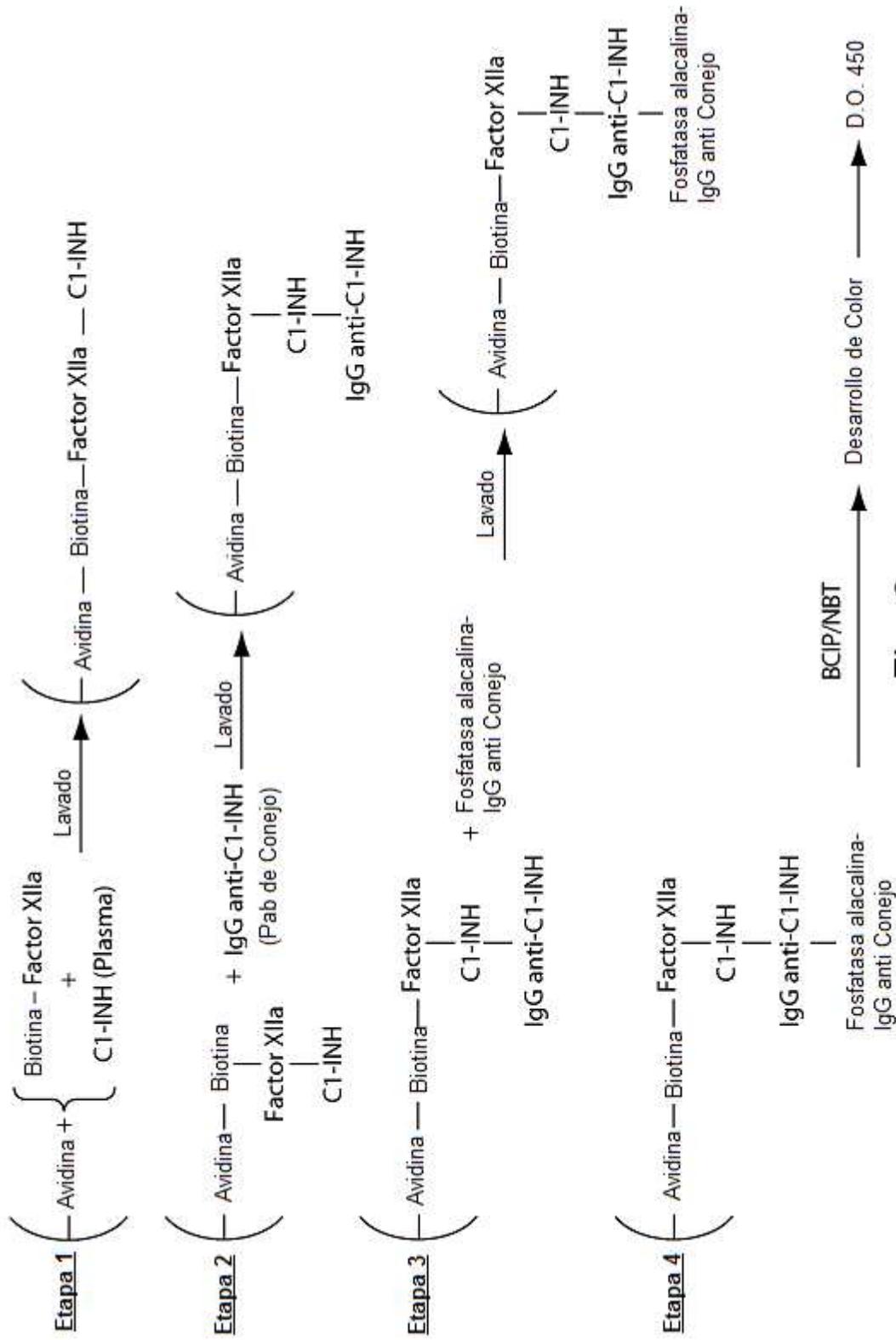


Fig. 3

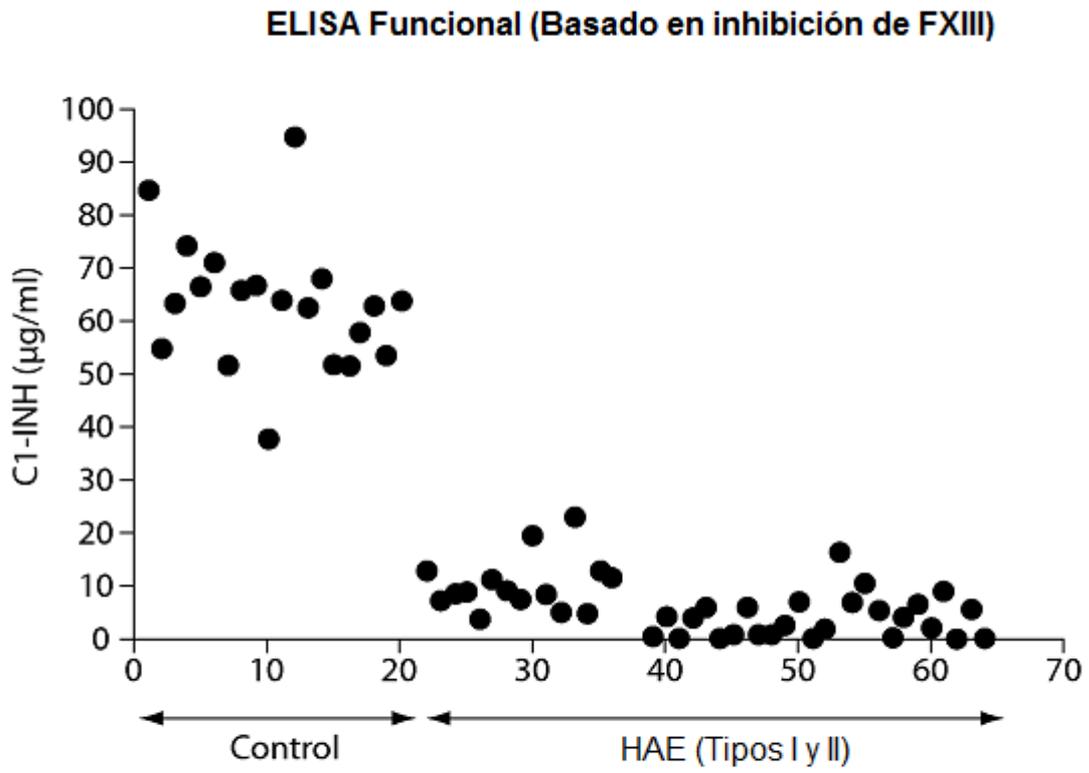


Fig. 4C