

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2948479

DAL TITOLO:

“VALUTAZIONE E TRATTAMENTO DI DISTURBI MEDIATI DA BRADICHININA”

\*\*\* \*\*

Descrizione

### **RIFERIMENTO INCROCIATO A DOMANDE CORRELATE**

#### **STATO DELL'ARTE**

La callicreina plasmatica (pKal) è l'enzima generante bradichinina principale nella circolazione. L'attivazione di pKal avviene mediante il sistema di contatto che è stato collegato alla patologia della malattia associata all'angioedema ereditario (HAE). La bradichinina è un mediatore chiave di dolore, infiammazione, edema e angiogenesi.

I chininogeni sono precursori della chinina, come bradichinina e callicreina. Esistono due tipi di chininogeni umani, il chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK) e il chininogeno a basso peso molecolare (LMWK), che sono varianti di splicing. HMWK funge principalmente da cofattore della coagulazione e infiammazione ed è il substrato preferito per la generazione mediata da pKal di bradichinina. Sia HMWK sia LMWK sono inibitori della cisteina proteasi.

Phipps et al. (Hypertension. 2009 Feb;53(2):175-81) indica che la callicreina plasmatica media la permeabilità vascolare retinica recettore-mediata dell'angiotensina II di tipo 1. Zhang et al. (FASEB J. 2000 Dec;14(15):2589-600) spiega che la porzione di catena pesante di

HMWK scisso è anch'essa presente in LMWK.

### **SOMMARIO DELL'INVENZIONE**

L'invenzione fornisce un metodo per identificare un soggetto a rischio di o avente un disturbo mediato dalla callicreina plasmatica (pKal), il metodo comprendendo:

misurare un livello di un chininogeno ad alto peso molecolare scisso (HMWK) e facoltativamente un livello di un HMWK intatto in un campione di un soggetto;

determinare un valore di HMWK scisso; e

identificare il soggetto a rischio di o avente un disturbo mediato da pKal se il valore di HMWK scisso è superiore a un valore di riferimento,

in cui il valore di riferimento si riferisce al valore di HMWK scisso in un soggetto sano;

e in cui il disturbo mediato da pKal è angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn.

L'invenzione fornisce anche un metodo per valutare un trattamento di un disturbo mediato da pKal in un soggetto, il metodo comprendendo:

misurare i livelli di un HMWK scisso e facoltativamente i livelli di un HMWK intatto in campioni raccolti dal soggetto prima e dopo il trattamento o durante il corso del trattamento;

determinare il valore di HMWK scisso in ciascun campione basato sui livelli di HMWK scisso e facoltativamente intatto nello stesso

campione; e

valutare l'efficacia del trattamento basato sui cambiamenti nei valori di HMWK scisso nei campioni prima e dopo il trattamento o durante il corso del trattamento,

in cui il disturbo mediato da pKal è angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn.

L'invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento di una malattia mediata da pKal di un soggetto, in cui la composizione comprende un inibitore di pKal e un trasportatore farmaceuticamente accettabile in cui il soggetto ha un valore di chininogeno ad alto peso molecolare scisso (HMWK) che è superiore a un valore di riferimento, che si riferisce al valore di HMWK scisso in un soggetto sano; e in cui la malattia mediata da pKal è angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn.

La callicreina plasmatica (pKal) è un componente della proteasi serina del sistema di contatto ed è l'enzima generante bradichinina principale nella circolazione. Il sistema di contatto è attivato dal fattore XIIa durante l'esposizione a superfici estranee o caricate negativamente o su superfici di cellule endoteliali mediante poliacarbossipeptidasi (Sainz I.M. et al., *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). L'attivazione della callicreina plasmatica amplifica la coagulazione intrinseca mediante la sua attivazione di feedback del fattore XII e potenzia l'infiammazione mediante la produzione della bradichinina nonapeptide proinfiammatoria. Come chininogenasi

primaria nella circolazione, pKal è ampiamente responsabile della generazione di bradichinina nel sistema vascolare. Una deficienza genetica nella proteina inibitrice di C1 (C1-INH), il principale inibitore naturale della callicreina plasmatica, causa angioedema ereditario (HAE). I pazienti con HAE soffrono di attacchi acuti di edema doloroso spesso esacerbato da eventi scatenanti ignoti (Zuraw B.L. et al., N Engl J Med 359, 1027-1036, 2008). Grazie all'uso di agenti farmacologici o studi genetici su modelli animali, il sistema callicreina-chinina plasmatico (KKS plasmatico) è stato implicato in svariate malattie.

Come qui descritto, un saggio Western blot è stato sviluppato per il rilevamento di chininogeno intatto (catena singola) e scisso (catena doppia) ad alto peso molecolare (HMWK) usando un reagente di rilevamento (per esempio, un anticorpo) che lega specificamente (per esempio, preferenzialmente) il chininogeno intatto o il chininogeno scisso e, facoltativamente, non lega LMWK. Un tale reagente di rilevamento può essere usato per monitorare quantità relative di 1 a catena singola e a catena doppia nel plasma dei pazienti. Applicando questo metodo, è stato scoperto che il livello (per esempio, la percentuale) di chininogeno scisso in un campione del paziente è elevato negli stati patologici che sono noti per modificare in eccesso l'attivazione di pKal, come attacchi di HAE edematoso. Il chininogeno scisso percentuale nel plasma di pazienti con altre malattie può essere successivamente testato per determinare se pKal attivo è associato con la malattia. Altre malattie che sono state testate e mostrano di avere

aumenti di chininogeno scisso, rispetto al plasma sano, includono artrite reumatoide (RA), colite ulcerosa (UC) e malattia di Crohn.

Di conseguenza, un aspetto della presente descrizione si riferisce a un metodo per identificare un soggetto a rischio di o avente un disturbo mediato da pKal, il metodo comprendendo: (a) misurare il livello di un chininogeno scisso (per esempio, HMWK) e un livello di un chininogeno intatto (per esempio, HMWK) in un campione di un soggetto (per esempio, un campione di sangue o un campione plasmatico) mediante, per esempio, un saggio Western blot; (b) determinare un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno scisso, un valore di chininogeno intatto (per esempio, percentuale) o entrambi, nel campione; e (c) identificare il soggetto come a rischio di o avente un disturbo mediato da pKal se il valore del chininogeno scisso, il valore del chininogeno intatto o entrambi devia da un valore di riferimento. In alcuni esempi, la percentuale di chininogeno scisso è determinata e il soggetto è identificato come a rischio di o avente la malattia bersaglio se la percentuale di chininogeno scisso nel campione è pari a o superiore al valore di riferimento.

In alcune forme di realizzazione, i livelli di chininogeno scisso e chininogeno intatto sono misurati mediante un agente di rilevamento (per esempio, un anticorpo) che lega specificamente (per esempio, preferenzialmente) il chininogeno scisso o intatto. Un tale agente di rilevamento (per esempio, un anticorpo) può legare il chininogeno scisso e intatto, ma non lega LMWK. In altre forme di realizzazione, i

livelli di chininogeno scisso e chininogeno intatto sono misurati mediante un agente di rilevamento (per esempio, un anticorpo) che lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto o lega specificamente il chininogeno intatto rispetto al chininogeno scisso. In un esempio, il reagente di rilevamento è un anticorpo che lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto. In un altro esempio, l'agente di rilevamento è un anticorpo che lega il C-terminale della catena leggera del chininogeno scisso, che non è presente in LMWK.

Il disturbo mediato da pKal può essere angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn. Se il soggetto è identificato per essere a rischio di o avere un disturbo mediato da pKal, il metodo come qui descritto può inoltre comprendere la somministrazione di una quantità efficace di un inibitore di pKal al soggetto. In alcuni esempi, l'inibitore di pKal è DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

In alcune forme di realizzazione, il campione deriva da un soggetto avente un sintomo di un disturbo mediato da pKal, incluso, ma non limitato a, edema, attacchi ricorrenti di tumefazione, tumefazione in cui detta tumefazione è completamente o principalmente periferica, orticaria, rossore, dolore e tumefazione in assenza di evidenza di infezione; o edema non mediato da istamina. In altre forme di realizzazione, il campione deriva da un soggetto privo di sintomi di disturbo mediato da pKal al momento del prelievo del campione, senza

anamnesi di sintomi di un disturbo mediato da pKal o senza anamnesi di un disturbo mediato da pKal. In alternativo o in aggiunta, il soggetto è resistente a una terapia antistaminica, terapia con corticosteroidi o entrambi.

In un altro aspetto, la presente descrizione fornisce un metodo per determinare se un disturbo è suscettibile a un trattamento con un inibitore di pKal, il metodo comprendendo: (a) misurare un livello di un chininogeno scisso (per esempio, HMWK) e un livello di un chininogeno intatto (per esempio, HMWK) in un campione di un soggetto (per esempio, un campione di sangue o un campione plasmatico) avente il disturbo; (b) determinare un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno scisso, un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno intatto (per esempio, percentuale) o entrambi, nel campione; e (c) identificare il disturbo per essere suscettibile di trattamento con inibitore di pKal se il valore del chininogeno scisso, il valore del chininogeno intatto o entrambi devia da un valore di riferimento. In un esempio, la percentuale di chininogeno scisso è determinata e la malattia è identificata per essere suscettibile al trattamento se la percentuale di chininogeno scisso è pari a o superiore al valore di riferimento.

In alcune forme di realizzazione, i livelli di chininogeno scisso e chininogeno intatto sono misurati mediante un agente di rilevamento (per esempio, un anticorpo) che lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto o lega specificamente il

chininogeno intatto rispetto al chininogeno scisso. In alcuni esempi, il reagente di rilevamento è un anticorpo che lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto. In altri esempi, il reagente di rilevamento è un anticorpo che lega il C-terminale della catena leggera del chininogeno scisso. In qualsiasi dei metodi qui descritti, i livelli di chininogeno intatto e chininogeno scisso possono essere misurati mediante saggio Western blot.

Se il disturbo è identificato come suscettibile al trattamento con un inibitore pKal, il metodo può comprendere anche la somministrazione al soggetto di una quantità efficace di un inibitore pKal, che include, ma non è limitato a, DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

In ancora un altro aspetto, la presente descrizione fornisce un metodo per valutare un trattamento di un disturbo mediato da pKal in un soggetto, il metodo comprendendo: (a) misurare i livelli di un chininogeno scisso (per esempio, HMWK) e i livelli di un chininogeno intatto (per esempio, HMWK) in campioni (per esempio, campioni di sangue o campioni di plasma) raccolti dal soggetto prima e dopo il trattamento o durante il corso del trattamento; (b) determinare un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno scisso, un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno intatto o entrambi, in ciascun campione in base ai livelli di chininogeno scisso e intatto nello stesso campione; e (c) valutare l'efficacia del trattamento sulla base dei cambiamenti nel valore del chininogeno scisso e/o intatto prima e dopo il trattamento o durante il corso del trattamento. Per esempio, una

riduzione della percentuale di chininogeno scisso dopo il trattamento o durante il corso del trattamento indica che il trattamento è efficace sul soggetto. In alcune forme di realizzazione, il trattamento comprende somministrare al soggetto una quantità efficace di un inibitore pKal, per esempio DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

In qualsiasi dei metodi di valutazione qui descritti, i livelli di chininogeno scisso e chininogeno intatto possono essere misurati mediante un agente di rilevamento (per esempio, un anticorpo) che lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto o lega specificamente il chininogeno intatto rispetto al chininogeno scisso. In alcuni esempi, il reagente di rilevamento è un anticorpo che lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto. In altri esempi, l'agente di rilevamento è un anticorpo che lega il C-terminale della catena leggera del chininogeno scisso. In qualsiasi dei metodi qui descritti, i livelli di chininogeno intatto e chininogeno scisso possono essere misurati mediante saggio Western blot.

In alcune forme di realizzazione, il disturbo mediato da pKal è angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn.

Inoltre, la presente descrizione fornisce un metodo per determinare un valore di chininogeno scisso, un valore di chininogeno intatto o entrambi, in un campione, comprendente (a) mettere a contatto un campione (per esempio, un campione di sangue o un campione di plasma) contenente un chininogeno intatto e scisso con un reagente di

rilevamento in condizioni che consentano l'interazione tra l'agente di rilevamento e il chininogeno intatto e scisso, in cui l'agente di rilevamento lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto o che lega specificamente il chininogeno intatto rispetto al chininogeno scisso; (b) misurare il livello di chininogeno scisso e/o chininogeno intatto nel campione in base alla loro interazione con il reagente di rilevamento; e (c) determinare un valore (per esempio, percentuale) del chininogeno scisso, un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno intatto o entrambi nel campione in base ai livelli di chininogeno scisso e chininogeno intatto. In alcune forme di realizzazione, il reagente di rilevamento è un anticorpo, come un anticorpo che lega specificamente un chininogeno scisso rispetto a un chininogeno intatto, o un anticorpo che lega il C-terminale della catena leggera del chininogeno scisso. In alcune forme di realizzazione, le quantità di chininogeno intatto e chininogeno scisso sono misurate mediante saggio Western blot.

Sempre nell'ambito della presente descrizione sono (i) un metodo per trattare una malattia mediata da pKal, comprendente somministrare a un soggetto che ne abbia bisogno una quantità efficace di un inibitore pKal come qui descritto, in cui il soggetto ha un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno scisso, un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno intatto o entrambi, che devia dal un valore di riferimento, (ii) una composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento di una malattia mediata da pKal di un soggetto, in cui la

composizione comprende un inibitore di pKal e un trasportatore farmaceuticamente accettabile e in cui il soggetto ha un valore deviato di chininogeno scisso e/o chininogeno intatto, rispetto a un valore di riferimento, e (iii) uso della composizione farmaceutica per produrre un medicinale per l'uso nel trattamento di una malattia mediata da pKal, per esempio HAE. In alcune forme di realizzazione, il valore del chininogeno scisso e/o intatto è la percentuale di chininogeno scisso e/o intatto nel campione.

Le seguenti forme di realizzazione rientrano anch'esse nell'ambito della presente descrizione:

sono qui forniti metodi di valutazione di un soggetto, per esempio un soggetto a rischio di o malato di un disturbo mediato da pKal o da bradichinina. I metodi forniti consentono l'analisi di pazienti con angioedema mediato da callicreina plasmatica (KMA) o altre malattie mediate da pKal utili nella valutazione e nel trattamento.

Forme di realizzazione della presente descrizione forniscono un biomarcatore e relativo uso nell'identificazione e trattamento di pazienti, per esempio pazienti che soffrono di edema causato da bradichinina che è generata dalla callicreina plasmatica. I metodi, le composizioni e i dispositivi qui descritti sono utili in molti modi. Per esempio, i livelli di un marcatore di pKal possono essere usati per identificare disturbi associati con un'elevata attivazione del sistema di contatto. Lo screening iniziale può essere seguito con test in vitro o in vivo con inibitori della callicreina plasmatica (per esempio, DX-88, EPIKAL2 o

DX-2930), per esempio modelli preclinici della malattia. Un marcatore qui descritto può essere usato anche come un biomarcatore farmacodinamico o per monitorare altrimenti la risposta di un soggetto verso l'inibitore della callicreina. Un marcatore qui descritto può essere usato nella diagnostica complementare per consentire il trattamento di malattie mediate dalla callicreina plasmatica, gestire la somministrazione durante la terapia profilattica di un disturbo mediato da pKal o bradichinina, per esempio HAE, angioedema idiopatico non istamina-dipendente, artrite reumatoide, malattia di Crohn, colite ulcerosa, lupus, morbo di Alzheimer, shock settico, ustione, ischemia cerebrale, danno da riperfusione, edema cerebrale, retinopatia diabetica, nefropatia diabetica, edema maculare, vasculite, trombosi arteriosa o venosa, trombosi associata a dispositivi di assistenza ventricolare o stent, trombocitopenia indotta da eparina con trombosi, malattia tromboembolica e malattia coronarica con angina pectoris instabile, edema, malattia oculare, gotta, malattia intestinale, mucosite orale, dolore neuropatico, dolore infiammatorio, stenosi spinale-malattia spinale degenerativa, ileo post-operatorio, aneurisma aortico, osteoartrite, angioedema ereditario, embolia polmonare, ictus, trauma cranico o edema cerebrale peri-tumorale, sepsi, evento ischemico (ictus) acuto dell'arteria cerebrale media (MCA), restenosi (per esempio, dopo angioplastica), nefrite da lupus eritematoso sistemico, una malattia autoimmune, una malattia infiammatoria, una malattia cardiovascolare, una malattia neurologica, una malattia associata al

misfolding delle proteine, una malattia associata all'angiogenesi, nefropatia ipertensiva e nefropatia diabetica, malattie allergiche e respiratorie (per esempio, anafilassi, asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva, sindrome da distress respiratorio acuto, fibrosi cistica, rinite persistente) e lesioni tissutali (per esempio, bruciature o lesioni chimiche).

La presente descrizione fornisce un metodo di valutazione o trattamento di un soggetto, per esempio distinguendo un disturbo pKal-mediato, per esempio angioedema mediato dalla bradichinina, da un disturbo mediato da istamina, o di predire un attacco futuro di un disturbo pKal-mediato, comprendente acquisire, per esempio determinare, il livello di uno o più marcatori correlati all'attivazione di pKal (un marcatore pKal), qui descritto, per esempio chininogeno intatto, e chininogeno scisso, valutando o trattando così detto soggetto. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende acquisire, per esempio rilevare, il livello di uno o più marcatori correlati a una risposta infiammatoria mediata da istamina (un marcatore H), per esempio triptasi.

In alcune forme di realizzazione, detto disturbo pKal-mediato è HAE, IAE, IBD o IBS. In alcune forme di realizzazione, detto disturbo mediato da pKal è scelto tra, angioedema idiopatico non istamina-dipendente, artrite reumatoide, malattia di Crohn, colite ulcerosa, lupus, morbo di Alzheimer, shock settico, ustione, ischemia cerebrale, danno da riperfusione, edema cerebrale, retinopatia diabetica, nefropatia

diabetica, edema maculare, vasculite, trombosi arteriosa o venosa, trombosi associata a dispositivi di assistenza ventricolare o stent, trombocitopenia indotta da eparina con trombosi, malattia tromboembolica e malattia coronarica con angina pectoris instabile, edema, malattia oculare, gotta, malattia intestinale, mucosite orale, dolore neuropatico, dolore infiammatorio, stenosi spinale-malattia spinale degenerativa, ileo post-operatorio, aneurisma aortico, osteoartrite, angioedema ereditario, embolia polmonare, ictus, trauma cranico o edema cerebrale peri-tumorale, sepsi, evento ischemico (ictus) acuto dell'arteria cerebrale media (MCA), restenosi (per esempio, dopo angioplastica), nefrite da lupus eritematoso sistemico, una malattia autoimmune, una malattia infiammatoria, una malattia cardiovascolare, una malattia neurologica, una malattia associata al misfolding delle proteine, una malattia associata all'angiogenesi, nefropatia ipertensiva e nefropatia diabetica, malattie allergiche e respiratorie (per esempio, anafilassi, asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva, sindrome da distress respiratorio acuto, fibrosi cistica, rinite persistente) e lesioni tissutali (per esempio, bruciature o lesioni chimiche).

La presente descrizione fornisce anche un metodo di valutazione o trattamento di un soggetto, detto soggetto avente un sintomo coerente sia con un disturbo mediato da pKal, per esempio angioedema mediato da bradichinina, sia un disturbo correlato a istamina, comprendente a) facoltativamente, determinare che detto

soggetto abbia un sintomo, per esempio disturbo edematoso o addominale, coerente con uno o più disturbi mediati da pKal e un disturbo correlato a istamina; b) se detto soggetto non è stato trattato con una terapia antistaminica per detto sintomo, si tratti allora detto soggetto con una terapia antistaminica; c) acquisire, per esempio rilevare, il livello di uno o più marcatori correlati all'attivazione di pKal (un marcatore pKal), per esempio chininogeno intatto e chininogeno scisso; d) se detto livello soddisfa un criterio predeterminato; per esempio se è pari o superiore a un livello di riferimento: selezionare il soggetto per la terapia inibitoria con callicreina; o somministrare un inibitore della callicreina a detto soggetto, valutando o trattando così detto soggetto. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende selezionare il soggetto per la terapia inibitoria con callicreina. In certe forme di realizzazione, il metodo comprende somministrare un inibitore della callicreina a detto soggetto. In forme di realizzazione particolari, la selezione dei soggetti per la terapia inibitoria con callicreina o la somministrazione di un inibitore della callicreina a detto soggetto avviene prima di determinare che il soggetto non sia responsivo a detta terapia antistaminica, per esempio avviene entro 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ore da detto trattamento con una terapia antistaminica. In alcune forme di realizzazione, una determinazione per cui detto soggetto presenta un sintomo coerente sia con un disturbo pKal-mediato e un disturbo correlato a istamina e l'acquisizione di un campione da detto paziente per determinare il livello di un marcatore di pKal avviene: entro

30 minuti, 1, 2 o 3 ore uno dall'altro o durante la stessa visita presso un professionista sanitario.

In alcune forme di realizzazione, il detto inibitore di pKal è scelto tra DX-88, DX-2930 o EpiKal-2.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende acquisire, per esempio determinare, il livello di uno o più marcatori correlati a una risposta infiammatoria mediata da istamina (un marcatore H). In certe forme di realizzazione, detto soggetto è valutato per la suscettibilità a un disturbo mediato da pKal. In certe forme di realizzazione, detto soggetto presenta un sintomo di, per esempio, coerente con un disturbo pKal-mediato, per esempio edema, per esempio HAE. In certe forme di realizzazione, detto soggetto ha un sintomo di un disturbo caratterizzato da attivazione indesiderata di pKal e a detto soggetto è stata somministrata una terapia antistaminica. In forme di realizzazione particolari, detta terapia antistaminica è somministrata entro 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 ore prima o dopo una fase di determinazione, come qui descritto. In forme di realizzazione particolari, il metodo comprende inoltre somministrare una terapia antistaminica a detto soggetto, per esempio prima, dopo o durante la valutazione o determinazioni come qui descritto.

In alcune forme di realizzazione, se responsivi a detta determinazione o valutazione, somministrare un inibitore della callicreina a detto soggetto. In certe forme di realizzazione, detto soggetto ha uno o più o tutti i seguenti sintomi o proprietà: attacchi

ricorrenti di tumefazione; tumefazione in cui detta tumefazione è completamente o principalmente periferica, per esempio il soggetto non ha significativa tumefazione addominale o delle vie aeree; orticaria, dolore e tumefazione in assenza di evidenza di infezione; non risponde alla terapia antistaminica o con corticosteroidi o non presenza edema non istamina-mediato. In certe forme di realizzazione, detto soggetto ha edema persistente o ricorrente e non è responsivo a una o entrambe le terapie con antistaminici e steroidi. In certe forme di realizzazione, il soggetto non ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS; il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS, il soggetto non ha un'anamnesi di HAE; il soggetto ha un'anamnesi di HAE; il soggetto non ha un'anamnesi di IAE; il soggetto ha un'anamnesi di IAE; il soggetto non ha un'anamnesi di IBD o IBS; il soggetto ha un'anamnesi di IBD o IBS; il soggetto non ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare; il soggetto non ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS e non ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare; o il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare: il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS e ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, un'allergia alimentare; o il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS e ha

un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare.

In alcune forme di realizzazione, il soggetto è stato trattato con un inibitore della callicreina, per esempio nella terapia profilattica, per esempio per HAE e la risposta del soggetto all'inibitore della callicreina è valutata o monitorata e, facoltativamente, responsivo a detto monitoraggio, una terapia è scelta o somministrata, per esempio, responsiva alla determinazione, il dosaggio dell'inibitore della callicreina è regolato. In alcune forme di realizzazione, una determinazione di un marcatore di pKal è eseguita nel contesto di una diagnosi accompagnatoria e, facoltativamente, si procede o ci si astiene dalla somministrazione di un agente terapeutico sulla base della determinazione. In certe forme di realizzazione, la responsività a detto trattamento si basa sull'identificazione di un attacco acuto imminente, per esempio un attacco di HAE o IEA. In certe forme di realizzazione, detto soggetto è valutato per la suscettibilità all'angioedema idiopatico. In forme di realizzazione particolari, detta valutazione comprende determinare se detto soggetto soffre di un disturbo pKal-mediato, per esempio un disturbo mediato da bradichinina, per esempio un angioedema mediato da pKal o di un disturbo mediato da istamina, per esempio una reazione allergica alimentare.

In alcune forme di realizzazione, il soggetto non ha un'anamnesi di un disturbo mediato da pKal, per esempio HAE o IAE. In alcune forme di realizzazione, il soggetto ha un'anamnesi di un

disturbo mediato da pKal, per esempio HAE o IAE. In alcune forme di realizzazione, il soggetto non ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS; il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS, il soggetto non ha un'anamnesi di HAE; il soggetto ha un'anamnesi di HAE; il soggetto non ha un'anamnesi di IAE; il soggetto ha un'anamnesi di IAE; il soggetto non ha un'anamnesi di IBD o IBS; il soggetto ha un'anamnesi di IBD o IBS; il soggetto non ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare; il soggetto non ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS e non ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare; o il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare: il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS e ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, un'allergia alimentare; o il soggetto ha un'anamnesi di un disturbo pKal-mediato, per esempio HAE, IAE, IBD o IBS e ha un'anamnesi di un disturbo mediato da istamina, per esempio un'allergia alimentare.

In alcune forme di realizzazione, un marcatore di pka, per esempio un marcatore di pKal qui descritto, è rilevato con un reagente a base di anticorpi. In certe forme di realizzazione, un marcatore di pKal è rilevato con il saggio immunologico a sandwich. In certe forme di realizzazione, il metodo comprende acquisire, per esempio rilevare, il

livello di chininogeno, per esempio uno o entrambi i chininogeni intatto o scisso, per esempio mediante un saggio di separazione con elettroforesi, per esempio un Western blot. In alcune forme di realizzazione, un marcatore di pKal, per esempio chininogeno, è rilevato in un saggio che si basa sulla separazione, per esempio separazione elettroforetica, per esempio mediante Western blot, dell'analita da altri prodotti.

In alcune forme di realizzazione, un marcatore di pKal è rilevato con il saggio immunologico a sandwich e un secondo marcatore di pKal, per esempio chininogeno, è rilevato in un saggio che si basa sulla separazione, per esempio separazione elettroforetica, per esempio mediante Western blot, dell'analita da altri prodotti. In certe forme di realizzazione, il rilevamento di un marcatore di pKal è qualitativo. In certe forme di realizzazione, il rilevamento di un marcatore di pKal è quantitativo. In forme di realizzazione particolari, viene rilevato un livello di chininogeno intatto e un livello di chininogeno scisso.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende confrontare il livello di un marcatore di pKal, per esempio chininogeno intatto o chininogeno scisso, con un valore di riferimento. In certe forme di realizzazione, detto valore di riferimento è una funzione del livello di detto marcatore di pKal in un HAE, per esempio in uno o più soggetti con HAE. In certe forme di realizzazione, detto valore di riferimento è una funzione del livello di detto marcatore di pKal in un HAE durante un attacco, per esempio in uno o più soggetti con HAE durante un attacco

acuto. In certe forme di realizzazione, detto valore di riferimento è una funzione del livello di un marcatore di pKal in un IAE, per esempio in uno o più soggetti con IAE. In certe forme di realizzazione, detto valore di riferimento è una funzione del livello di un marcatore di pKal in un IAE durante un attacco acuto, per esempio in uno o più soggetti con IAE durante un attacco acuto. In certe forme di realizzazione, detto valore di riferimento è una funzione del livello di un marcatore di pKal in assenza di HAE o IAE, per esempio in uno o più soggetti senza anamnesi di HAE o IAE.

In forme di realizzazione particolari, il metodo comprende per esempio, dopo un confronto, classificare il soggetto, per esempio, classificando il soggetto in base al rischio di un disturbo mediato da pKal, o somministrare a o interrompere una terapia in detto soggetto. In certe forme di realizzazione, il metodo comprende, per esempio, dopo un confronto, selezionare un trattamento per detto soggetto. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende, per esempio, dopo un confronto, somministrare a o interrompere una terapia in detto soggetto, per esempio un agente legante la callicreina, un antagonista del recettore B2 della bradichinina o un agente di sostituzione di C1-INH. In forme di realizzazione particolari, detto trattamento è la somministrazione di un inibitore di pKal, per esempio un inibitore di pKal scelto tra DX-88, EpiKal-2 e DX-2930.

In alcune forme di realizzazione, un campione da detto soggetto è messo a contatto con un substrato comprendente un agente

di cattura per due o più marcatori, per esempio da: un marcatore di pKal o un marcatore di H, per esempio un anticorpo del marcatore anti-H; facoltativamente, in cui almeno un agente di cattura è un agente di cattura per un marcatore di pKal.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende acquisire un campione, per esempio un campione di sangue o plasma, da detto soggetto.

In alcune forme di realizzazione, un primo agente di cattura (per un primo marcatore) e un secondo agente di cattura (per un secondo marcatore) sono disposti su un substrato in modo che si possa distinguere un segnale della presenza del primo marcatore da un segnale della presenza del secondo marcatore. In certe forme di realizzazione, detto primo agente di cattura (per un primo marcatore) è posizionato in una prima posizione o indirizzo e detto secondo agente di cattura (per un secondo marcatore) è posizionato in una seconda posizione o indirizzo. In forme di realizzazione particolari, detta prima posizione o indirizzo e detta seconda posizione o indirizzo non si sovrappongono a detto substrato. In certe forme di realizzazione, detto primo agente di cattura è per un primo marcatore di pKal. In certe forme di realizzazione, detto primo agente di cattura è per un primo marcatore di pKal e detto secondo agente di cattura è per un secondo marcatore di pKal. In certe forme di realizzazione, detto primo agente di cattura è per un marcatore di pKal e detto secondo agente di cattura è per un marcatore di H.

In certe forme di realizzazione, il metodo comprende mettere a contatto un substrato con una sostanza rilevabile, per esempio un anticorpo, per determinare la presenza o la quantità di un marcatore di pKal. In certe forme di realizzazione, detti anticorpi sono marcati con una porzione funzionale che produce un prodotto colorato, emette un fotone, assorbe un fotone, altera un substrato o altera la conduttività del substrato. In certe forme di realizzazione, detti anticorpi sono marcati con una porzione funzionale che utilizza elettrochemiluminescenza. In certe forme di realizzazione, detti anticorpi sono marcati con resina. In forme di realizzazione particolari, detto substrato è fornito in un dispositivo Meso Scale Discovery. In forme di realizzazione particolari, detto substrato è fornito come nastro reagente, adatto per l'uso con uno o entrambi tra sangue e plasma. In forme di realizzazione particolari, detto primo agente di cattura e detto secondo agente di cattura sono disposti in una camera comune o collegata fluidicamente, per esempio una camera, per esempio un pozzetto o depressione, in un dispositivo multi-camera, per esempio una piastra multipozzetto. In forme di realizzazione particolare, detto primo agente di cattura e detto secondo agente di cattura sono stampati su un substrato.

In alcune forme di realizzazione, detto agente di cattura per un primo marcatore di pKal si trova in una prima posizione su detto substrato e detto agente di cattura per un secondo marcatore di pKal si trova in una seconda posizione su detto substrato e dette prima e seconda posizione sono collocate su detto substrato in modo che si

possa distinguere un segnale della presenza del primo marcatore di pKal dal segnale del secondo marcatore di pKal. In certe forme di realizzazione, detto substrato comprende un agente di cattura per un terzo marcatore in una terza posizione e la terza posizione è collocata su detto substrato, in modo che si possa distinguere un segnale della presenza del terzo marcatore da un segnale di detto primo e secondo marcatore.

In alcune forme di realizzazione, una determinazione del livello di un marcatore di pKal in un campione può essere effettuata entro 1, 2, 3, 4 o 5 ore del contatto tra substrato e detto campione. In alcune forme di realizzazione, una determinazione del livello di due marcatori di pKal in un campione può essere effettuata entro 1, 2, 3, 4 o 5 ore del contatto tra substrato e detto campione. In alcune forme di realizzazione, una determinazione del livello di due marcatori di pKal è effettuata in saggi eseguiti contemporaneamente, per esempio l'incubazione o altri intervalli dei test si sovrappongono l'un l'altro.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un substrato comprendente agenti di cattura per una pluralità di marcatori di pKal, per esempio come qui descritto.

In un ulteriore aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per determinare se un disturbo è suscettibile di trattamento con un inibitore di pKal comprendente: valutare i livelli di uno o di una pluralità di marcatori di pKal, per esempio come qui descritto, in per esempio un soggetto che soffra di detto disturbo, o un modello animale

per detto disturbo; confrontare il livello determinato con un riferimento, in cui un livello che soddisfi un criterio predeterminato, per esempio, che sia pari o superiore al livello di riferimento, è indicativo di un disturbo suscettibile di trattamento con un inibitore di pKal. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende valutare l'effetto di un inibitore della callicreina, *in vitro* o *in vivo*, in un modello animale di detto disturbo.

In un altro aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per trattare un soggetto avente un disturbo pKal mediato, per esempio un disturbo mediato da bradichinina, comprendente valutare il livello di un marcatore di pKal qui descritto, per esempio mediante un metodo qui descritto, determinare, e dopo detta valutazione, selezionare un trattamento, per esempio selezionare una o entrambe la quantità di dosaggio o la frequenza di dosaggio, di un inibitore della callicreina. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende somministrare un inibitore della callicreina a detto soggetto. In alcune forme di realizzazione, a detto paziente è stato somministrato un inibitore della callicreina prima di detta valutazione. In certe forme di realizzazione, il metodo comprende somministrare un inibitore della callicreina a detto dosaggio o frequenza selezionati.

In un ulteriore aspetto, la presente divulgazione fornisce un metodo per determinare se un disturbo è suscettibile di trattamento con un inibitore di pKal comprendente: valutare i livelli di uno o di una pluralità di marcatori di pKal, per esempio come qui descritto, in per

esempio un soggetto che soffra di detto disturbo, o un modello animale per detto disturbo; confrontare il livello determinato con un riferimento, in cui un livello che soddisfi un criterio predeterminato, per esempio, che sia pari o superiore al livello di riferimento, è indicativo di un disturbo suscettibile di trattamento con un inibitore di pKal. In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende valutare l'effetto di un inibitore della callicreina, *in vitro* o *in vivo*, in un modello animale di detto disturbo.

In un altro aspetto la descrizione illustra i metodi e i dispositivi di raccolta di un campione, per esempio sangue, con una minima attivazione del contatto. In una forma di realizzazione, la descrizione illustra un contenitore, avente in esso collocato un reagente di cattura qui descritto, per esempio un inibitore della callicreina, per esempio un polipeptide che è simile in sequenza a DX-88, per esempio uno che differisce da DX-88 per non più di 1, 2 o 5 residui amminoacidici, per esempio EPIKAL-2. Il contenitore è configurato, per esempio, con un'apertura, setto, eccetera in modo da consentire di raccogliere un campione, per esempio sangue, da un soggetto e di legare un marcatore correlato a pKal nel campione, per esempio pKal, con il reagente di cattura, nello stesso contenitore. Misurazioni di specie legate, per esempio pKal, possono essere eseguite nello stesso contenitore o in forme di realizzazione, il substrato è rimosso dal contenitore precedente per la misurazione, per esempio la misurazione può essere in o con un altro dispositivo. In forme di realizzazione il

volume del contenitore è 0,5-100, 0,5-50, 0,5-10, 1-100, 1-50 o 1-25 ml. In una forma di realizzazione, il reagente di cattura, per esempio un reagente di cattura di pKal, è posizionato sulla superficie interna del contenitore. Il reagente di cattura può essere accoppiato alla superficie con un primo partner di legame specifico legato alla superficie e un secondo partner di legame specifico accoppiato al reagente di cattura. Esempi di partner di legame specifici sono biotina e avidina. In una forma di realizzazione il reagente di cattura biotinilato, per esempio un reagente di cattura di pKal, per esempio un inibitore della callicreina, per esempio un polipeptide che è simile in sequenza a DX-88, per esempio uno che differisce da DX-88 per non più di 1, 2 o 5 residui amminoacidici, per esempio EPIKAL-2 è posizionato su una superficie del contenitore che è rivestita con avidina.

La presente descrizione fornisce biomarcatori in grado di identificare pazienti con angioedema mediato da callicreina plasmatica (KMA) o altre malattie mediate da pKal utili nella valutazione e nel trattamento.

I pazienti che mostrano di presentare attivazione di pKal mediante un biomarcatore sono candidati per il trattamento con un inibitore di pKal, come DX-88, un piccolo inibitore proteico di pKal approvato per il trattamento degli attacchi edematosi acuti associati a HAE. Altri inibitori di pKal includono DX-2930, che è un inibitore anticorpale umano completo. In alcune forme di realizzazione, i pazienti che hanno mostrato di presentare attivazione di pKal mediante un

biomarcatore sono candidati per il trattamento con un antagonista del recettore B2 della bradichinina, per esempio Incatibant (Firazyr®). In alcune forme di realizzazione, i pazienti che hanno mostrato di presentare attivazione di pKal mediante un biomarcatore sono candidati per il trattamento con un agente di sostituzione di C1-INH, per esempio un concentrato di C1-INH nanofiltrato pastorizzato purificato umano (Berinert®).

Forme di realizzazione della descrizione forniscono un biomarcatore e relativo uso nell'identificazione e trattamento di pazienti, per esempio pazienti che soffrono di edema causato da bradichinina che è generata dalla callicreina plasmatica. I metodi, le composizioni e i dispositivi qui descritti sono utili in molti modi. Per esempio, i livelli di un marcatore di pKal possono essere usati per identificare disturbi associati con un'elevata attivazione del sistema di contatto. Lo screening iniziale può essere seguito con test in vitro o in vivo con inibitori della callicreina plasmatica (per esempio, DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930), per esempio modelli preclinici della malattia. Un marcatore qui descritto può essere usato anche come un biomarcatore farmacodinamico o per monitorare altrimenti la risposta di un soggetto verso l'inibitore della callicreina. Un marcatore qui descritto può essere usato nella diagnosi accompagnatoria per consentire il trattamento di malattie mediate dalla callicreina plasmatica, la gestione del dosaggio durante la terapia profilattica di HAE o l'identificazione di un attacco acuto di HAE incombente.

## **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

La **FIG. 1** è un'illustrazione di elementi coinvolti nell'attivazione del sistema di contatto della callicreina plasmatica.

La **FIG. 2** mostra il rilevamento di chininogeno scisso mediante analisi Western blot. Campioni sono stati analizzati usando SDS-PAGE (3-8% di tris-acetato) in condizioni riducenti seguito dal trasferimento a una membrana PVDF e immunoblotting. Corsia 1 - 50 nM chininogeno intatto; corsia 2 - 50 nM chininogeno scisso; corsia 3 - 50 nM chininogeno a basso peso molecolare; corsia 4 - 1:20 plasma umano contenente sodio citrato (provetta di raccolta in vetro); corsia 5 - 1:20 plasma umano contenente sodio citrato (plastica) trattato con callicreina; corsia 6 - 1:20 plasma umano contenente sodio citrato (plastica); corsia 7 - 1:20 plasma umano contenente sodio citrato (plastica) 20nM chininogeno a doppia catena aggiunto.

La **FIG. 3** mostra il rilevamento di chininogeno intatto (vale a dire a una catena) nel campione di un paziente ottenuto durante un attacco. Il campione di plasma del paziente è stato raccolto in provette con plasma citrato contenenti un cocktail anti-proteasi.

La **FIG. 4** mostra uno schema della struttura del dominio di HMWK a catena singola e HMWK a catena doppia dopo scissione con pKal e un Western blot che ha rilevato HMWK a catena singola e catena doppia usando un anticorpo che lega la catena leggera del chininogeno scisso. C1 = HMWK a catena singola, 2 = HMWK a catena doppia, G = vetro, P = plastica.

La **FIG. 5** mostra il sistema di rilevamento LICOR di HMWK purificato come saggio semi-quantitativo. HMWK umano purificato e HMWK scisso sono stati titolati da 9 0µg/ml a 5,6 µg/ml in plasma umano privo di HMWK. I campioni sono stati diluiti 1:20 in TBS e tampone di caricamento del campione (con DTT). I campioni diluiti sono stati eseguiti su 4-12% di bis-tris gel e, dopo elettroforesi, trasferiti in una membrana di nitrocellulosa. Dopo il blocco, il blot è stato visualizzato usando un anticorpo HMWK anti-umano di topo (clone n. 11H05), che è specifico della catena leggera di HMWK e un IRDye 680 anti-topo di capra. I gel sono stati scansionati usando lo scanner IR LICOR Odyssey, che è in grado di rilevare il segnale di eccitazione di IRDye 680.

La **FIG. 6** mostra un Western blot e un'analisi LICRO del campione del paziente con HAE e dimostra che i campioni di pazienti con HAE mostrano livelli endogeni più elevati di HMWK scisso. Sia il plasma di pazienti con attacco di HAE e HAE basale avevano una percentuale maggiore di HMWK scisso rispetto a un plasma con stato non patologico da analisi LICOR. I campioni di plasma analizzati sono stati raccolti in una soluzione anti-proteasi che, se confrontata ai campioni di plasma con sodio citrato degli stessi pazienti allo stesso momento di prelievo, ha protetto il plasma dei pazienti con HAE da un'ulteriore attivazione da contatto. Le barre di errore nel grafico rappresentano la deviazione standard.

La **FIG. 7** mostra un Western blot e un grafico che illustra la

valutazione delle condizioni di attivazione di FXIIa. La **FIG. 7A**: Western blot con rilevamento Licor di plasma umano normale attivato con concentrazioni diverse di FXIIa a varie temperature (glaciale vs 37 °C) e tempi di incubazione (10 vs 30 minuti). Corsia 1: marcatori del peso molecolare; corsia 2: HMWK purificato a catena singola e catena doppia; corsia 3: plasma umano normale; corsia 4: plasma umano normale + 2,5 nM FXIIa per 10 minuti a 37 °C; corsia 5: plasma umano normale + 2,5 nM FXIIa per 30 minuti a 37 °C; corsia 6: plasma umano normale + 2,5 nM FXIIa per 10 minuti su ghiaccio; corsia 7: plasma umano normale + 2,5 nM FXIIa per 30 minuti su ghiaccio; corsia 8: plasma umano normale + 5 nM FXIIa per 10 minuti a 37 °C; corsia 9: plasma umano normale + 5 nM FXIIa per 30 minuti a 37 °C; corsia 10: plasma umano normale + 5 nM FXIIa per 10 minuti su ghiaccio; corsia 11: plasma umano normale + 5 nM FXIIa per 30 minuti su ghiaccio; corsia 12: plasma umano normale + 7,5 nM FXIIa per 10 minuti a 37 °C; corsia 13: plasma umano normale + 7,5 nM FXIIa per 30 minuti a 37 °C; corsia 14: plasma umano normale + 7,5 nM FXIIa per 10 minuti su ghiaccio; corsia 15: plasma umano normale + 7,5 nM FXIIa per 30 minuti su ghiaccio. La **FIG. 7B**: percentuale di HMWK a catena doppia in ciascuna corsia determinata usando le intensità del segnale LICOR ( $\% \text{ HMWK a catena doppia} = (\text{segnale da } 46 \text{ kDa} + \text{segnale da } 56 \text{ kDa}) / (\text{segnale da } 46 \text{ kDa} + \text{segnale da } 56 \text{ kDa} + \text{segnale da } 110 \text{ kDa})$ ).

La **FIG. 8** mostra un Western blot e un grafico che illustra gli effetti inibitori di DX-88 e DX-2930 su attivazione di FXIIa dell'attività di

pKal. **FIG. 8A:** analisi Western blot che illustra che Ecallantide e DX-2930 inibiscono il clivaggio di HMWK mediante pKal se aggiunti a plasma umano *ex vivo*. **Fig. 8B:** diagramma che mostra gli effetti di DX-88 e DX-2930 sulla produzione di HMWK scisso in presenza di FXIIa. Un pool di plasma umano contenente sodio citrato è stato pretrattato con DX-2930 o ecallantide a concentrazioni variabili tra 1370 e 34,3 nM. Tutti i campioni (incluso un campione non trattato) sono stati attivati per addizione di 2,5 nM di FXIIa. Gli enzimi sono stati quindi inibiti per addizione di un cocktail di inibitori della proteasi. Concentrazioni molari uguali di ecallantide e DX-2930 riducono la quantità di HMWK scisso in modo equivalente nel pool di plasma umano se paragonato al campione di plasma non trattato. C = 25 nM 1 e HMWK a doppia catena; N = Plasma normale; + = plasma umano attivato (senza farmaco).

La **FIG. 9** mostra un'analisi Western blot dell'attivazione del sistema di contatto in pazienti con colite ulcerosa (UC) e artrite reumatoide (RA). Corsia 1: marcatori del peso molecolare; corsia 2: HMWK a catena singola e catena doppia purificato; corsia da 3 a 5: plasma umano normale; corsia da 6 a 10: plasma da pazienti con UC; corsia da 11 a 15: plasma da pazienti con RA. Ulteriori dettagli riguardanti i campioni in ciascuna corsia sono forniti nella Tabella 3.

La **FIG. 10** mostra un'analisi Western blot dell'attivazione del sistema di contatto in pazienti con malattia di Crohn (CD). Corsia 1: marcatori del peso molecolare; corsia 2: HMWK a catena singola e

catena doppia purificato; corsia da 3 a 5: plasma umano normale; corsia da 6 a 10: plasma da pazienti CD. Ulteriori dettagli riguardanti i campioni in ciascuna corsia sono forniti nella Tabella 4.

## **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

### **Definizioni**

Per comodità, prima di fornire un'ulteriore descrizione della presente invenzione, si definiscono qui alcuni termini impiegati nella specifica, negli esempi e nelle rivendicazioni allegate. Altri termini sono definiti man mano che compaiono nella specifica.

Le forme singolari “un/uno/una” e “il/lo/la” includono i riferimenti plurali salvo altrimenti indicato in modo chiaro.

Come qui usato, “acquire” o “acquisendo” si riferisce all'ottenimento del possesso di un'entità fisica o di un valore, per esempio un valore numerico, “acquisendo direttamente” o “acquisendo indirettamente” l'entità fisica o il valore. “Acquisire direttamente” significa eseguire un processo (per esempio, eseguire un saggio o un test su un campione o “analizzare un campione”, così come è qui definito il termine) per ottenere l'entità fisica o il valore. “Acquisire indirettamente” si riferisce a ricevere l'entità fisica o il valore da una terza parte o fonte (per esempio, un laboratorio terzo che ha acquisito direttamente l'entità fisica o il valore). L'acquisizione diretta di un'entità fisica include eseguire un processo, per esempio analizzare un campione, che include un cambiamento fisico in una sostanza fisica, per esempio un materiale di partenza. Cambiamenti esemplari

includono creare un'entità fisica da due o più materiali di partenza, frantumare o frammentare una sostanza, separare o purificare una sostanza, combinare due o più entità separate in una miscela, eseguire una reazione chimica che includa rompere o formare un legame covalente o non covalente. L'acquisizione diretta di un valore include eseguire un processo che includa un cambiamento fisico in un campione o un'altra sostanza, per esempio eseguire un processo analitico che include un cambiamento fisico in una sostanza, per esempio, un campione, analita o reagente (talvolta qui chiamata "analisi fisica"), eseguire un metodo analitico, per esempio un metodo che includa uno o più dei seguenti: separare o purificare una sostanza, per esempio un analita o un frammento o altro suo derivato, da un'altra sostanza; combinare un analita o frammento o altro suo derivato, con un'altra sostanza, per esempio un tampone, solvente o reagente; o cambiare la struttura di un analita, o un frammento o altro suo derivato; o cambiare la struttura di un analita, o un frammento o altro suo derivato, per esempio rompendo o formando un legame covalente o non covalente, tra un primo e un secondo atomo dell'analita; o modificando la struttura di un reagente o un frammento o altro suo derivato, per esempio rompendo o formando un legame covalente o non covalente, tra un primo e un secondo atomo del reagente.

Come qui usato, "analizzare" un campione include eseguire un processo che prevede un cambiamento fisico in un campione o altra sostanza, per esempio un materiale di partenza. Cambiamenti

esemplari includono creare un'entità fisica da due o più materiali di partenza, frantumare o frammentare una sostanza, separare o purificare una sostanza, combinare due o più entità separate in una miscela, eseguire una reazione chimica che includa rompere o formare un legame covalente o non covalente. Analizzare un campione può includere eseguire un processo analitico che include un cambiamento fisico in una sostanza, per esempio un campione, analita o reagente (talvolta qui chiamata "analisi fisica"), eseguire un metodo analitico, per esempio un metodo che include uno o più dei seguenti: separare o purificare una sostanza, per esempio, un analita o un frammento o altro suo derivato, da un'altra sostanza; combinare un analita o un frammento o altro suo derivato, con un'altra sostanza, per esempio un tampone, solvente o reagente; o modificare la struttura di un analita, o un frammento o altro suo derivato, per esempio rompendo o formando un legame covalente o non covalente, tra un primo e un secondo atomo dell'analita o modificando la struttura di un reagente, o un frammento o altro suo derivato, per esempio rompendo o formando un legame covalente o non covalente, tra un primo e un secondo atomo del reagente.

Il termine "agonista", come qui usato, è inteso riferirsi a un agente che mima o sovra-regola (per esempio, potenza o integra) la bioattività di una proteina. Un agonista può essere una proteina di tipo selvatico o un suo derivato avente almeno una bioattività della proteina di tipo selvatico. Un agonista può essere anche un composto che

aumenta almeno una bioattività di una proteina. Un agonista può essere anche un composto che aumenta l'interazione di un polipeptide con un'altra molecola, per esempio un peptide o acido nucleico bersaglio.

Il termine "agonista", come qui usato, è inteso riferirsi a un agente che sottoregola (per esempio, sopprime o inibisce) almeno una bioattività di una proteina. Un antagonista può essere un composto che inibisce o riduce l'interazione tra una proteina e un'altra molecola, per esempio un peptide o un substrato enzimatico bersaglio. Un antagonista può essere anche un composto che riduce o inibisce la quantità di proteina espressa presente. Tipicamente, inibire una proteina o un gene si riferisce a ridurre l'espressione o una rilevante attività della proteina o del gene almeno del 10% o più, per esempio, 20%, 30%, 40% o 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o più o a una riduzione nell'espressione o nell'attività rilevante superiore a 1 volta, 2 volte, 3 volte, 4 volte, 5 volte, 10 volte, 50 volte, 100 volte o più, come misurato da uno o più metodi qui descritti o riconosciuti nella tecnica.

Come qui usato, "affinità di legame" si riferisce alla costante di associazione apparente o  $K_a$ .  $K_a$  è il reciproco della costante di dissociazione ( $K_d$ ). Una proteina di legame può, per esempio, avere un'affinità di legame di almeno  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  e  $10^{11} \text{ M}^{-1}$  per una particolare molecola bersaglio. Il legame a più elevata affinità di una proteina di legame con un primo bersaglio rispetto a un secondo bersaglio può essere indicato da un  $K_a$  maggiore (o un valore numerico

inferiore di  $K_d$ ) per il legame al primo bersaglio rispetto a  $K_a$  (o valore numerico di  $K_d$ ) per il legame al secondo bersaglio. In tali casi, la proteina di legame ha specificità per il primo bersaglio (per esempio, una proteina in una prima conformazione o sua mimesi) rispetto al secondo bersaglio (per esempio, la stessa proteina in una seconda conformazione o sua mimesi; o una seconda proteina). Le differenze nell'affinità di legame (per esempio, per specificità o altri confronti) possono essere almeno pari a 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, o 105 volte.

L'affinità di legame può essere determinata in base a una varietà di metodi che includono dialisi all'equilibrio, legame all'equilibrio, filtrazione su gel, ELISA, risonanza plasmonica di superficie o spettroscopia (per esempio, usando un saggio di fluorescenza). Condizioni esemplari per la valutazione dell'affinità di legame si trovano nel tampone TRIS (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  a pH7,5). Queste tecniche possono essere usate per misurare la concentrazione di proteina legata e proteina legante libera come funzione della concentrazione della proteina legante (o bersaglio). La concentrazione della proteina legante di legame ( $[\text{Legata}]$ ) è legata alla concentrazione di proteina legante libera ( $[\text{Libera}]$ ) e alla concentrazione di siti di legame per la proteina legante sul bersaglio, dove (N) è il numero di siti di legame per molecola di bersaglio in base alla seguente equazione:

$$[\text{Bound}] = N \cdot [\text{Free}] / ((1/K_a) + [\text{Free}]).$$

Non è sempre necessario determinare esattamente  $K_a$ , tuttavia,

poiché talvolta è sufficiente ottenere una misurazione quantitativa dell'affinità, per esempio determinata usando un metodo come ELISA o analisi FACS, è proporzionale a  $K_a$  e, pertanto, può essere usato per fare confronti, come determinare se un'affinità più elevata è, per esempio, 2 volte maggiore, per ottenere una misurazione qualitativa dell'affinità o per ottenere un'inferenza dell'affinità, per esempio in base all'attività in un saggio funzionale, per esempio un saggio *in vitro* o *in vivo*.

Il termine "proteina di legame" si riferisce a una proteina che può interagire con una molecola bersaglio. Questo termine è usato in maniera interscambiabile con "ligando". Una "proteina di legame alla callicreina plasmatica" si riferisce a una proteina che può interagire con (per esempio, legare) la callicreina plasmatica, e include, in particolare, proteine che interagiscono e/o inibiscono preferenzialmente o specificamente la callicreina plasmatica. Una proteina inibisce la callicreina plasmatica se causa una riduzione dell'attività della callicreina plasmatica, rispetto all'attività della callicreina plasmatica in assenza della proteina e alle stesse condizioni. In alcune forme di realizzazione, la proteina di legame alla callicreina plasmatica è un anticorpo.

Il termine "reagente di cattura" si riferisce a una porzione funzionale che lega specificamente il proprio ligando.

Come qui usati, i termini "complesso" o "formazione del complesso" si riferiscono a un complesso tra membri aventi un'affinità

specifica uno per l'altro.

Una “sostituzione amminoacidica conservativa” è quella in cui il residuo amminoacidico viene sostituito con un residuo amminoacidico avente una catena laterale simile. Famiglie di residui amminoacidici aventi catene laterali simili sono state definite nell'arte. Queste famiglie includono amminoacidi con catene laterali basiche (per esempio lisina, arginina, istidina), catene laterali acide (per esempio acido aspartico, acido glutammico), catene laterali polari non cariche (per esempio glicina, asparagina, glutammina, serina, treonina, tirosina, cisteina), catene laterali non polari (per esempio alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), catene laterali beta-ramificate (per esempio treonina, valina, isoleucina) e catene laterali aromatiche (per esempio tirosina, fenilalanina, triptofano, istidina).

Sequenze del motivo per biopolimeri possono includere posizioni che possono essere amminoacidi variati. Per esempio, il simbolo “X” in un tale contesto si riferisce generalmente a qualsiasi amminoacido (per esempio, uno qualsiasi dei venti amminoacidi naturali) salvo se diversamente specificato, per esempio, per riferirsi a qualsiasi amminoacido non cisteinico. Altri amminoacidi ammessi possono essere indicati anche, per esempio, usando parentesi e slash. Per esempio, “(A/W/F/N/Q)” significa che alanina, triptofano, fenilalanina, asparagina e glutammina sono ammessi in quella posizione particolare.

Come qui usato, un “reagente di rilevamento” si riferisce a una porzione funzionale che lega la porzione funzionale da rilevare. Genera tipicamente un segnale, per esempio fluorescenza, o produce un composto misurabile.

Un “epitopo” si riferisce al sito su un composto bersaglio che è legato da una proteina di legame (per esempio, un anticorpo come un Fab o un anticorpo a lunghezza intera). Nel caso in cui il composto bersaglio sia una proteina, il sito può essere interamente composto da componenti amminoacidici, interamente composto da modifiche chimiche di amminoacidi della proteina (per esempio, porzioni funzionali glicosile) o composti di loro combinazioni. Epitopi di sovrapposizione includono almeno un residuo amminoacidico comune, un gruppo glicosile, un gruppo fosfato, un gruppo solfato o altra caratteristica molecolare.

Una prima proteina di legame (per esempio, un anticorpo) “lega lo stesso epitopo” di una seconda proteina di legame (per esempio, un anticorpo) se la prima proteina di legame lega lo stesso sito su un composto bersaglio che lega la seconda proteina di legame o lega un sito che si sovrappone (per esempio, una sovrapposizione del 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%, per esempio, in termini di sequenza amminoacidica o altra caratteristica molecolare [per esempio, gruppo glicosile, gruppo fosfato o gruppo solfato]) con il sito che lega la seconda proteina di legame.

Una prima proteina di legame (per esempio un anticorpo)

“compete per il legame” con una seconda proteina di legame (per esempio un anticorpo), se il legame della prima proteina di legame al proprio epitopo riduce (per esempio del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% o più) la quantità della seconda proteina di legame che lega il proprio epitopo. La competizione può essere diretta (per esempio, la prima proteina di legame lega un epitopo che è uguale o si sovrappone all’epitopo legato dalla seconda proteina di legame) o indiretta (per esempio il legame della prima proteina di legame al proprio epitopo causa una modifica sterica nel composto bersaglio, che riduce la capacità della seconda proteina di legame di legare il proprio epitopo).

Come qui usato, una molecola biologica “funzionale” è una molecola biologica in una forma che mostra una proprietà e/o attività da cui è caratterizzata.

I calcoli di "omologia" o "identità di sequenza" tra due sequenze (i termini sono utilizzati in modo intercambiabile nel presente documento) sono eseguiti come segue. Le sequenze sono allineate ai fini di un confronto ottimale (per esempio dei gap possono essere introdotti in una o entrambe una prima e una seconda sequenza amminoacidica o di acido nucleico per un allineamento ottimale e le sequenze non omologhe possono essere ignorate ai fini del confronto). L’allineamento ottimale è determinato come il miglior punteggio usando il programma GAP nel pacchetto software GCG con una matrice di punteggio Blossum 62 con una penalità per i gap di 12, una penalità per

l'estensione dei gap di 4, e una penalità per lo spostamento dei gap di 5. I residui amminoacidici o i nucleotidi nelle corrispondenti posizioni amminoacidiche o posizioni nucleotidiche vengono poi confrontati. Quando una posizione nella prima sequenza è occupata dallo stesso residuo amminoacidico o nucleotidico come la posizione corrispondente nella seconda sequenza, allora le molecole sono identiche in quella posizione (come utilizzato nel presente documento l'"identità" amminoacidica o dell'acido nucleico è equivalente all'"omologia" amminoacidica o dell'acido nucleico ). La percentuale di identità tra le due sequenze è una funzione del numero di posizioni identiche condivise dalle sequenze.

In una forma di realizzazione preferita, la lunghezza di una sequenza di riferimento allineata ai fini di confronto è almeno il 30%, preferibilmente almeno il 40%, più preferibilmente almeno il 50%, ancor più preferibilmente almeno il 60%, e ancor più preferibilmente almeno il 70%, l'80%, il 90%, il 92%, il 95%, il 97%, il 98% o il 100% della lunghezza della sequenza di riferimento. Per esempio, la sequenza di riferimento può essere la lunghezza della sequenza di dominio variabile dell'immunoglobulina.

Come usato nella presente, il termine "ibrida" in condizioni di bassa stringenza, media stringenza, stringenza elevata o stringenza molto elevata descrive condizioni per ibridazione e lavaggio. Una guida per eseguire reazioni di ibridazione può essere reperita in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y.(1989), 6.3.1-

6.3.6. Metodi acquosi e non acquosi sono descritti in quel riferimento ed entrambi possono essere utilizzati. Condizioni di ibridazione specifiche qui prese in considerazione sono come segue: (1) condizioni di ibridazione di bassa rigidità in 6X cloruro di sodio/citrato di sodio (SSC) a circa 45°C, seguita da due lavaggi in 0,2X SSC, 0,1% di SDS almeno a 50°C (la temperatura dei lavaggi può essere aumentata fino a 55°C per condizioni di bassa rigidità); (2) condizioni di ibridazione di media rigidità in 6X SSC a circa 45°C, seguita da uno o più lavaggi in 0,2X SSC, 0,1% di SDS a 60°C; (3) condizioni di ibridazione di elevata rigidità in 6X SSC a circa 45°C, seguita da uno o più lavaggi in 0,2X SSC, 0,1% di SDS a 65°C; e (4) condizioni di ibridazione di rigidità molto elevata sono 0,5 M di fosfato di sodio, 7% di SDS a 65°C, seguita da uno o più lavaggi a 0,2X SSC, 1% di SDS a 65 °C. Condizioni di rigidità molto elevata (4) sono le condizioni preferite e quelle che devono essere usate, a meno che diversamente specificato. La descrizione include acidi nucleici che ibridano con rigidità bassa, media, alta o molto alta con l'acido nucleico qui descritto o con un suo complemento, per esempio acidi nucleici codificanti per una proteina di legame qui descritta. Gli acidi nucleici possono essere della stessa lunghezza o entro il 30, 20 o 10% della lunghezza dell'acido nucleico di riferimento. L'acido nucleico può corrispondere a una regione codificante una sequenza dominio variabile dell'immunoglobulina qui descritta.

Una "composizione isolata" si riferisce a una composizione che

è rimossa almeno dal 90% di almeno un componente di un campione naturale, da cui la composizione isolata può essere ottenuta. Le composizioni prodotte artificialmente o naturalmente possono essere “composizioni di almeno” un certo grado di purezza, se le specie o popolazione di specie di interesse è almeno per il 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99% pura su base peso-peso.

Come qui usato, il termine “*in vitro*” si riferisce a eventi che si verificano in un ambiente artificiale, per esempio, una provetta di test o un contenitore di reazione, una coltura cellulare, eccetera, invece che all’interno di un organismo multicellulare.

Come qui usato, il termine “*in vivo*” si riferisce a eventi che si verificano all’interno di un organismo multicellulare, come un umano o animale non umano.

Una “composizione isolata” si riferisce a una composizione che è rimossa almeno dal 90% di almeno un componente di un campione naturale, da cui la composizione isolata può essere ottenuta. Le composizioni prodotte artificialmente o naturalmente possono essere “composizioni di almeno” un certo grado di purezza, se le specie o popolazione di specie di interesse è almeno per il 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99% pura su base peso-peso.

Una proteina “isolata” si riferisce a una proteina che è rimossa almeno dal 90% di almeno un componente di un campione naturale, da cui la proteina isolata può essere ottenuta. Le proteine possono essere “di almeno” un certo grado di purezza, se le specie o popolazione di

specie di interesse è almeno per il 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98 o 99% pura su base peso-peso.

Il termine “callicreina” (per esempio, callicreina plasmatica) si riferisce a peptidasi (enzimi che scindono legami peptidici nelle proteine), un sottogruppo della famiglia delle proteasi serina. La callicreina plasmatica scinde il chininogeno per generare chinine, potenti peptidi pro-infiammatori.

Il termine “inibitore della callicreina” si riferisce a qualsiasi agente o molecola che inibisce la callicreina. Per esempio, DX-88 (chiamato anche qui “PEP-1”) è un potente ( $K_i < 1$  nM) e specifico inibitore della callicreina plasmatica (NP\_000883). (Si veda anche, per esempio, WO 95/21601 o WO 2003/103475).

Come qui usato, il termine “DX-2922” è usato interscambiabilmente al termine “X101-A01”. Altre varianti di questo anticorpo sono descritte sotto.

Identificazione dell'anticorpo	Descrizione
X63-G06	Fab reso non germinale scoperto usando ROLIC, stesso HC ma diverso LC di M160-G12
X81-B01	IgG resa germinale prodotta in cellule HEK 293T
X101-A01	IgG resa germinale prodotta in cellule di CHO, stessa sequenza HC e LC di X81-B01
DX-2922	Nomenclatura alternativa per X101-A01

Come qui usato, il termine “DX-2930” è usato

interscambiabilmente al termine “X124-G01”. Altre varianti di questo anticorpo sono descritte sotto.

Identificazione dell'anticorpo	Descrizione
M162-A04	Fab reso non germinale scoperto usando l'esposizione fagica
M199-A08	Fab CDR3 a catena pesante variato derivato da maturazione di affinità di M162-A04
X115-F02	Fab da linea germinale prodotto in cellule 293T, stessa catena pesante variabile di X124-G01
X124-G01 o DX-2930	IgG germinale prodotta in cellule di CHO, sequenza LC e HC di X1 15-F02, a eccezione del fatto che Lys C-terminale di HC è rimossa in X124-G01 (noto anche come DX-2930).

IL termine “modulatore” si riferisce a un polipeptide, acido nucleico, macromolecola, complesso, molecola, piccola molecola, composto, specie o simili (presente in natura o non presente in natura) o un estratto composto da materiali biologici come batteri, piante, funghi o cellule o tessuti animali, che possono essere in grado di causare modulazione. I modulatori possono essere valutati per la potenziale attività di inibitori o attivatori (direttamente o indirettamente) di una proprietà funzionale, attività biologica o processo o loro combinazione (per esempio, agonista, antagonista parziale, agonista parziale, agonista inverso, antagonista, agenti antimicrobici, inibitori

dell'infezione o proliferazione microbica e simili) mediante inclusione nei saggi. In tali saggi possono essere analizzati molti modulatori contemporaneamente. L'attività di un modulatore può essere nota, non nota o parzialmente nota.

Un residuo amminoacidico "non essenziale" è un residuo che può essere alterato dalla sequenza wild-type di un agente legante, per es., l'anticorpo, senza abolire o più preferibilmente, senza alterare sostanzialmente l'attività biologica, mentre cambiare un residuo amminoacidico "essenziale" genera una perdita sostanziale di attività.

Un "paziente", "soggetto" o "ospite" (questi termini sono usati in maniera interscambiabile) da trattare con il metodo in oggetto può significare un umano o un animale non umano. In alcune forme di realizzazione, un soggetto si sospetta essere a rischio di o soffrire di un disturbo mediato dalla callicreina, per esempio un disturbo mediato dalla bradichinina, per esempio un angioedema ereditario (HAE). In alcune forme di realizzazione, un soggetto è a rischio di o soffre di angioedema idiopatico non istamina-dipendente, artrite reumatoide, malattia di Crohn, colite ulcerosa, lupus, morbo di Alzheimer, shock settico, ustione, ischemia cerebrale, danno da riperfusione, edema cerebrale, retinopatia diabetica, nefropatia diabetica, edema maculare, vasculite, trombosi arteriosa o venosa, trombosi associata a dispositivi di assistenza ventricolare o stent, trombocitopenia indotta da eparina con trombosi, malattia tromboembolica e malattia coronarica con angina pectoris instabile, edema, malattia oculare, gotta, malattia

intestinale, mucosite orale, dolore neuropatico, dolore infiammatorio, stenosi spinale-malattia spinale degenerativa, ileo post-operatorio, aneurisma aortico, osteoartrite, angioedema ereditario, embolia polmonare, ictus, trauma cranico o edema cerebrale peri-tumorale, sepsi, evento ischemico (ictus) acuto dell'arteria cerebrale media (MCA), restenosi (per esempio, dopo angioplastica), nefrite da lupus eritematoso sistemico, una malattia autoimmune, una malattia infiammatoria, una malattia cardiovascolare, una malattia neurologica, una malattia associata al misfolding delle proteine, una malattia associata all'angiogenesi, nefropatia ipertensiva e nefropatia diabetica, malattie allergiche e respiratorie (per esempio, anafilassi, asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva, sindrome da distress respiratorio acuto, fibrosi cistica, rinite persistente) e lesioni tissutali (per esempio, bruciature o lesioni chimiche).

I termini "precallicreina" e "callicreina preplasmatica" sono qui usati in maniera interscambiabile e si riferiscono alla forma zimogena della callicreina plasmatica attiva, che è nota anche come precallicreina.

Il termine "prevenendo" o "prevenire" una malattia in un soggetto si riferisce a sottoporre il soggetto a un trattamento farmaceutico, per esempio la somministrazione di un farmaco, in modo che almeno un sintomo della malattia sia prevenuto, vale a dire, somministrato prima della manifestazione clinica della condizione indesiderata (per esempio, malattia o altro stato indesiderato

dell'animale ospite), in modo che protegga l'ospite contro lo sviluppo della condizione indesiderata. "Prevenire" una malattia può essere chiamato anche "profilassi" o "trattamento profilattico".

Come qui usato, il termine "sostanzialmente identico" (o "sostanzialmente omologo") è qui usato per riferirsi a un primo amminoacido o sequenza di acido nucleico che contiene un numero sufficiente di residui amminoacidici o nucleotidi (per esempio, con una catena laterale simile, per esempio sostituzioni amminoacidiche conservate) identici o equivalenti a un secondo amminoacido o seconda sequenza amminoacidica tale che il primo e il secondo amminoacido o sequenza di acidi nucleici abbia (o proteine codificanti abbiano) attività simili, per esempio un'attività di legame, una preferenza di legame o un'attività biologica. Nel caso degli anticorpi, il secondo anticorpo ha la stessa specificità e ha almeno il 50%, almeno il 25% o almeno il 10% di affinità relativa allo stesso antigene.

Sequenze simili o omologhe (ad esempio, almeno circa l'85% di identità di sequenza) alle sequenze divulgate nel presente documento sono anche parte di questa domanda. In alcune forme di realizzazione, l'identità di sequenza può essere circa l'85%, il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superiore.

Inoltre, l'identità sostanziale esiste quando i segmenti di acido nucleico si ibridano in condizioni di ibridazione selettive (ad esempio, condizioni di ibridazione altamente stringenti), al complemento del filamento. Gli acidi nucleici possono essere presenti in cellule intere, in

un lisato cellulare, o in una forma parzialmente purificata o sostanzialmente pura.

Sequenze del motivo per biopolimeri possono includere posizioni che possono essere amminoacidi variati. Per esempio, il simbolo "X" in un tale contesto si riferisce generalmente a qualsiasi amminoacido (per esempio, uno qualsiasi dei venti amminoacidi naturali) salvo se diversamente specificato, per esempio, per riferirsi a qualsiasi amminoacido non cisteinico. Altri amminoacidi ammessi possono essere indicati anche, per esempio, usando parentesi e slash. Per esempio, "(A/W/F/N/Q)" significa che alanina, triptofano, fenilalanina, asparagina e glutammina sono ammessi in quella posizione particolare.

La significatività statistica può essere determinata con qualsiasi metodo noto nella tecnica. Test statistici esemplificativi includono: il test T di Student, test U non parametrico di Mann Whitney e test statistico non parametrico di Wilcoxon. Alcune relazioni statisticamente significative mostrano un valore P inferiore a 0,05 o 0,02. I termini "indurre", "inibire", "potenziare", "elevare", "aumentare", "diminuire" o simili, ad esempio, che denotano differenze qualitative o quantitative distinguibili tra due stati, possono riferirsi a una differenza, per esempio una differenza statisticamente significativa, tra due stati.

Come qui usato, un "campione" si riferisce a una composizione che comprende un tessuto, per esempio sangue, plasma o proteina, da un soggetto. Un campione include sia un campione iniziale non

processato prelevato da un soggetto sia uno successivamente processato, per esempio forme parzialmente purificate o conservate. Campioni esemplificativi includono sangue, plasma, lacrime o muco. In alcune forme di realizzazione, il campione è un campione di sangue o plasma.

Un “dosaggio terapeuticamente efficace” modula preferibilmente un parametro misurabile, per esempio, l’attività della callicreina plasmatica, con un grado statisticamente significativo o almeno del 20%, più preferibilmente almeno del 40%, ancora più preferibilmente almeno del 60% e ancora più preferibilmente almeno dell’80% circa rispetto a soggetti non trattati. La capacità di un composto di modulare un parametro misurabile, per esempio un parametro associato alla malattia, può essere valutata in un sistema di modello animale predittivo di efficacia nei disturbi e nelle condizioni umane. In alternativa, questa proprietà di una composizione può essere valutata esaminando la capacità del composto di modulare un parametro in vitro.

“Trattare” una malattia (o condizione) in un soggetto o “trattare” un soggetto avente una malattia si riferisce a sottoporre il soggetto a un trattamento farmaceutico, per esempio la somministrazione di un farmaco, in modo che almeno un sintomo della malattia sia curato, alleviato o ridotto.

Il termine “prevenire” una malattia in un soggetto si riferisce a sottoporre il soggetto a un trattamento farmaceutico, per esempio la

somministrazione di un farmaco, in modo che almeno un sintomo della malattia sia prevenuto, vale a dire, somministrato prima della manifestazione clinica della condizione indesiderata (per esempio, malattia o altro stato indesiderato dell'animale ospite), in modo che protegga l'ospite contro lo sviluppo della condizione indesiderata. "Prevenire" una malattia può essere chiamato anche "profilassi" o "trattamento profilattico".

Una "quantità profilatticamente efficace" si riferisce a una quantità efficace, a dosaggi e per periodi di tempo necessari, per raggiungere il desiderato risultato profilattico. Tipicamente, poiché una dose profilattica è usata in soggetti prima o in una fase precoce della malattia, una quantità profilatticamente efficace sarà inferiore alla quantità terapeuticamente efficace.

Le intestazioni, incluse le intestazioni alfabetiche o numeriche, sono unicamente per facilitare la comprensione e lettura e, in mancanza di una chiara indicazione del contrario, non impongono un ordine temporale o una gerarchia preferenziale.

### **Rilevazione di HMWK scisso e intatto**

La callicreina plasmatica circola come zimogeno inattivo chiamato precallicreina, che è principalmente legato al proprio substrato, il chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK). In risposta a uno stimolo, FXII è attivato in FXIIa. FXIIa scinde precallicreina per formare callicreina plasmatica attiva (Figura 1). Approssimativamente il 75-90% della precallicreina circolante è legata a HMWK mediante

un'interazione al sito non attivo con dominio 6 di HMWK. pKal attiva libera e legata a HMWK generano HMWK scisso e bradichinina. I biomarcatori dell'attivazione della callicreina plasmatica sono mostrati nella Tabella 2. L'idoneità di un biomarcatore può essere dimostrata seguendo i suoi livelli in presenza e assenza di un attacco acuto di HAE. I livelli di questi biomarcatori possono essere alterati anche durante un attacco di edema mediato da bradichinina o altra malattia mediata da attività di pKal. Si veda la Tabella 2.

**Tabella 2. Biomarcatori associati a KMA**

La Tabella 2 fornisce marcatori che possono essere valutati con i metodi descritti nella Tabella 2 e altrove nel presente, per valutare soggetti per i disturbi mediati da pKal e da bradichinina. La Tabella 2 indica la direzione nel cambiamento del livello del marcatore associato ai disturbi mediati da pKal o bradichinina.				
<b>Biomarcato</b>	<b>Saggi</b>	<b>Livello basale nei pazienti con HAE rispetto ai pazienti sani</b>	<b><math>\Delta</math> dovuta ad attivazione e da contatto</b>	<b>Commenti</b>

HMWK intatto	ELISA, Western blot	Immodificato	Diminuzione	Sono disponibili test per misurare il chininogeno intatto usando APTT con plasma privo di chininogeno o saggi immunologici:  <a href="http://www.diapharma.com/downloads/68201025811.pdf">www.diapharma.com/downloads/68201025811.pdf</a>
-----------------	------------------------	--------------	-------------	---

<p>HMWK scisso</p>	<p>ELISA, Western blot</p>	<p>Aumentata</p>	<p>Aumentata</p>	<p>Il chininogeno scisso può aumentare fino a ~47% il chininogeno totale durante un attacco di HAE. - Il chininogeno scisso è alto anche durante la sepsi, la cirrosi. I saggi possono usare a) un anticorpo che è specifico per il chininogeno scisso rispetto a chininogeno intatto; o b) un formato di saggio in grado di separare e quantificare il chininogeno scisso e intatto (per esempio, Western blot). Questo saggio non è sensibile all'anticorpo anti-pKal circolante e non dipende dal fatto che la pKal attivo legato alla superficie cellulare sia il principale colpevole dell'angioedema localizzato mediato da bradichinina.</p>
			<p>55</p>	

La presente descrizione si basa su, almeno in parte, la scoperta per cui un valore di una forma specifica di HMWK (per esempio, la percentuale di HMWK scisso) in un campione di un paziente si correla ad alcune malattie mediate da pKal (per esempio, HAE) e malattie autoimmuni (per esempio, RA, UC e malattia di Crohn). Pertanto, un valore (per esempio, percentuale) di HMWK scisso, HMWK intatto o entrambi può essere usato come biomarcatore per identificare soggetti aventi o a rischio di tali malattie, per identificare un disturbo che è verosimilmente suscettibile di trattamento con un inibitore di pKal e per valutare l'efficacia di un trattamento della malattia che preveda uno o più inibitori di pKal.

### **Reagente di rilevazione**

In alcune forme di realizzazione, un reagente di rilevazione (per esempio, un anticorpo) che lega specificamente (preferibilmente) una forma di HMWK rispetto all'altra forma di HMWK può essere usato nei metodi del saggio qui descritto, per determinare il livello di HMWK scisso in un campione, che può essere un campione biologico (per esempio, un campione di sangue o un campione di plasma) da un paziente candidato. In un esempio, il reagente di rilevamento è un anticorpo che lega specificamente il HMWK scisso rispetto al HMWK intatto. In un altro esempio, il reagente di rilevamento è un anticorpo che lega specificamente il HMWK intatto rispetto alla forma scissa. In alternativa o in aggiunta, l'anticorpo lega specificamente il C-terminale della catena leggera di HMWK scisso. Tale anticorpo può essere usato

per distinguere HMWK da LMWK perché LMWK non contiene il frammento C-terminale della catena leggera di HMWK scisso a causa dello splicing alternativo.

Un reagente di rilevazione che "lega specificamente" un antigene o un epitopo è un termine ben compreso nell'arte, e i metodi per determinare tale legame specifico sono anche ben noti nell'arte. Un reagente di rilevazione come un anticorpo è detto mostrare un "legame specifico" se reagisce o si associa più frequentemente, più rapidamente, con maggiore durata e/o con maggiore affinità con un particolare antigene bersaglio rispetto a bersagli alternativi. Un reagente di rilevazione "lega specificamente" un antigene bersaglio (per esempio, HMWK scisso) o suo epitopo se si lega con maggiore affinità, avidità, più facilmente e/o con una durata maggiore con cui si lega ad altre sostanze (per esempio, HMWK intatto). Per esempio, un anticorpo che lega specificamente (o preferibilmente) un antigene (per esempio, HMWK scisso o il C-terminale della catena leggera di HMWK scisso) o un epitopo antigenico in esso è un anticorpo che lega questo antigene bersaglio con maggiore affinità, avidità, più facilmente e/o con maggiore durata rispetto a quanto legghi altri antigeni (per esempio, HMWK intatto) o altri epitopi nello stesso antigene. Si comprende anche leggendo questa definizione che, per esempio, un anticorpo che si lega specificamente a un primo antigene bersaglio può legarsi o meno in modo specifico o preferibile a un secondo antigene bersaglio. Pertanto, "si lega specificamente" o "si lega preferibilmente" non richiedono

necessariamente (sebbene possa includere) un legame esclusivo. In generale, ma non necessariamente, il riferimento al legame significa un legame preferenziale. In alcuni esempi, un anticorpo che “lega specificamente” un antigene bersaglio o un suo epitopo può non legare altri antigeni o altri epitopi nello stesso antigene.

In alcune forme di realizzazione, un anticorpo per l'uso nei metodi del saggio qui descritti ha un'affinità di legame adatta per un antigene bersaglio o epitopo antigenico (per esempio, chininogeno scisso, HMWK intatto o C-terminale della catena leggera del chininogeno scisso). Come qui usato, “affinità di legame” si riferisce alla costante di associazione apparente o  $K_a$ .  $K_a$  è il reciproco della costante di dissociazione ( $K_d$ ). L'anticorpo qui descritto può avere un'affinità di legame ( $K_D$ ) di almeno  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-10}$  M, o inferiore. Un'aumentata affinità di legame corrisponde a un  $K_D$  ridotto. Il legame a più elevata affinità di un anticorpo con un primo antigene rispetto a un secondo antigene può essere indicato da un  $K_a$  maggiore (o un valore numerico inferiore di  $K_d$ ) per il legame al primo antigene rispetto a  $K_a$  (o valore numerico di  $K_d$ ) per il legame al secondo antigene. In tali casi, l'anticorpo ha specificità per il primo antigene rispetto al secondo antigene. Le differenze nell'affinità di legame (per esempio, per specificità o altri confronti) possono essere almeno pari a 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10.000 o  $10^5$  volte.

Come qui usato, il termine “anticorpo” si riferisce a una proteina che include almeno un dominio variabile dell'immunoglobulina o

sequenza del dominio variabile dell'immunoglobulina. Per esempio, un anticorpo può includere una regione variabile a catena pesante (H) (abbreviata nel presente documento come VH), e una regione variabile a catena leggera (L) (abbreviata nel presente documento come VL). In un altro esempio, un anticorpo include due regioni variabili a catena pesante (H) e due regioni variabili a catena leggera (L). Il termine "anticorpo" racchiude frammenti di anticorpi leganti l'antigene (per es., anticorpi a catena singola, frammenti Fab e sFab, F(ab')<sub>2</sub>, frammenti Fd, frammenti Fv, scFv, e frammenti di anticorpi di dominio (dAb) (de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39.)) come anche anticorpi completi. Un anticorpo può avere le caratteristiche strutturali di IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (nonché loro sottotipi). Gli anticorpi possono derivare da qualsiasi fonte, ma sono preferiti il primate (primate umano e non umano) e il primatizzato.

Le regioni VH e VL possono essere ulteriormente suddivise in regioni di ipervariabilità, dette "regioni che determinano la complementarità" ("CDR"), inframezzate a regioni che sono più conservate, dette "regioni cornice" ("FR"). L'estensione della regione cornice e di CDR è stata definita precisamente (vedere, Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edizione, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Pubblicazione N. 91-3242, e Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, si veda anche [www.hgmp.mrc.ac.uk](http://www.hgmp.mrc.ac.uk)). Nel presente sono usate le definizioni di Kabat. Ciascuna VH e VL è tipicamente composta

da tre CDR e quattro FR, disposte dal terminale amminico al terminale carbossilico nel seguente ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La catena VH o VL dell'anticorpo può inoltre includere tutta o una parte della regione costante di una catena pesante o leggera, così da formare una catena di immunoglobulina pesante o leggera, rispettivamente. In una forma di realizzazione, l'anticorpo è un tetramero di due catene pesanti di immunoglobulina e due catene leggere di immunoglobulina, in cui le catene di immunoglobulina pesanti e leggere sono interconnesse da, ad esempio, ponti disolfuro. Nelle IgG, la regione costante della catena pesante include tre domini dell'immunoglobulina, CH1, CH2 e CH3. La regione costante della catena leggera include un dominio CL. La regione variabile delle catene pesanti e leggere contiene un dominio di legame che interagisce con un antigene. Le regioni costanti degli anticorpi tipicamente mediano il legame dell'anticorpo ai tessuti o fattori dell'ospite, incluse varie cellule del sistema immunitario (ad esempio, cellule effettrici) e il primo componente (C1q) del sistema del complemento classico. Le catene leggere dell'immunoglobulina possono essere di tipo kappa o lambda. In una forma di realizzazione, l'anticorpo è glicosilato. Un anticorpo può essere funzionale per la citotossicità anticorpo-dipendente e/o citotossicità complemento-mediata.

Una o più regioni di un anticorpo possono essere umane o efficacemente umane. Per esempio, una o più delle regioni variabili

possono essere umane o efficacemente umane. Per esempio, una o più delle CDR possono essere umane, per esempio, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, e LC CDR3. Ciascuna delle CDR della catena leggera possono essere umane. HC CDR3 può essere umana. Una o più delle regioni cornice possono essere umane, per esempio FR1, FR2, FR3 e FR4 di HC o LC. Per esempio, la regione Fc può essere umana. In una forma di realizzazione, tutte le regioni cornice sono umane, per esempio hanno una sequenza di una cornice di un anticorpo prodotto da una cellula somatica umana, per esempio, una cellula ematopoietica che produce immunoglobuline o una cellula non ematopoietica. In una forma di realizzazione, le sequenze umane sono sequenze germinali, per esempio codificate da un acido nucleico germinale. In una forma di realizzazione, i residui della cornice (FR) di un Fab selezionato possono essere convertiti nel tipo amminoacidico del residuo corrispondente nel gene germinale di primato più simile, in particolare il gene germinale umano. Una o più delle regioni costanti possono essere umane o efficacemente umane. Per esempio, almeno il 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98, o 100% di un dominio variabile dell'immunoglobulina, la regione costante, i domini costanti (CH1, CH2, CH3, CL1), o l'intero anticorpo possono essere umani o efficacemente umani.

Tutto o parte di un anticorpo può essere codificato da un gene immunoglobulinico o da un suo segmento. I geni dell'immunoglobulina umana esemplari includono i geni della regione costante kappa,

lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, epsilon e mu, così come molti geni della regione variabile dell'immunoglobulina. Le "catene leggere" di immunoglobulina di intera lunghezza (circa 25 KDa o circa 214 amminoacidi) sono codificate da un gene della regione variabile al NH<sub>2</sub>-terminale (circa 110 amminoacidi) e da un gene della regione costante kappa o lambda al COOH-terminale. Le "catene pesanti" di immunoglobulina di intera lunghezza (circa 50 KDa o circa 446 amminoacidi), sono analogamente codificate da un gene della regione variabile (circa 116 amminoacidi) e da uno degli altri suddetti geni della regione costante, ad esempio, gamma (che codifica circa 330 amminoacidi). La lunghezza di HC umana varia considerevolmente perché HC CDR3 varia da circa 3 residui amminoacidici a oltre 35 residui amminoacidici.

Il termine "frammento legante l'antigene" di un anticorpo a lunghezza intera si riferisce ad uno o più frammenti di un anticorpo di intera lunghezza che mantengono la capacità di legarsi in modo specifico a un bersaglio di interesse. Esempi di frammenti leganti compresi nel termine "frammento legante l'antigene" di un anticorpo a lunghezza intera includono (i) un frammento Fab, un frammento monovalente costituito dai domini VL, VH, CL e CH<sub>1</sub>; (ii) un frammento F(ab')<sub>2</sub>, un frammento bivalente che include due frammenti Fab legati da un ponte disolfuro nella regione cerniera; (iii) un frammento Fd costituito dai domini VH e CH<sub>1</sub>; (iv) un frammento Fv costituito dai domini VL e VH di un singolo braccio di un anticorpo, (v) un frammento

dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), che è costituito da un dominio VH; e (vi) una regione determinante la complementarità isolata (CDR). Inoltre, sebbene i due domini del frammento Fv, VL e VH, siano codificati da geni separati, possono essere uniti, usando metodi ricombinanti, da un linker sintetico che consente loro di essere realizzati come una catena a singola proteina nella quale le regioni VL e VH si accoppiano per formare molecole monovalenti note come Fv a catena singola (scFv). Si vedano, per esempio, brevetti degli Stati Uniti 5.260.203, 4.946.778, e 4.881.175; Bird et al. (1988) Science 242:423-426; e Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

Frammenti anticorpali possono essere ottenuti usando qualsiasi tecnica adeguata, incluse tecniche convenzionali note al tecnico del ramo. Il termine “anticorpo monospecifico” si riferisce a un anticorpo che mostra una singola specificità e affinità di legame per un bersaglio particolare, per esempio un epitopo. Questo termine include un “anticorpo monoclonale” o una “composizione di anticorpo monoclonale” che, come qui usato, si riferisce a una preparazione di anticorpi o loro frammenti di composizione molecolare singolare, indipendentemente da come sia stato generato l’anticorpo.

Come qui usato, una regione variabile dell’immunoglobulina “umanizzata” si riferisce a una regione variabile dell’immunoglobulina che è modificata per includere un numero sufficiente di posizioni amminoacidiche della cornice umana in modo che la regione variabile dell’immunoglobulina non stimoli una risposta immunogena in un

umano sano. Descrizioni di immunoglobuline “umanizzate” includono, per esempio, brevetto degli Stati Uniti 6.407.213 e Stati Uniti 5.693.762.

La costante di inibizione ( $K_i$ ) fornisce una misura della potenza inibitoria; si tratta della concentrazione di inibitore necessaria per ridurre di metà l'attività enzimatica e non dipende dalle concentrazioni enzimatiche o del substrato. La  $K_i$  apparente ( $K_{i,app}$ ) si ottiene a concentrazioni diverse di substrato, misurando l'effetto inibitorio di concentrazioni differenti di inibitore (per esempio, proteina di legame inibitoria) sull'ampiezza della reazione (per esempio, attività enzimatica); l'inserimento del cambiamento con una costante di velocità di pseudo prim'ordine come funzione della concentrazione di inibitore nell'equazione di Morrison (Equazione 1) produce una stima del valore  $K_i$  apparente. La  $K_i$  si ottiene dall'intercetta  $y$  estratta mediante analisi di regressione lineare di un diagramma di  $K_{i,app}$  rispetto alla concentrazione di substrato.

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

Equation 1

“Equation” = Equazione

Dove  $v$  = velocità misurata;  $v_o$  = velocità in assenza di inibitore;  $K_{i,app}$  = costante apparente di inibizione;  $I$  = concentrazione totale di inibitore e  $E$  = concentrazione totale di enzima.

In alcune forme di realizzazione, il reagente di rilevazione come qui descritto può essere coniugato a un marcatore rilevabile e il legame del reagente di rilevazione all'antigene di interesse (per esempio,

HMWK scisso e HMWK intatto) può essere determinato in base all'intensità del segnale emesso dal marcatore rilevabile. In alternativa è possibile usare un anticorpo secondario specifico del reagente di rilevazione. Uno o più anticorpi possono essere accoppiati a un marcatore di rilevazione. Qualsiasi marcatore idoneo come è noto nell'arte può essere usato nei metodi di saggio qui descritti. In alcune forme di realizzazione, un marcatore rilevabile comprende un fluoroforo. Come qui usato, il termine "fluoroforo" (chiamato anche "marcatore fluorescente" o "colorante fluorescente") si riferisce a porzioni funzionali che assorbono l'energia luminosa a una lunghezza d'onda di eccitazione definita ed emettono energia luminosa a una lunghezza d'onda diversa. In alcune forme di realizzazione, una porzione funzionale di rilevazione è o comprende un enzima. In alcune forme di realizzazione, un enzima è un enzima (per esempio,  $\beta$ -galattosidasi) che produce un prodotto colorato da un substrato incolore.

### **Chininogeno a elevato peso molecolare**

Il chininogeno a elevato peso molecolare (HMWK) esiste nel plasma come proteina multidominio (1-6 domini) del polipeptide singolo (catena singola) con un peso molecolare di approssimativamente 110 kDa (FIG. 4). HMWK è scisso da pKal entro il dominio 4 per rilasciare una bradichinina proinfiammatoria di 9 amminoacidi e una forma a catena doppia di HMWK (chininogeno scisso). Le due catene di HMWK sono la catena pesante, che contiene i domini 1-3 di HMWK e la catena leggera, che contiene i domini 5 e 6 di HMWK. Le catene pesante e

leggera hanno un peso molecolare approssimativamente di 56 e 46 chilo Dalton, rispettivamente. Figura 4.

### **HMWK intatto**

IL chininogeno ad alto peso molecolare intatto (HMWK), chiamato anche qui “chininogeno intatto”, può essere saggiato, per esempio, usando metodi basati su coagulante o metodi immunologici, per esempio dosaggio radioimmunologico (si veda, per esempio, Kerbiriou-Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2):2734-86). È noto un anticorpo monoclonale della catena leggera di HMWK umano. Si veda, per esempio, Reddigari, S.R. & Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74:695-702. Può anche essere usato un saggio per HMWK, che si basa sul substrato cromogenico. Si veda, per esempio, Scott, C.F. et al. Thromb Res, 1987, 48(6):685-700; Gallimore, M.J. et al.. Thromb. Res, 2004, 114(2):91-96.

Il gene umano codificante per HMWK è chininogeno 1 (KNG1). KNG1 è trascritto e in alternativa sottoposto a splicing per formare RNA che codificano HMWK o chininogeno a basso peso molecolare (LMWK). Una sequenza proteica esemplificativa di HMWK è fornita di seguito:

>gi|156231037|ref|NP\_001095886.1| precursore dell'isoforma di chininogeno-1 [Homo sapiens]

MKLITILFLCSRLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNQFVLYRITEATKTVGSDT  
FYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQY  
DCLGCVHPDISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSEK  
FLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPKICVGCPRDIPTNSPELEE  
TLHTITKLNAENNATFFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKGQSLD  
CNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSFPRSSRIGEIKEETTVPSPHTSMAPAQDEERDSG  
KEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGKHERDQGHGHRGHLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDLEHQQGHV  
LDHGKHKHGHGKHKHKNKGGKNGKNGKTEHLASSESTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTF  
SDFQSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPIQIDPNGLSFNPI SDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQ  
MKESYYFDLTDGLS (SEQ ID NO: 1)

### **HMWK scisso**

Il chininogeno ad alto peso molecolare scisso (HMWK), chiamato anche qui “chininogeno scisso”, può essere valutato, per esempio, usando metodi descritti negli Esempi 1 e da 3 a 7, per esempio Western blot. In alcune forme di realizzazione può essere valutata la catena leggera di HMWK scisso. Possono essere usati anticorpi che legano HMWK scisso, come anticorpi che legano la catena leggera di HMWK scisso (per esempio, un epitopo comprendente residuo di C-terminale). Un esempio è il clone 11H05 di mAb murino. Inoltre, HMWK scisso può essere valutato usando spettrometria di massa. Tecniche di immunoblotting per valutare i livelli di HMWK scisso sono note nella tecnica. Si veda, per esempio, Buhler R. et al. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(3):223-232.

Sequenze esemplificative delle catene pesante e leggera di chininogeno scisso sono fornite di seguito.

#### **> catena pesante di chininogeno-1 scisso**

QESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNQSNQFVLYRITEATKTVGSDTFYSFKYEI  
KEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTA  
QYDCLGCVHPDISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRIT  
YSIVQTNCSEKFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQ  
PPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLHTITKLNAENNATFFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYF  
IDFVARETTCSKESNEELTESCETKKGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISL  
MK (SEQ ID NO: 2)

#### **> catena leggera di chininogeno-1 scisso**

SSRIGEIKEETTVPSPHTSMAFAQDEERDSGKEQGHTRRHWDGHEKQRKHNLGHGKHER  
DQGHGHRGHGLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDDLHQGGHVLHDGKHKKHGHGKHKNK  
GKKNKGKHNWKTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLI  
ATMMPPI SPAPIQSDDDWI PDIQIDPNGLSEFNPISEFPDITTS PKCPGRPWKSVSEINPTT  
QMKESYYFDLTDGLS (SEQ ID NO: 3)

### **Formato del saggio**

I valori (per esempio, le quantità o i livelli assoluti o le quantità o i livelli relativi come le percentuali) di biomarcatori qui descritti, o modifiche dei valori dei biomarcatori qui descritti, possono essere valutati usando saggi qui descritti e/o saggi noti nella tecnica. In alcune forme di realizzazione, la percentuale di chininogeno scisso in un campione da un soggetto è usata in qualsiasi dei metodi qui descritti.

I saggi che possono essere usati per valutare i livelli di biomarcatori includono, per esempio, dosaggio saggi immunologici, per esempio Western blot, saggio immuno-assorbente legato a un enzima (ELISA) (per esempio, ELISA a sandwich), dosaggi radioimmunologici, saggi di rilevazione basati su elettrochemiluminescenza e tecniche correlate. Gli approcci basati su spettrometria di massa possono anche essere usati. Saggi che si basano sul substrato cromogenico possono anche essere impiegati. Saggi, per esempio saggi Western blot, possono inoltre prevedere l'uso di un sistema di imaging quantitativo, per esempio tecnologia di imaging LICOR, che è disponibile in commercio (si veda, per esempio, il sistema di imaging a infrarossi Odyssey® CLx da LI-COR Biosciences). In alcune forme di realizzazione è usato saggio di rilevazione in elettrochemiluminescenza o un saggio che si basa su una combinazione di elettrochemiluminescenza e tecnologie di patterned array (per esempio,

un saggio tecnologico ECL o MULTI-ARRAY da Meso Scale Discovery [MSD]).

Come qui usati, i termini “misurare” o “misurazione” o in alternativa “rilevare” o “rilevazione” significano valutare la presenza, assenza, quantità (che può essere una quantità efficace) di una sostanza all'interno di un campione, inclusa la derivazione di livelli di concentrazione qualitativi o quantitativi di tali sostanze o altrimenti valutare i valori o la categorizzazione di un soggetto.

In alcune forme di realizzazione, i saggi forniti possono essere eseguiti su piattaforme ad alto rendimento. In alcune forme di realizzazione possono essere usate piastre multipozzetto, per esempio piastre con 24-, 48-, 96-, 384- o più pozzetti, per saggi a elevato rendimento. Saggi individuali possono essere eseguiti in ciascun pozzetto in parallelo. pertanto, è generalmente auspicabile usare un lettore di piastre per misurare pozzetti multipli in parallelo, per aumentare la resa del saggio. In alcune forme di realizzazione, i lettori di piastre che sono in grado di scansionare pozzetti multipli (per esempio, 4, 16, 24, 48, 96, 384 o più pozzetti) in parallelo possono essere usati per questa piattaforma. Per esempio può essere usato un lettore di piastre disponibile in commercio (per esempio, il sistema plate::vision disponibile da Perkin Elmer, Waltham, MA). Questo lettore di piastre è in grado di eseguire un'analisi di fluorescenza basa sulla cinetica. Il sistema plate::vision ha un sistema di trasmissione a fibre ottiche per la raccolta ad alta efficienza e ha un sistema di trasmissione

a fibre ottiche ideato per l'analisi di 96 pozzetti in parallelo. Lettori di piastre in parallelo adatti aggiuntivi includono, ma non sono limitati a, SAFIRE (Tecan, San Jose, CA), FLIPRTETRA® (Molecular Devices, Union City, CA), FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ), e CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA). In alcune forme di realizzazione, i saggi di screening ad alta resa dell'invenzione sono automatizzati (per esempio, atti a saggi robotici).

### **Kit**

La presente descrizione fornisce anche kit per l'uso nella valutazione di chininogeno scisso e/o intatto in campioni contenenti tali, per esempio, campioni biologici da pazienti umani. Tali kit comprendono un reagente di rilevazione che lega specificamente il chininogeno scisso o il chininogeno intatto, rispetto all'altra forma e, facoltativamente, chininogeno scisso e/o intatto come controlli. In alcune forme di realizzazione, i kit comprendono anche anticorpi secondari e/o reagenti per la rilevazione del legame tra reagente di rilevazione e chininogeno scisso e/o intatto.

In alcune forme di realizzazione, il kit può comprendere istruzioni per l'uso secondo uno qualsiasi dei metodi descritti nella presente. Le istruzioni incluse possono comprendere una descrizione di come usare i componenti contenuti nel kit per misurare il livello di chininogeno scisso e/o intatto in un campione, che può essere un campione biologico raccolto da un paziente umano.

Le istruzioni relative all'uso del kit includono generalmente

informazioni riguardanti la quantità di ciascun componente e condizioni adatte per eseguire i metodi del saggio qui descritti. I componenti del kit possono essere in dosi unitarie, confezioni sfuse (ad esempio, confezioni multidose) o dosi in subunità. Le istruzioni fornite nei kit della descrizione sono in genere istruzioni scritte su un'etichetta o su un foglietto illustrativo (ad esempio, un foglio di carta incluso nel kit), ma sono anche accettabili istruzioni leggibili a macchina (ad esempio, istruzioni trasportate su un disco magnetico o ottico).

L'etichetta o il foglietto illustrativo indicano che il kir è usato per valutare il livello di chininogeno scisso e/o intatto. Possono essere fornite istruzioni per implementare uno qualsiasi dei metodi descritti nella presente.

I kit di questa descrizione sono in un imballaggio adeguato. Imballaggi adeguati includono, ma non sono limitati a fiale, flaconi, barattoli, imballaggi flessibili (ad esempio, sacchetti Mylar o di plastica sigillati) e simili. Sono anche contemplati pacchetti per l'uso in combinazione con un dispositivo specifico, come un inalatore, un dispositivo di somministrazione nasale (ad esempio un atomizzatore) o un dispositivo di infusione come una minipompa. Un kit può avere un'apertura di accesso sterile (ad esempio il contenitore può essere una sacca per soluzione endovenosa o una fiala avente un tappo perforabile da un ago per iniezione ipodermica). Il contenitore può anche avere un'apertura di accesso sterile (ad esempio il contenitore può essere una sacca o una fiala per soluzione endovenosa avente un

tappo perforabile da un ago per iniezione ipodermica).

I kit possono facoltativamente fornire componenti aggiuntivi come tamponi e informazioni interpretative. Normalmente, il kit comprende un contenitore e un'etichetta o uno o più foglietti illustrativi sul o associati al contenitore. In alcune forme di realizzazione, la presente descrizione fornisce articoli di fabbricazione comprendenti il contenuto dei kit descritti sopra.

### **Applicazione dei metodi del saggio alla diagnosi e prognosi della malattia**

I metodi del saggio e i kit qui descritti possono essere applicati alla valutazione della malattia, per esempio diagnosi o prognosi di una malattia. La valutazione può includere identificare un soggetto come a rischio di o avente una malattia come qui descritto, per esempio un disturbo mediato da pKal, come HAE e una malattia autoimmune, come RA, UC e malattia di Crohn. La valutazione può includere anche monitorare il trattamento di una malattia, come valutare l'efficacia di un trattamento per un disturbo mediato da pKal, come HAE. Inoltre, la valutazione può includere identificare una malattia che può essere trattata con un inibitore di pKal.

#### **A. Diagnosi**

In alcune forme di realizzazione, i metodi del saggio e i kit sono eseguiti per determinare il livello di chininogeno scisso e/o intatto in un campione biologico (per esempio, un campione di sangue o un campione di plasma) raccolto da un soggetto candidato (per esempio,

un paziente umano che si sospetti avere un disturbo mediato da pKal come HAE o una malattia autoimmune, come RA, UC o malattia di Crohn). Il livello di chininogeno scisso può essere confrontato con il chininogeno intatto o la quantità totale di chininogeno nel campione per determinare un valore (per esempio, percentuale) di chininogeno scisso, un valore di chininogeno intatto o entrambi, nel campione. Il valore del chininogeno scisso e/o intatto può essere raffrontato a un valore di riferimento per determinare se il soggetto ha o è a rischio di disturbo mediato da pKal, per esempio HAE o una malattia autoimmune, come RA, UC o malattia di Crohn. Per esempio, se la percentuale di chininogeno scisso è uguale o superiore a un numero di riferimento, il soggetto può essere identificato come avente o a rischio di disturbo mediato da pKal come HAE, RA, UC o malattia di Crohn. In alternativa, se la percentuale di chininogeno intatto è uguale o inferiore a un numero di riferimento, il soggetto può essere identificato come avente o a rischio di disturbo mediato da pKal come HAE, RA, UC o malattia di Crohn.

Il valore di riferimento può essere un livello di controllo di percentuale di chininogeno scisso. In alcune forme di realizzazione, il livello di controllo è la percentuale di chininogeno scisso in un campione di controllo, come un campione (per esempio, campione di sangue o plasma) ottenuto da un soggetto sano o popolazione di soggetti sani, che sono preferibilmente della stessa specie del soggetto candidato. Come qui usato, un soggetto sano è un soggetto che è apparentemente

privo della malattia bersaglio (per esempio, un disturbo mediato da pKa1 come HAE o malattie autoimmuni come RA, US e malattia di Crohn) al momento della misurazione del livello di chininogeno scisso e/o intatto o che non ha un'anamnesi della malattia.

Il livello di controllo può essere anche un livello predeterminato. Un tale livello predeterminato può rappresentare la percentuale di chininogeno scisso in una popolazione di soggetti che non hanno o non sono a rischio della malattia bersaglio. Può rappresentare anche la percentuale di chininogeno scisso in una popolazione di soggetti che hanno la malattia bersaglio.

Il livello predeterminato può assumere una varietà di forme. Per esempio, può essere un singolo valore di cut-off, ad esempio mediano o medio. In alcune forme di realizzazione, un tale livello predeterminato può essere stabilito sulla base di gruppi comparativi, per cui un gruppo definito è noto per avere una malattia bersaglio e un altro gruppo definito è noto per non avere la malattia bersaglio. In alternativa, il livello predeterminato può essere un intervallo, per esempio, un intervallo rappresentante le percentuali di chininogeno scisso in una popolazione di controllo all'interno di un percentile predeterminato.

Il livello di controllo come qui descritto può essere determinato mediante tecnologia di routine. In alcuni esempi, il livello di controllo può essere ottenuto eseguendo un metodo convenzionale (per esempio, lo stesso saggio per ottenere il livello di chininogeno scisso e/o intatto in un campione di test, come qui descritto) su un campione di

controllo, come ugualmente qui descritto. In altri esempi, i livelli di chininogeno scisso e/o intatto possono essere ottenuti da membri di una popolazione di controllo e i risultati possono essere analizzati mediante, per esempio, un programma computazionale, per ottenere il livello di controllo (un livello predeterminato) che rappresenti il livello di chininogeno scisso e/o intatto nella popolazione di controllo.

Confrontando la percentuale di chininogeno scisso in un campione ottenuto da un soggetto candidato con il valore di riferimento come qui descritto, si può determinare se il soggetto candidato ha o è a rischio di malattia mediata da pKal (per esempio HAE o una malattia autoimmune come RA, UC e malattia di Crohn). Per esempio, se la percentuale di chininogeno scisso in un campione del soggetto candidato devia dal valore di riferimento (per esempio, aumentato rispetto al valore di riferimento), il soggetto candidato può essere identificato per avere o essere a rischio della malattia. Se il valore di riferimento rappresenta l'intervallo di percentuale di chininogeno scisso in una popolazione di soggetti che hanno la malattia bersaglio, la percentuale di chininogeno scisso in un campione di un candidato che rientra nell'intervallo indica che il soggetto candidato ha o è a rischio della malattia bersaglio.

Come qui usato, "un livello elevato o un livello al di sopra del valore di riferimento" significa che il livello/la percentuale di chininogeno scisso è maggiore di un valore di riferimento, come una soglia predeterminata di un livello/una percentuale di chininogeno scisso in un

campione di controllo. I livelli di controllo sono descritti nel presente in dettaglio. Una percentuale elevata di chininogeno scisso include una percentuale di chininogeno scisso che è, per esempio, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o più al di sopra di un valore di riferimento. Una percentuale elevata di chininogeno scisso include anche l'aumento di un fenomeno da uno stato zero (per esempio, nessuno o non rilevabile chininogeno scisso e/o intatto che lega un reagente di cattura in un campione) a uno stato non zero (per esempio, una certa quantità di o un chininogeno scisso e/o intatto rilevabile).

Come qui usato, "una percentuale/un livello ridotto o una percentuale/un livello al di sotto di un valore di riferimento" significa che la percentuale/il livello di chininogeno scisso è inferiore a un valore di riferimento, come una soglia predeterminata di un chininogeno scisso in un campione di controllo. I livelli di controllo sono descritti nel presente in dettaglio. Un livello ridotto di chininogeno scisso include un chininogeno scisso che è, per esempio, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o più al di sotto di un valore di riferimento. Un livello ridotto di chininogeno scisso che lega un reagente di cattura può includere anche la riduzione di un fenomeno da uno stato non zero (per esempio, una certa quantità di o un chininogeno scisso e/o intatto rilevabile) a uno stato zero (per esempio, nessuno o non rilevabile chininogeno scisso e/o intatto che lega un reagente di cattura in un campione).

In alcune forme di realizzazione, il soggetto candidato è un paziente umano avente un sintomo di un disturbo pKal-mediato, come HAE o una malattia autoimmune come RA, UC e malattia di Crohn. Per esempio, il soggetto ha edema, tumefazione in cui detta tumefazione è completamente o principalmente periferica; orticaria; rossore, dolore e tumefazione in assenza di evidenza di infezione; edema non istamino-mediato, attacchi ricorrenti di tumefazione o una loro combinazione. In altre forme di realizzazione, il soggetto è privo di sintomi di disturbo mediato da pKal al momento del prelievo del campione, senza anamnesi di sintomi di un disturbo mediato da pKal o senza anamnesi di un disturbo mediato da pKal, come HAE. In ancora altre forme di realizzazione, il soggetto è resistente a una terapia antistaminica, terapia con corticosteroidi o entrambi.

#### **(i) HAE**

In alcune forme di realizzazione, la malattia o condizione che coinvolge l'attività della callicreina plasmatica è angioedema ereditario (HAE). L'angioedema ereditario (HAE) è noto anche come "edema di Quincke", carenza di C1 esterasi-inibitore, carenza di C1-inibitore ed edema angioneurotico ereditario (HANE). HAE è caratterizzato da episodi ricorrenti di tumefazione grave (angioedema), che possono colpire, per esempio, le estremità, la faccia, i genitali, il tratto gastrointestinale e le vie respiratorie. I sintomi di HAE includono, per esempio, tumefazione delle braccia, gambe, labbra, occhi, lingua e/o gola; blocco delle vie respiratorie che può coinvolgere tumefazione

della gola e improvvisa raucedine, episodi ripetuti di crampi addominali senza causa evidente, e/o tumefazione dell'intestino, che può essere grave e che può portare a crampi addominali, vomito, disidratazione, diarrea, dolore e/o shock. Circa un terzo degli individui che soffrono di HAE durante un attacco sviluppa eritema, chiamato eritema marginato.

La tumefazione delle vie aeree può essere potenzialmente letale e causare morte in alcuni pazienti. I tassi di mortalità sono stimati essere 15-33%. HAE porta a circa 15.000-30.000 accessi in pronto soccorso all'anno.

Il trauma o lo stress, per esempio, procedure ortodontiche, malattia (per esempio, malattie virali come raffreddori e influenza), mestruazioni e interventi chirurgici possono scatenare un attacco di angioedema. Per prevenire gli attacchi acuti di HAE, i pazienti possono provare a evitare stimoli specifici che hanno precedentemente causato attacchi. In molti casi, tuttavia, un attacco può verificarsi senza uno stimolo scatenante noto. Tipicamente, i sintomi di HAE appaiono per la prima volta da bambini e peggiorano durante la pubertà. In media, gli individui non trattati hanno un attacco ogni 1-2 settimane e la maggior parte degli episodi dura circa 3-4 giorni ([ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema](http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)). La frequenza e la durata degli attacchi variano ampiamente tra le persone con angioedema ereditario, anche tra le persone nella stessa famiglia.

Esistono tre tipi di HAE, noti come tipo I, II e III. Si stima che HAE colpisca 1 persona su 50.000, che il tipo I rappresenti circa l'85

percento dei casi, il tipo II circa il 15 percento dei casi e il tipo III sia molto raro. Il tipo III è l'ultima forma descritta e in origine si pensava si verificasse solo nelle donne, ma sono state identificate famiglie in cui sono stati colpiti i maschi.

HAE viene ereditato in forma autosomica dominante, per cui una persona affetta può ereditare la mutazione da un genitore affetto. Possono verificarsi anche nuove mutazioni nel gene e, pertanto, HAE può verificarsi in persone prive di un'anamnesi del disturbo familiare. Si stima che il 20-25% dei casi derivi da una nuova mutazione spontanea.

Mutazioni nel gene SERPING1 causano angioedema ereditario di tipo I e tipo II. Il gene SERPING1 fornisce istruzioni per la produzione della proteina del C1-inibitore, che è importante per il controllo dell'infiammazione. Il C1-inibitore blocca l'attività di certe proteine che promuovono l'infiammazione. Le mutazioni che causano angioedema ereditario di tipo I portano a livelli ridotti di C1-inibitore nel sangue. Al contrario, le mutazioni che causano il tipo II causano la produzione di un C1-inibitore che funziona in maniera anomala. Senza i livelli adeguati di C1-inibitore funzionale vengono generate quantità eccessive di bradichinina. La bradichinina promuove l'infiammazione aumentando la fuoriuscita di fluido attraverso le pareti dei vasi sanguigni nei tessuti corporei. L'eccessivo accumulo di fluidi nei tessuti corporei causa gli episodi di tumefazione visti negli individui con angioedema ereditario di tipo I e tipo II.

Le mutazioni nel gene F12 sono associate ad alcuni casi di angioedema ereditario di tipo III. Il gene F12 fornisce istruzioni per la produzione di fattore XII della coagulazione. Oltre a ricoprire un ruolo fondamentale nella coagulazione del sangue (coagulazione), il fattore XII è anche un importante stimolante dell'infiammazione ed è coinvolto nella produzione di bradichinina. Certe mutazioni nel gene F12 risultano nella produzione del fattore XI con aumentata attività. Come risultato viene generata più bradichinina e le pareti dei vasi sanguigni diventano più permeabili, cosa che porta a episodi di tumefazione. La causa di altri casi di angioedema ereditario di tipo III rimane ignota. Mutazioni in uno o più geni non ancora identificati può essere responsabile del disturbo in molti casi.

HAE può presentarsi simile ad altre forme di angioedema derivante da allergie o altre condizioni mediche, ma differisce fortemente nella causa e nel trattamento. Se l'angioedema ereditario viene erroneamente diagnosticato come allergia, viene trattato generalmente con antistaminici, steroidi e/o epinefrina, che sono tipicamente inefficaci nell'HAE, sebbene l'epinefrina possa essere usata nelle reazioni potenzialmente letali. Diagnosi erranee hanno anche portato a interventi chirurgici esplorativi inutili nei pazienti con tumefazione addominale e in alcuni pazienti con HAE il dolore addominale è stato erroneamente diagnosticato come psicosomatico.

I sintomi di HAE possono essere valutati, per esempio, usando questionari, per esempio questionari completati da pazienti, medici o

membri della famiglia. Tali questionari sono noti nella tecnica e includono, per esempio, scale visuo-analogiche. Si veda, per esempio, McMillan, C.V. et al. *Patient*. 2012;5(2):113-26.

**(ii) Artrite reumatoide**

L'artrite reumatoide (RA) è una malattia autoimmune infiammatoria cronica che causa tumefazione delle articolazioni e dolore e generalmente causa distruzione delle articolazioni. La RA segue generalmente un decorso recidivante/remittente, con "acuzie" dell'attività patologica intervallate da remissioni dei sintomi della malattia. La RA è associata a una serie di disturbi infiammatori aggiuntivi, inclusi la sindrome di Sjogren (secchezza di occhi e bocca causata da infiammazione delle ghiandole lacrimali e salivari), pleurite (infiammazione della pleura che causa dolore alla respirazione profonda e durante gli attacchi di tosse), noduli reumatoidi (siti nodulari di infiammazione che si sviluppano nei polmoni), pericardite (infiammazione del pericardio che causa dolore in posizione supina o nello sporgersi in avanti), sindrome di Felty (splenomegalia e leucopenia osservate in combinazione a RA, rendendo il soggetto incline alle infezioni) e vasculite (un'infiammazione dei vasi sanguigni che può bloccare il flusso ematico). La callicreina plasmatica è stata implicata nell'artrite reumatoide.

I sintomi di RA attiva includono affaticamento, mancanza di appetito, febbre bassa, dolori muscolari e articolari e rigidità. La rigidità muscolare e articolare è generalmente più osservabile al mattino e

dopo periodo di inattività. Durante le acuzie, le articolazioni diventano spesso rosse, gonfie, doloranti e ipersensibili, generalmente come conseguenza di sinovite.

Il trattamento dell'artrite reumatoide prevede una combinazione di farmaci, riposo, esercizi di rinforzo delle articolazioni e protezione delle articolazioni. Sono usate due classi di farmaci nel trattamento dell'artrite reumatoide: "farmaci di prima linea" antinfiammatori e "farmaci antireumatici modificanti la malattia" (DMARD, Disease-Modifying Antirheumatic Drug). I farmaci di prima linea includono FANS (per esempio, aspirina, naproxene, ibuprofene ed etodolac) e cortisone (corticosteroidi). DMARD, come oro (per esempio, sali d'oro, aurotioglucosio, aurotiomalato, oro per bocca) metotrexato, sulfasalazina, D-penicillina, azatioprina, ciclofosfamide, clorambucile e ciclosporina, leflunomide, etanercept, infliximab, anakinra e adalimumab e idrossiclorochina, promuovono la remissione della malattia e prevengono la progressiva distruzione articolare, ma non sono agenti antinfiammatori.

Scale utili per valutare la RA e i sintomi di RA includono, per esempio, la Rheumatoid Arthritis Severity Scale (RASS; Bardwell et al., (2002) *Rheumatology* 41(1):38-45), il SF-36 Arthritis Specific Health Index (ASHI; Ware et al., (1999) *Med. Care.* 37(5 Suppl):MS40-50), la Arthritis Impact Measurement Scale o Arthritis Impact Measurement Scale 2 (AIMS or AIMS2; Meenan et al. (1992) *Arthritis Rheum.* 35(1):1-10); lo Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ), HAQII, o

HAQ modificato (si veda, per esempio, Pincus et al. (1983) *Arthritis Rheum.* 26(11):1346-53).

**(iii) Malattia intestinale - Malattia di Crohn e colite ulcerosa**

La malattia infiammatoria intestinale (IBD) è un gruppo di condizioni infiammatorie dell'intestino crasso e, in alcuni casi, dell'intestino tenue. Le forme principali di IBD sono la malattia di Crohn e la colite ulcerosa (UC). Altre forme di IBD sono responsabili di molti meno casi: colite collagenosica, colite linfocitica, colite ischemica, colite da diversione, sindrome di Behçet, colite infettiva e colite indeterminata. La differenza principale tra malattia di Crohn e UC è la posizione e la natura delle alterazioni infiammatorie. La malattia di Crohn può colpire qualsiasi parte del tratto gastrointestinale, dalla bocca all'ano (lesioni ad acciottolato), sebbene una maggioranza dei casi inizi nell'ileo terminale. La colite ulcerosa, al contrario, è limitata al colon e al retto. Dal punto di vista microscopico, la colite ulcerosa è limitata alla mucosa (pareti epiteliali dell'intestino) mentre la malattia di Crohn colpisce l'intera parete intestinale. Infine, la malattia di Crohn e la colite ulcerosa presentano manifestazioni extra-intestinali (come problemi epatici, artrite, manifestazioni cutanee e problemi oculari) in diverse percentuali.

I sintomi della IBD includono dolore addominale, vomito, diarrea, ematochezia, calo ponderale, aumento ponderale e vari disturbi o malattie associati (artrite, pioderma cancrenoso, colangite primaria sclerosante). La diagnosi è generalmente per colonscopia con biopsia delle lesioni patologiche.

Il trattamento della IBD, in base al livello di gravità, può richiedere l'immunosoppressione per controllare i sintomi. Possono essere usati immunosoppressori come azatioprine, metotrexato o 6-mercaptopurina. Più generalmente, il trattamento della IBD richiede una forma di mesalamina. Spesso sono usati steroidi per controllare le acuzie della malattia e una volta erano accettabili come farmaci di mantenimento. I farmaci biologici, come infliximab, sono stati usati per trattare pazienti con malattia di Crohn o colite ulcerosa. Casi gravi possono richiedere l'intervento chirurgico, come resezione intestinale, stenoplastica o una colostomia o ileostomia temporanea o permanente. Trattamenti farmacologici alternativi per la IBD esistono in varie forme, tuttavia tali metodi si concentrano sul controllo della patologia sottostante al fine di evitare prolungata esposizione agli steroidi o l'escissione chirurgica. Generalmente il trattamento inizia con la somministrazione di farmaci, come prednisone, con elevati effetti antinfiammatori. Dopo avere controllato con successo l'infiammazione, il paziente passa normalmente a un farmaco più blando, come asacolo, una mesalamina, per mantenere la malattia in remissione. In caso di insuccesso, può o meno essere somministrata una combinazione dei suddetti farmaci immunosoppressori con una mesalamina (che può avere anche un effetto antinfiammatoria), a seconda del paziente.

***(iv) Altri disturbi mediati da pKal o da bradichinina***

Altre malattie o condizioni esemplificative associate all'attività della callicreina plasmatica includono, angioedema idiopatico non

istamina-dipendente, artrite reumatoide, malattia di Crohn, colite ulcerosa, lupus, morbo di Alzheimer, shock settico, ustione, ischemia cerebrale, danno da riperfusione, edema cerebrale, retinopatia diabetica, nefropatia diabetica, edema maculare, vasculite, trombosi arteriosa o venosa, trombosi associata a dispositivi di assistenza ventricolare o stent, trombocitopenia indotta da eparina con trombosi, malattia tromboembolica e malattia coronarica con angina pectoris instabile, edema, malattia oculare, gotta, malattia intestinale, mucosite orale, dolore neuropatico, dolore infiammatorio, stenosi spinale-malattia spinale degenerativa, ileo post-operatorio, aneurisma aortico, osteoartrite, angioedema ereditario, embolia polmonare, ictus, trauma cranico o edema cerebrale peri-tumorale, sepsi, evento ischemico (ictus) acuto dell'arteria cerebrale media (MCA), restenosi (per esempio, dopo angioplastica), nefrite da lupus eritematoso sistemico, una malattia autoimmune, una malattia infiammatoria, una malattia cardiovascolare, una malattia neurologica, una malattia associata al misfolding delle proteine, una malattia associata all'angiogenesi, nefropatia ipertensiva e nefropatia diabetica, malattie allergiche e respiratorie (per esempio, anafilassi, asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva, sindrome da distress respiratorio acuto, fibrosi cistica, rinite persistente) e lesioni tissutali (per esempio, bruciature o lesioni chimiche).

Un soggetto che è stato identificato per avere o essere a rischio di un disturbo mediato da pKal come qui descritto può essere

sottoposto a un trattamento adatto, come quelli qui descritti.

### **B. Valutare l'efficacia del trattamento**

I metodi del saggio qui descritti possono essere applicati anche per valutare l'efficacia di un trattamento per un disturbo mediato da pKal (per esempio, HAE). Per esempio, campioni biologici multipli (per esempio, campioni di sangue o plasma) possono essere raccolti da un soggetto che viene sottoposto a un trattamento prima e dopo il trattamento o durante il corso del trattamento. I livelli di chininogeno scisso e/o intatto possono essere misurati mediante qualsiasi dei metodi di saggio qui descritti e i valori (per esempio, le percentuali) di chininogeno scisso e/o intatto possono essere determinati di conseguenza. Se la percentuale di chininogeno scisso si riduce dopo il trattamento o durante il corso del trattamento (la percentuale di chininogeno scisso in un campione raccolto successivamente rispetto a quella di un campione raccolto in precedenza) o se la percentuale di chininogeno intatto aumenta dopo il trattamento o durante il corso del trattamento, questo indica che il trattamento è efficace. In alcuni esempi, il trattamento prevede un agente terapeutico, come un agente legante la callicreina come qui descritto, un antagonista del recettore B2 della bradichinina come qui descritto o un agente di sostituzione di C1-INH come qui descritto. Esempi degli agenti terapeutici includono, ma non sono limitati a, DX-2930 o DX88.

Se il soggetto è identificato come non responsivo al trattamento, una dose e/o una frequenza di dosaggio maggiore

dell'agente terapeutico sono somministrati al soggetto identificato. In alcune forme di realizzazione, il dosaggio o la frequenza di dosaggio dell'agente terapeutico viene mantenuto, ridotto o interrotto in un soggetto identificato come responsivo al trattamento o che non abbia bisogno di ulteriore trattamento. In alternativa, un trattamento diverso può essere applicato al soggetto che viene scoperto essere non responsivo al primo trattamento.

### **Identificazione dei disturbi suscettibili al trattamento con inibitori di pKal**

I valori di chininogeno scisso e/o intatto possono essere anche usati per identificare un disturbo che può essere trattabile con un inibitore di pKal. Per mettere in pratica questo metodo, il livello di chininogeno scisso e/o il livello di chininogeno intatto in un campione raccolto da un soggetto (per esempio, un campione di sangue o un campione di plasma) avente la malattia bersaglio può essere misurato mediante un saggio adatto, per esempio quelli qui descritti, come un saggio Western blot. I valori come le percentuali di chininogeno scisso e/o intatto possono essere determinati come qui descritto. I valori di chininogeno scisso e/o intatto possono essere raffrontati con un valore di riferimento come qui descritto. Se il valore del chininogeno scisso/intatto devia dal valore di riferimento (per esempio, è aumentato o ridotto), questo indica che un inibitore di pKal può essere efficace nel trattare la malattia. Per esempio, se le percentuali di chininogeno scisso sono diminuite dopo il trattamento o durante il corso del trattamento, il

trattamento può essere identificato come efficace. In alternativa, se le percentuali di chininogeno intatto sono aumentate dopo il trattamento o durante il corso del trattamento, il trattamento è identificato come efficace.

In alcune forme di realizzazione, il livello di chininogeno scisso e/o intatto può essere misurato usando un reagente di rilevazione (per esempio, un anticorpo) che lega specificamente il chininogeno scisso o il chininogeno intatto, rispetto all'altra forma di chininogeno. In alcuni esempi, l'anticorpo lega specificamente il chininogeno scisso rispetto al chininogeno intatto. In altri esempi, l'anticorpo lega specificamente il C-terminale della catena leggera di chininogeno scisso.

Se la malattia è identificata come suscettibile (che può essere trattata con) a un inibitore di pKal, il metodo può comprendere inoltre somministrare al soggetto avente la malattia una quantità efficace di un inibitore di pKal, per esempio DX-88, EPIKAL-2 o DX-2930.

### **Trattamento**

Un soggetto a rischio di (per esempio, avente) un disturbo mediato da pKal o da bradichinina, come identificato mediante uno qualsiasi dei metodi qui descritti, può essere trattato con qualsiasi agente terapeutico adeguato. In alcune forme di realizzazione, i metodi forniti includono selezionare un trattamento per un soggetto in base alla resa di un saggio fornito, per esempio una rilevazione di biomarcatori.

In alcune forme di realizzazione, il metodo comprende uno o entrambi tra selezionare o somministrare un agente terapeutico, per

esempio un agente legante la callicreina come qui descritto, per esempio un antagonista del recettore B2 della bradichinina come qui descritto, per esempio un agente di sostituzione di C1-INH come qui descritto, per la somministrazione al soggetto in base alla resa del saggio, per esempio una rilevazione di biomarcatori.

In alcune forme di realizzazione, una proteina di legame alla callicreina plasmatica o un polipeptide è somministrata a un soggetto. In alcune forme di realizzazione, l'agente legante la callicreina è un inibitore della callicreina, per esempio un peptide, un inibitore di piccole molecole, un anticorpo della callicreina o un suo frammento. In alcune forme di realizzazione, un antagonista del recettore B2 della bradichinina è somministrato a un soggetto. In alcune forme di realizzazione, un agente terapeutico di sostituzione di C1-INH è somministrato a un soggetto.

L'agente terapeutico, per esempio l'inibitore della callicreina, per esempio un antagonista del recettore B2 della bradichinina, per esempio un agente di sostituzione di C1-INH, può essere somministrato assieme a un'altra terapia come parte di una politerapia per il trattamento della malattia o della condizione che coinvolge la callicreina plasmatica e/o l'attività della bradichinina. La politerapia, per esempio con uno o più inibitori della callicreina, l'antagonista del recettore B2 della bradichinina o l'agente di sostituzione di C1-INH, per esempio con uno o più inibitori della callicreina, antagonista del recettore B2 della bradichinina o l'agente di sostituzione di C1-INH e altra terapia, può

essere fornita in diverse configurazioni multiple. Il primo agente può essere somministrato prima o dopo la somministrazione dell'altra terapia. In alcune situazioni, il primo agente e un'altra terapia (per esempio, un agente terapeutico) sono somministrati contemporaneamente, o temporalmente vicini (per esempio, un breve intervallo di tempo tra le iniezioni, come durante la stessa sessione di trattamento). Il primo agente e l'altra terapia possono essere anche somministrati con intervalli temporali maggiori.

### **Agenti leganti la callicreina plasmatica**

Gli agenti leganti la callicreina plasmatica (per esempio, proteine di legame, per esempio polipeptidi, per esempio polipeptidi inibitori, per esempio anticorpi, per esempio anticorpi inibitori o altri agenti leganti, per esempio piccole molecole) sono agenti terapeutici utili per una varietà di malattie e condizioni, per esempio malattie e condizioni che coinvolgono l'attività della callicreina plasmatica. Per esempio, in alcune forme di realizzazione, la malattia o condizione che coinvolge l'attività della callicreina plasmatica è angioedema ereditario (HAE). In alcune forme di realizzazione, una proteina di legame alla callicreina plasmatica o un polipeptide è somministrata a un soggetto a rischio o colpito da un disturbo mediato da pKal o da bradichinina.

Una serie di utili inibitori proteici della callicreina, callicreina tissutale e/o plasmatica, includono il dominio Kunitz. Come qui usato, un "dominio Kunitz" è un dominio polipeptidico avente almeno 51 amminoacidi e contenente almeno due e preferibilmente tre disolfuri. Il

dominio è ripiegato in modo che la prima e la sesta cisteina, la seconda e la quarta e la terza e la quinta cisteina formino ponti disolfuro (per esempio, in un dominio Kunitz avente 58 amminoacidi, le cisteine possono essere presenti in posizioni corrispondenti agli amminoacidi 5, 14, 30, 38, 51 e 55, secondo il numero delle sequenze omologhe BPTI fornite di seguito, e ponti disolfuro si possono formare tra le cisteine alle posizioni 5 e 55, 14 e 38 e 30 e 51) o, se sono presenti due ponti disolfuro, possono formarsi tra una sottoserie corrispondente di loro cisteine. Lo spazio tra cisteine rispettive può trovarsi entro 7, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 amminoacidi del seguente spazio tra posizioni corrispondenti a: da 5 a 55, da 14 a 38 e da 30 a 51, secondo la numerazione della sequenza BPTI fornita di seguito. La sequenza BPTI può essere usata come riferimento per riferirsi a posizioni specifiche in qualsiasi dominio Kunitz. Il confronto tra un dominio Kunitz di interesse e BPTI può avvenire identificando il migliore allineamento in cui il numero di cisteine allineate è massimizzato.

La struttura 3D (ad alta risoluzione) del dominio Kunitz di BPTI è nota. Una delle strutture a raggi X è depositata nella banca dati delle proteine Brookhaven come "6PTI". La struttura 3D di alcuni omologhi di BPTI (Eigenbrot et al., (1990) *Protein Engineering*, 3(7):591-598; Hynes et al., (1990) *Biochemistry*, 29:10018-10022) è nota. Sono note almeno ottantuno sequenze del dominio Kunitz. Omologhi umani noti includono i domini Kunitz di LACI, noto anche come inibitore della via del fattore tissutale (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) due domini Kunitz dell'inibitore di inter- $\alpha$ -tripsina, APP-I (Kido et al., (1988) J. Biol. Chem., 263(34):18104-18107), un dominio Kunitz da collagene, tre domini Kunitz di TFPI-2 (Sprecher et al., (1994) PNAS USA, 91:3353-3357), i domini Kunitz dell'inibitore dell'attivatore del fattore di crescita degli epatociti di tipo 1, i domini Kunitz dell'inibitore dell'attivatore del fattore di crescita degli epatociti di tipo 2, i domini Kunitz descritti nel brevetto degli Stati Uniti pubblicazione n.: 2004-0152633. LACI è una fosfoglicoproteina sierica umana con un peso molecolare di 39 kDa (sequenza amminoacidica nella Tabella 1) contenente tre domini Kunitz.

**Tabella 1: Domini Kunitz naturali esemplificativi**

LACI: (SEQ ID N. 4)	<pre> 1  MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedehtiit dtelppklM 51  HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC 101 KKMCTRDnan riikttlqge kpdfCfleed <u>pgiCrgyitr yfynnqtkgC</u> 151 erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn gfqvdnygtq lnavnsltp 201 qstkvpslfe <b>fhgppswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC</b> 251 <b>ggnennftsk qeClraCkkg</b> fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm </pre>
	La sequenza di segnale (1-28) è in maiuscolo e sottolineato
	LACI-K1 (50-107) è in maiuscolo
	LACI-K2 (121-178) è sottolineato
	LACI-K3 (211-270) è in grassetto
BPTI (SEQ ID N.:5)	<pre> 1 2 3 4 5 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA </pre>

I domini Kunitz precedenti sono chiamati LACI-K1 (residuo da 50 a 107), LACI-K2 (residuo da 121 a 178), e LACI-K3 (da 213 a 270). La sequenza di cDNA di LACI è riportata in Wun et al. (J. Biol. Chem., 1988, 263(13):6001-6004). Girard et al. (Nature, 1989, 338:518-20) riferisce studi mutazionali in cui i residui PI di ciascuno dei tre domini Kunitz sono stati alterati. LACI-K1 inibisce il fattore VIIa (F.VIIa) quando F.VIIa è complessato a fattore tissutale e LACI-K2 inibisce il fattore Xa.

Proteine contenenti domini Kunitz esemplificativi includono le seguenti, con numeri di accesso SWISS-PROT in parentesi:

A4\_HUMAN (P05067), A4\_MACFA (P53601), A4\_MACMU (P29216),  
A4\_MOUSE (P12023), A4\_RAT (P08592), A4\_SAISC (Q95241),  
AMBP\_PLEPL (P36992), APP2\_HUMAN (Q06481),  
APP2\_RAT (P15943),  
AXP1\_ANTAF (P81547), AXP2\_ANTAF (P81548),  
BPT1\_BOVIN (P00974),  
BPT2\_BOVIN (P04815), CA17\_HUMAN (Q02388),  
CA36\_CHICK (P15989),  
CA36\_HUMAN (P12111), CRPT\_BOOMI (P81162),  
ELAC\_MACEU (062845),  
ELAC\_TRIVU (Q29143), EPPI\_HUMAN (095925),  
EPPI\_MOUSE (Q9DA01),  
HTIB\_MANSE (P26227), IBP\_CARCR (P00993), IBPC\_BOVIN

(P00976),  
IBPI\_TACTR (P16044), IBPS\_BOVIN (P00975), ICS3\_BOMMO  
(P07481),  
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 (043278),    SPT1\_MOUSE (Q9R097),  
SPT2\_HUMAN (043291),  
    SPT2\_MOUSE (Q9WU03),    TFP2\_HUMAN (P48307),  
TFP2\_MOUSE (035536),  
    TFPI\_HUMAN (P10646),    TFPI\_MACMU (Q28864),  
TFPI\_MOUSE (054819),  
    TFPI\_RABIT (P19761), TFPI\_RAT (Q02445), YN81\_CAEEL  
(Q03610)

Una varietà di metodi può essere usata per identificare un dominio Kunitz da una banca dati di sequenze. Per esempio, una sequenza amminoacidica nota di un dominio Kunitz, una sequenza consenso o un motivo (per esempio, il motivo ProSite) possono essere ricercati rispetto alle banche dati di sequenza GenBank (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda MD), per esempio usando BLAST; rispetto alla banca dati Pfam di HMM (Hidden Markov Models) (per esempio, usando parametri di default per la ricerca con Pfam; rispetto alla banca dati SMART o

rispetto alla banca dati ProDom. Per esempio, il numero di accesso a Pfam PF00014 della release 9 di Pfam fornisce numerosi domini Kunitz e un HMM per identificare domini Kunitz. Una descrizione della banca dati Pfam si può trovare in Sonhammer et al. (1997) *Proteins* 28(3):405-420 e una descrizione dettagliata di HMM si può trovare, per esempio, in 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; e Stultz et al. (1993) *Protein Sci.* 2:305-314. La banca dati SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE) di HMM come descritto in Schultz et al. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857 e Schultz et al. (2000) *Nucl. Acids Res.* 28:231. La banca dati SMART contiene domini identificati dal profiling con i modelli nascosti di Markov del programma di ricerca HMMer2 (R. Durbin et al. (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). La banca dati è anche annotata e monitorata. La banca dati di domini proteici ProDom è costituita da una compilazione automatica di domini omologhi (Corpet et al. (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). Versioni attuali di ProDom sono costruite usando ricerche ricorrenti PSI-BLAST (Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Gouzy et al. (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340.) delle banche dati proteiche SWISS-PROT 38 e TREMBL. La banca dati genera automaticamente una sequenza consenso per ciascun dominio. Prosite riporta un elenco dei domini Kunitz come motivo e identifica le proteine

che includono un dominio Kunitz. Si veda, per esempio, Falquet et al. *Nucleic Acids Res.* 30:235-238(2002).

I domini Kunitz interagiscono con proteasi bersaglio usando, principalmente, amminoacidi in due regioni di loop (“loop di legame”). La prima regione di loop è tra residui corrispondenti agli amminoacidi 13-20 di BPTI. La seconda regione di loop è tra residui corrispondenti agli amminoacidi 31-39 di BPTI. Una libreria esemplificativa dei domini Kunitz varia una o più posizioni amminoacidiche nella prima e/o nella seconda regione di loop. Posizioni particolarmente utili da variare, quando si effettua lo screening dei domini Kunitz che interagiscono con callicreina o quando si selezionano varianti di affinità migliorate, includono: posizioni 13, 15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 e 39 relativamente alla sequenza BPTI. Si prevede che almeno una di queste porzioni sia a stretto contatto con la proteasi bersaglio. È anche utile variare altre posizioni, per esempio posizioni che sono adiacenti alle summenzionate posizioni nella struttura tridimensionale.

La “regione cornice” di un dominio Kunitz è definita come quei residui che sono parte del dominio Kunitz, ma che escludono specificamente residui nella prima e nella seconda regione di loop di legame, vale a dire residui corrispondenti agli amminoacidi 13-20 di BPTI e 31-39 di BPTI. Al contrario, residui che non sono nel loop di legame possono tollerare una gamma più ampia di sostituzione amminoacidica (per esempio, sostituzioni conservative e/o non conservative).

In una forma di realizzazione, questi domini Kunitz sono forme varianti della struttura di loop che include il dominio Kunitz 1 della proteina inibitore della coagulazione associata alla lipoproteina umana (LACI). LACI contiene tre strutture peptidiche di loop interne e ben definite che sono un paradigma dei domini Kunitz (Girard, T. et al., 1989. Nature, 338:518-520). Le varianti del dominio Kunitz 1 di LACI qui descritte sono state analizzate, isolate e legano callicreina con aumentata affinità e specificità (si veda, per esempio, il brevetto degli Stati Uniti n. 5.795.865 e 6.057.287). Questi metodi possono essere applicati anche ad altre cornici dominio Kunitz per ottenere altri domini Kunitz che interagiscono con callicreina, per esempio callicreina plasmatica. Modulatore utile della funzione della callicreina legano e/o inibiscono tipicamente callicreina, come determinato usando legame alla callicreina e saggi di inibizione.

In alcuni aspetti, un agente legante la callicreina (per esempio, proteina di legame, per esempio polipeptide, per esempio polipeptidi inibitori, per esempio anticorpo, per esempio anticorpo inibitorio o altri agenti leganti, per esempio piccole molecole) lega la forma attiva alla callicreina plasmatica. In alcune forme di realizzazione, l'agente legante la callicreina, lega e inibisce la callicreina plasmatica, per esempio callicreina plasmatica umana e/o callicreina murina.

Le proteine leganti la callicreina plasmatica possono essere a lunghezza intera (per esempio, una IgG [per esempi, una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4], IgM, IgA [per esempio, IgA1, IgA2], IgD, e IgE) o possono

includere solo un frammento legante l'antigene (per esempio, un Fab, F(ab')<sub>2</sub> o frammento scFv). La proteina legante può includere due immunoglobuline a catena pesante e due immunoglobuline a catena leggera o può essere un anticorpo a catena singola. Le proteine di legame alla callicreina plasmatica possono essere proteine ricombinanti come anticorpi umanizzati, innestati in una CDR, chimerici, deimmunizzati o generati *in vitro* e possono includere facoltativamente regioni costanti derivate da sequenze immunoglobuliniche germinali umane. In una forma di realizzazione, la proteina legante la callicreina plasmatica è un anticorpo monoclonale.

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante la callicreina lega e inibisce callicreina plasmatica, per esempio callicreina plasmatica umana e/o callicreina murina. Proteine leganti la callicreina plasmatica esemplificative sono descritte nella pubblicazione degli Stati Uniti n. 20120201756. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante la callicreina è un anticorpo (per esempio un anticorpo umano) avente le catene leggera e/o pesante degli anticorpi selezionata dal gruppo costituito da M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (also referred to herein as 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 (chiamato anche qui DX-2930), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 e M35-G04. In alcune forme di realizzazione, la proteina legante la callicreina plasmatica compete con o lega lo stesso epitopo di M162-

A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (chiamato anche qui 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 (chiamato anche qui DX-2930), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 e M35-G04. In alcune forme di realizzazione, la proteina di legame alla callicreina plasmatica è DX-2930.

Le sequenze della regione variabile a catena pesante e catena leggera di DX-2930 sono fornite di seguito.

**DX-2930 Regione variabile a catena pesante:**

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRF

TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVSS (SEQ ID NO:

6)

**DX-2930 Regione variabile a catena leggera:**

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSG

TEFTLTISSSLQPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEI (SEQ ID NO: 7)

In alcuni aspetti, un polipeptide legante la callicreina (per esempio, un polipeptide inibitorio) che lega la forma attiva alla callicreina plasmatica. Agenti della callicreina plasmatica del polipeptide esemplificativi sono descritti nel brevetto degli Stati Uniti n. 5.795.865, brevetto degli Stati Uniti n. 5.994.125, brevetto degli Stati Uniti n. 6.057.287, brevetto degli Stati Uniti n. 6.333.402, brevetto degli Stati Uniti n. 7.628.983, e brevetto degli Stati Uniti n. 8.283.321, brevetto degli Stati Uniti n. 7.064.107, brevetto degli Stati Uniti n. 7.276.480, brevetto degli Stati Uniti n. 7.851.442, brevetto degli Stati Uniti n. 8.124.586, brevetto degli Stati Uniti n. 7.811.991, e

pubblicazione degli Stati Uniti n. 20110086801. In alcune forme di realizzazione, il polipeptide legante la callicreina è DX-88 (un inibitore della callicreina non presente in natura, noto anche come KALBITOR® [ecallantide], SEQ ID N.:8). In alcune forme di realizzazione, l'inibitore della callicreina comprende o è costituito da una sequenza di circa 58 amminoacidi degli amminoacidi 3-60 della SEQ ID N.:8 o il polipeptide DX-88 avente la sequenza da 60 amminoacidi di SEQ ID N.: 8.

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

In alcune forme di realizzazione, la proteina legante la callicreina plasmatica è EPIKAL-2 (SEQ ID N.: 9), che è un inibitore della callicreina non presente in natura avente una sequenza amminoacidica da 58 residui (corrispondente ai residui 3-60 della SEQ ID N.: 8) e avente sostituzioni amminoacidiche da Ile a Ser al residuo 34 e da Glu a Gly al residuo 39. La sequenza di EPIKAL-2 è mostrata di seguito:

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

In alcune forme di realizzazione, una proteina legante la callicreina plasmatica può avere un'identità di sequenza con una proteina legante qui descritta di circa l'85%, il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superiore. In alcune forme di realizzazione, una proteina legante la callicreina plasmatica può avere

un'identità di sequenza con una proteina legante qui descritta di circa l'85%, il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superiore nelle regioni cornice HC e/o LC (per esempio, HC e/o LC FR 1, 2, 3 e/o 4) con una proteina legante qui descritta. In alcune forme di realizzazione, una proteina legante la callicreina plasmatica può avere un'identità di sequenza con una proteina legante qui descritta di circa l'85%, il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superiore nelle CDR HC e/o LC (per esempio, HC e/o LC CDR1, 2 e/o 3) con una proteina legante qui descritta. In alcune forme di realizzazione, una proteina legante la callicreina plasmatica può avere un'identità di sequenza con una proteina legante qui descritta di circa l'85%, il 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superiore nella regione costante (per esempio, CH1, CH2, CH3 e/o CL1) con una proteina legante qui descritta.

In alcuni aspetti, una piccola molecola lega la forma attiva alla callicreina plasmatica.

### ***Antagonisti del recettore B2 della bradichinina***

In alcune forme di realizzazione, un antagonista del recettore B2 della bradichinina è somministrato a un soggetto. Antagonisti del recettore B2 della bradichinina esemplificativi includono Incatibant (Firazyr®), che è un farmaco peptidomimetico contenente 10 amminoacidi che bloccano il legame della bradichinina nativa verso il recettore B2 della bradichinina.

### ***Agenti di sostituzione di C1-INH***

In alcune forme di realizzazione, un agente di sostituzione di C1-INH è somministrato a un soggetto. Agenti di sostituzione di C1-INH esemplificativi sono pubblicamente disponibili e includono, per esempio, Berinert®, che è un concentrato di C1-INH nanofiltrato pastorizzato umano purificato.

## **ESEMPI**

### **Esempio 1: Chininogeno scisso**

Sulla base dell'analisi del sistema di contatto, il chininogeno scisso è un biomarcatore adatto per la misurazione dell'attivazione del sistema di contatto. È stato precedentemente dimostrato che il chininogeno scisso è elevato durante gli attacchi di HAE, nella cirrosi, e come conseguenza dell'attivazione del sistema di contatto durante la sepsi. Le librerie di esposizione fagica degli anticorpi sono state messe a confronto di chininogeno scisso in combinazione con la deplezione sul chininogeno intatto. Parallelamente, topi sono stati immunizzati con chininogeno scisso e anticorpi monoclonali ottenuti da linee cellulari di ibridoma. Entrambi i tentativi hanno fornito una serie di diversi anticorpi monoclonali che legano chininogeno sia scisso sia intatto, ma nessuno degli anticorpi che ha legato solo chininogeno scisso.

Un numero degli anticorpi è stato analizzato nel senso dell'idoneità in un saggio Western blot e molti sono stati identificati per operare adeguatamente, incluso il mAb di topo (clone 11H05) mostrato nella Figura 2. È evidente che questo saggio è in grado di rilevare chininogeno scisso nei campioni di plasma umano. Inoltre, i dati nella

Figura 2 confermano che la raccolta di plasma in vetro è sufficiente a prevenire l'attivazione da contatto e la scissione del chininogeno.

L'approccio basato su spettrometria di massa può anche essere usato per rilevare chininogeno scisso nel plasma dei pazienti. In questo approccio, un immune adsorbe chininogeno dal campione del paziente, digerisce in maniera proteolitica il chininogeno eluito e analizza i frammenti peptidici mediante LC-MC.

### **Esempio 2: Chininogeno scisso e intatto**

Il Western blot è stato usato per mostrare che il plasma da un paziente ottenuto durante un attacco e raccolto in provette di plasma citrato contenenti un cocktail di anti-proteasi mostra una riduzione della quantità di chininogeno intatto (vale a dire, catena singola) (Figura 3). È stato osservato un aumento del chininogeno scisso (vale a dire, catena doppia).

### **Esempio 3: Saggio di misurazione dei livelli di chininogeno scisso**

Un saggio Western blot per la rilevazione di chininogeno ad alto peso molecolare (HMWK) intatto (catena singola) e scisso (catena doppia) è stato ulteriormente ottimizzato usando la rilevazione Licor. Questo saggio qui descritto usa un anticorpo monoclonale di topo (clone 11H05) che è stato generato mediante tecnologia con ibridoma immunizzando animali con HMWK a catena doppia e analizzando le fusioni di ibridoma rispetto a HMWK sia a catena singola sia a catena doppia mediante ELISA. Il mAb 11H05 è stato selezionato sulla base delle proprie prestazioni in un saggio Western blot e la propria abilità di

legare specificamente la catena leggera e non legare la catena pesante di HMWK. Legati della catena leggera sono stati preferiti perché la catena leggera non è presente nell'altro chininogeno plasmatico (chininogeno a basso peso molecolare, LMWK), che non è un substrato di pKal. Il saggio è stato usato anche per dimostrare l'importanza della raccolta di plasma in provette di plastica poiché la raccolta in provette di vetro ha causato attivazione del sistema di contatto (Figura 4).

In alcuni esempi, i seguenti materiali e condizioni sono stati usati nel saggio Western blot qui descritto:

**Materiali**

1. XCell SureLock® Mini-Cell, Life Technologies (Invitrogen), n. cat. EI0001
2. Confezione scorta scatola gel
3. iBlot® dispositivo di trasferimento per Western Blot, Life Technologies (Invitrogen), n. cat. IB1001
4. iBlot® Transfer Stack, nitrocellulosa, mini, Life Technologies (Invitrogen), n. cat. IB301001
5. Pipettatore multicanale Matrix Laboratories Impact 2, o equivalente
6. Rainin Pipetman, volumi assortiti, Rainin, n. cat.: P-10, P-20, P-100, P-200, e P-1000, o equivalente
7. Congelatore a -80 °C con registratore su carta
8. Congelatore a -20 °C con registratore su carta
9. Frigo 2-8 °C con registratore su carta

10. Sistemi filtranti in polietersolfone da 0,22 µm (PES), Corning, n. cat. 431096 o equivalente
11. Acqua deionizzata e purificata (acqua DI), Ricca Chemical, n. cat. 9150-5 o equivalente
12. NuPAGE 7% gel di Tris-Acetato Gels, 15 pozzetti, Life Technologies (Invitrogen), n. cat. EA03555Box
13. Tampone di esecuzione tris-acetato SDS (20X), Life Technologies (Invitrogen), n. cat. LA0041
14. Agente riducente del campione NuPAGE (10X), Life Technologies (Invitrogen), n. cat. NP0009
15. Tampone campione NuPAGE (4X), Life Technologies (Invitrogen), n. cat. NP0007
16. NuPAGE gel bis-tris 4-12%, 15 pozzetti, Life Technologies (Invitrogen), n. cat. NP0336BOX
17. Tampone di esecuzione MES SDS (20X), Life Technologies (Invitrogen), n. cat. NP0002
18. Tampone di blocco Odyssey, LI-COR, n. cat. 927-40000
19. Tween20, Sigma, n. cat. P1379
20. Tampone fosfato salino pH 7,4, Sigma, n. cat. P-3813 o equivalente
21. Tris, Fisher Scientific, n. cat. T393-5000
22. Cloruro di sodio, JT Baker, n. cat. 3624-19
23. 6N Acido cloridrico, EMD, n. cat. HX0603M-6
24. 3M tampone acetato di sodio pH 5,2, Teknova, n. cat.

S0296

25. Albumina di siero bovino (BSA), priva di IgG e proteasi, Jackson ImmunoResearch, n. cat. 001-000-162

26. Clone anticorpale di HMWK anti-LC monoclonale di topo, clone 11H05 (n. 16), 1,4 mg/ml, Dyax

27. IRDye680 anti-topo di capra, LI-COR, n. cat. 926-68070

28. Marcatori del peso molecolare monocromatici Odyssey, LI-COR, n. cat. 928-40000

29. Cocktail di inibitore dell'anti-proteasi (10X), fornito da Dyax

30. Fattore XIIa, 1,47 mg/ml (21,6  $\mu$ M), Enzyme Research Labs, fornito da Dyax

31. Plasma con deficit di chininogeno, Hyphen-Biomed, fornito da Dyax

32. HMWK a catena singola, 1,61 mg/ml, Enzyme Research Labs, n. cat. HK 2700

33. HMWK a catena doppia, 2,01 mg/ml, Enzyme Research Labs, n. cat. HK 2362

34. Campioni di plasma umano sano, campioni di pazienti con HAE e campioni Bioreclamation forniti da Dyax

35. DX2930, Dyax, lotto n. PURDX1-L01, 32,1 mg/ml

36. DX88, Dyax, lotto n. B2007-029, 10,1 mg/ml

**Schema di protocollo:**

<p>Preparazione del campione per il test non ridotto</p>	<p>Campioni per il test non ridotto sono preparati aggiungendo da 5 µl di 4X di tampone campione a 15 µl di ~5% di campioni di test. I campioni sono scaldati a 95 °C per 5 minuti. I campioni sono brevemente centrifugati per rimuovere eventuale condensa dal coperchio della provetta per microcentrifuga del campione di test.</p>
<p>Caricamento ed esecuzione di gel</p>	<p>I campioni ridotti vengono eseguiti usando gel bis-tris al 4-12% e i campioni non ridotti vengono eseguiti usando gel tris-acetato al 7%. Un marcatore proteico monocromatico è caricato nella corsia 1 di ciascun gel. Un campione QC è caricato nella corsia 2 di ciascun gel. Campioni di test ridotti e non ridotti sono caricati nelle corsie 3-15 del tipo di gel adeguato I gel vengono eseguiti a 125 V per ~75 minuti.</p>
<p>Trasferimento del gel</p>	<p>Ciascun gel è trasferito in una membrana di nitrocellulosa usando i transfer stack iBlot, mini e iBlot. Dopo avere aggiunto il gel e il transfer stack ad iBlot, si seleziona il programma P0 e lo si esegue per ~7 minuti. Al completamento del trasferimento, la membrana viene trasferita in un vassoio di plastica contenente 20 ml di tampone di blocco Odyssey.</p>

<p>Blocco della membrana</p>	<p>Le membrane sono bloccate con 20 ml di tampone di blocco Odyssey. Le membrane sono incubate con tampone di blocco su un agitatore per piastre per 1 ora.</p>
<p>Preparazione e aggiunta di mAb LC anti-HMWK di topo</p>	<p>mAb LC anti-HMWK di topo è diluito in 1 µg/ml in tampone di blocco Odyssey contenente Tween 20 al 0,2%. Il tampone di blocco è eliminato da ciascuna membrana. Un volume pari a 20 ml di 1 µg/ml di soluzione di anticorpo primario è aggiunto a ciascuna membrana e le membrane sono incubate su un agitatore per piastre per 1 ora a temperatura ambiente.</p>
<p>Preparazione e aggiunta di IRDye680 anti-topo di capra</p>	<p>IRDye680 anti-topo di capra è preparato con una diluizione di 1:15.000. IRDye680 anti-topo di capra è inizialmente preparato con una diluizione di 1:10 seguita da 1:1.500 per una diluizione finale di 1:15.000. Il IRDye680 anti-topo di capra è preparato in tampone di blocco Odyssey contenente Tween 20 allo 0,2%. L'anticorpo secondario è aggiunto a ciascuna membrana e le membrane sono incubate su un agitatore per piastre per 1 ora a temperatura ambiente.</p>

Lettura della membrana	Dopo un lavaggio con PBS, le membrane sono poste su Li-Cor Odyssey e le membrane vengono lette.
Lavaggio della membrana	Le membrane sono lavate con PBS contenente Tween 20 allo 0,1% per 5 minuti per lavaggio per un totale di quattro lavaggi dopo incubazione dell'anticorpo primario e incubazione dell'anticorpo secondario.

Per valutare la capacità di mAb 11H05 di rilevare HMWK a catena singola e catena doppia, le proteine purificate sono state addizionate a plasma con deficit di HMWK a concentrazioni che includono livelli osservati nel plasma sano (Figura 5). È risultato evidente che in condizioni di riduzione, 11H05 rileva HMWK a catena singola con una maggiore sensibilità rispetto alla catena doppia. Essendo responsabile della diversa sensibilità del mAb per le due forme di HMWK, questo saggio può essere usato per quantificare accuratamente la concentrazione di HMWK a catena singola e a catena doppia nel plasma del paziente. In alternativa, la percentuale di segnale a doppia catena può essere determinata nei campioni plasmatici sospettati di essere coinvolti nell'attivazione da contatto e rispetto a quello del plasma di individui sani normali. Usando quest'ultimo approccio, il saggio può essere usato per analizzare campioni da malattie diverse e identificare malattie associate all'attivazione del sistema di contatto.

Sono stati eseguiti anche test di precisione e accuratezza inter e intra-saggio. Sia in condizioni di riduzione sia di non riduzione, il saggio eseguito ha prodotto valori di CV percentuale accettabili pari a  $\leq 25\%$  attraverso tutti i parametri testati.

Test di stabilità congelamento-scongelo sono stati ugualmente eseguiti su plasma umano normale. È stato determinato che HMWK non sembra degradare tra 0 e 3 cicli di congelamento-scongelo.

Il saggio Western blot è stato validato usando campioni di plasma da pazienti con angioedema ereditario (HAE), una malattia nota per essere causata da attivazione del sistema di contatto eccessivo e attività di pKal. Come mostrato nella Figura 6, la percentuale di HMWK scisso nel plasma HAE è approssimativamente del 20%, che è significativamente superiore a quella del plasma normale. Durante un attacco di HAE, la percentuale di HMWK scisso rilevato usando questo saggio è ulteriormente elevata. Questi dati dimostrano chiaramente un aumento di HMWK scisso nel plasma HAE durante lo stato quiescente (basale) della malattia. Il saggio può quindi essere usato per monitorare l'efficacia degli inibitori terapeutici di pKal mediante una valutazione del grado con cui ripristinano i normali livelli di chininogeno scisso.

È noto che superfici caricate negativamente o particelle come i fosfolipidi o polifosfati sono attivatori efficaci del sistema di contatto, che porta alla formazione di pKal attivo e alla generazione di bradichinina dalla proteolisi di HMWK a catena singola. L'identità della superficie

fisiologica che porta all'attivazione del sistema di contatto negli attacchi di HAE non è nota. Gli attacchi di HAE, tuttavia, sono associati alla generazione di FXIIa. L'uso di FXIIa come iniziatore del sistema di contatto, invece di sostanze caricate come destrano solfato o caolina, consente un'attivazione del sistema di contatto più riproducibile e prestazioni ottimizzate del saggio. La concentrazione di FXIIa e le condizioni di reazione sono state determinate per avvicinarsi alla percentuale di chininogeno scisso che si osserva nei pazienti con HAE (~20-50%) (Figura 7, Tabella 1).

**Tabella 1 - Intensità del segnale Licor di campioni di plasma umano trattati con FXIIa\***

<b>Confronto ridotto delle condizioni di attivazione del fattore XIIa</b>								
<b>Conc. di FXIIa (nM)</b>	<b>Temp. di incubazione</b>	<b>Tempo di incubazione (min)</b>	<b>Catena singola</b>	<b>Catena doppia (56 kDa)</b>	<b>Catena doppia (46 kDa)</b>	<b>Segnale totale</b>	<b>% catena doppia nella corsa</b>	<b>% catena doppia dal segnale non trattato</b>
<b>0</b>	<b>N/D</b>	<b>N/D</b>	29500	202	300	30002	1,7%	N/D
<b>2,5</b>	<b>37 °C</b>	<b>10</b>	21900	4010	2370	28280	22,6%	25,8%

<b>2,5</b>	<b>37 °C</b>	<b>30</b>	19500	4240	2370	26110	25,3 %	33,9%
<b>2,5</b>	<b>Ghiaccio</b>	<b>10</b>	20900	447	1220	22567	7,4%	29,2%
<b>2,5</b>	<b>Ghiaccio</b>	<b>30</b>	8160	3380	3950	15490	47,3 %	72,3%
<b>5</b>	<b>37 °C</b>	<b>10</b>	9020	4070	2950	16040	43,8 %	69,4%
<b>5</b>	<b>37 °C</b>	<b>30</b>	8480	4070	3770	16320	48,0 %	71,3%
<b>5</b>	<b>Ghiaccio</b>	<b>10</b>	13300	3270	2780	19350	31,3 %	54,9%
<b>5</b>	<b>Ghiaccio</b>	<b>30</b>	2220	5220	9420	16860	86,8 %	92,5%
<b>7,5</b>	<b>37 °C</b>	<b>10</b>	4200	5610	6920	16730	74,9 %	85,8%
<b>7,5</b>	<b>37 °C</b>	<b>30</b>	4530	6310	7560	18400	75,4 %	84,6%
<b>7,5</b>	<b>Ghiaccio</b>	<b>10</b>	12100	2510	2520	17130	29,4 %	59,0%
<b>7,5</b>	<b>Ghiaccio</b>	<b>30</b>	260	4340	1230 0	16900	98,5 %	99,1%

**% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena  
doppia/somma del segnale totale della corsia**

**% catena doppia dal segnale non trattato: 1 - (segnale catena  
singola trattato/segnale a catena singola non trattato)**

\*Analisi del segnale dei campioni da Western blot nella Figura 5.

Usando una concentrazione di FXIIa di 2,5 nM e condizioni di reazione ottimizzate, plasma umano normale da 15 maschi e 15 femmine è stato esaminato in presenza o assenza di 10 µg/ml di DX-2930 (un potente inibitore anticorpale dell'attività di pKal) e la percentuale di HMWK a catena doppia è determinata (Tabella 2). È evidente che il saggio è in grado di rilevare l'inibizione della callicreina plasmatica della proteolisi di HMWK nel plasma. È stato dimostrato che DX-2930 mostra una potenza approssimativamente equivalente in questo saggio a ecallantide, un inibitore di pKal approvato per il trattamento degli attacchi di HAE (Figura 8). La potenza uguale a ecallantide in questo saggio in vitro suggerisce che livelli di farmaco equivalenti possono essere ugualmente efficaci nella HAE.

**Tabella 2. Percentuale media della doppia catena nella corsia, valori ridotti e non ridotti\***

<b>Percentuale media della doppia catena nella corsia</b>				
<b>Campione</b>	<b>XIIa (nM)</b>	<b>DX2930 (µg/ml)</b>	<b>Ridotto</b>	<b>Non ridotto</b>
<b>Media maschile</b>	0	0	16,1%	32,0%
	2,5	0	42,0%	61,2%
	2,5	10	29,5%	43,6%

<b>Media femminile</b>	0	0	9,6%	21,5%
	2,5	0	43,8%	50,2%
	2,5	10	26,4%	30,3%
*Media di plasma da 15 machi e 15 femmine.				

Campioni da pazienti con colite ulcerosa (UC) e artrite reumatoide (RA) sono stati testati usando questo saggio Western blot. Campioni di plasma dei pazienti sono stati ottenuti da Bioreclamation e raccolti in provette di plastica con anticoagulante. La percentuale di chininogeno scisso è stato scoperto essere elevata sia nei pazienti con UC sia con RA rispetto ai pazienti sani di controllo (Figura 9, Tabella 3).

Tabella 3. Sommario dell'analisi Western blot dei campioni di colite ulcerosa e artrite reumatoide

<b>Cor sia</b>	<b>Campioni dello stato patologico ridotto in K2EDTA e sodio citrato, colite ulcerosa e artrite reumatoide</b>							
	<b>Campio ne</b>	<b>Anticoagul ante</b>	<b>Malattia</b>	<b>Segnale HMWK</b>				<b>% cate na dopp ia nella corsi a</b>
				<b>Cate na sing ola (110 kDa)</b>	<b>Cate na dop pia (56 kDa)</b>	<b>Cate na dop pia (46 kDa)</b>	<b>Segn ale totale</b>	

<b>1</b>	<b>Standard peso molecolare</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>
<b>2</b>	<b>Standard catena singola e catena doppia</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>
<b>3</b>	<b>A3005, N17</b>	<b>anti-proteasi</b>	<b>Normal e</b>	2050 0	775	366	21641	5,3%
<b>4</b>	<b>BRH745 075</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Normal e</b>	1870 0	1340	802	20842	10,3%
<b>5</b>	<b>BRH745 056</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Normal e</b>	2420 0	893	782	25875	6,5%
<b>6</b>	<b>BRH715 036</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Colite ulcera</b>	1740 0	3030	1340	21770	20,1%
<b>7</b>	<b>BRH715 037</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcera</b>	1740 0	1220	694	19314	9,9%

<b>8</b>	<b>BRH715 038</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	N/D	2140	1030 0	12440	100, 0%
<b>9</b>	<b>BRH715 039</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	1410 0	1700	596	16396	14,0 %
<b>10</b>	<b>BRH715 040</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	1330 0	1170	2070	16540	19,6 %
<b>11</b>	<b>BRH715 041</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Artrite reumatoide</b>	N/D	N/D	4950	4950	100, 0%
<b>12</b>	<b>BRH715 042</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Artrite reumatoide</b>	88	N/D	9250	9338	99,1 %
<b>13</b>	<b>BRH715 043</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Artrite reumatoide</b>	N/D	N/D	6900	6900	100, 0%
<b>14</b>	<b>BRH715 044</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Artrite reumatoide</b>	N/D	N/D	2850	2850	100, 0%
<b>15</b>	<b>BRH715 045</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Artrite reumatoide</b>	6600	1860	1520	9980	33,9 %

Campioni da pazienti con malattia di Crohn (CD) sono stati anche testati usando il saggio Western blot. Campioni di plasma dei pazienti sono stati ottenuti da Bioreclamation e raccolti in provette di plastica con anticoagulante. La percentuale di chininogeno scisso è stato scoperto essere elevata in pazienti con CD rispetto ai pazienti sani di controllo (Figura 10, Tabella 4).

Tabella 4. Sommario dell'analisi Western blot dei campioni con malattia di Crohn

Cor sia	Campio ne	Anticoagu lante	Malat tia	Segnale HMWK					% cate na dop pia nell a cors ia
				Cate na sing ola (150 kDa)	Cate na sing ola (110 kDa)	Cate na dop pia (56 kDa)	Cate na dop pia (46 kDa)	Segn ale total e	
1	Standar d peso moleco lare	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d	n/d

<b>2</b>	<b>Standard catena singola e catena doppia</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>	<b>n/d</b>
<b>3</b>	<b>A2992, N14</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Norm ale</b>	<b>704</b>	<b>1290 0</b>	<b>384</b>	<b>576</b>	<b>1456 4</b>	<b>6,6 %</b>
<b>4</b>	<b>BRH74 5047</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Norm ale</b>	<b>1560</b>	<b>5820</b>		<b>192</b>	<b>7572</b>	<b>2,5 %</b>
<b>5</b>	<b>BRH74 5076</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Norm ale</b>	<b>5720</b>	<b>1230 0</b>	<b>382</b>	<b>480</b>	<b>1888 2</b>	<b>4,6 %</b>
<b>6</b>	<b>BRH71 5026</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Malat tia di Croh n</b>	<b>N/D</b>	<b>1210 0</b>	<b>1230</b>	<b>1950</b>	<b>1528 0</b>	<b>20,8 %</b>
<b>7</b>	<b>BRH71 5027</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Malat tia di Croh n</b>	<b>N/D</b>	<b>1630 0</b>	<b>668</b>	<b>1550</b>	<b>1851 8</b>	<b>12,0 %</b>

8	BRH71 5028	K2EDTA	Malattia di Crohn	N/D	6650	504	2250	9404	29,3 %
9	BRH71 5029	K2EDTA	Malattia di Crohn	1900	1410 0	N/D	680	1668 0	4,1 %
10	BRH71 5030	K2EDTA	Malattia di Crohn	N/D	1320	3230	6020	1057 0	87,5 %

**Esempio 4: Effetti di FXIIa e DX2930 sui campioni di plasma umano normale (NHP)**

**Scopo:**

Lo scopo di questo esperimento è stato determinare gli effetti di DX-2930 sull'attivazione del sistema di contatto di FXIIa. DX2930 può inibire la callicreina plasmatica riducendo il rapporto misurato tra catena doppia e catena singola in risposta al trattamento con FXIIa. Campioni di sodio citrato di NHP da cinque maschi e cinque femmine sono stati testati non trattati, dopo attivazione di FXIIa e dopo attivazione di FXIIa quando i campioni sono stati pretrattati con 10 µg/ml di DX-2930. Ciascuna serie di campioni è stata saggiata in condizioni non ridotte e ridotte.

## **Procedura:**

### **Preparazione dei campioni**

1. I campioni di NHP sono stati rimossi dalla conservazione frigorifica e lasciati raggiungere l'equilibrio a temperatura ambiente. I seguenti campioni maschili di NHP sono stati testati: BRH745050, BRH745051, BRH745052, BRH745053, e BRH745054. I seguenti campioni femminili sono stati testati: BRH745065, BRH745066, BRH745067, BRH745068, e BRH745069.

2. DX2930 è stato preparato a 215 µg/ml aggiungendo da 3,35 µl dello stock di DX2930 (n. lotto PURDX1-L01, 32,1 mg/ml) a 496,65 µl di 1X TBS.

3. Un intermedio di 1:10 della soluzione di FXIIa è stato preparato aggiungendo da 5 µl della soluzione madre di FXIIa (25.300 nM) a 45 µl di TBS. Una soluzione di FXIIa da 56,25 nM è stata preparata aggiungendo 4,45 µl dell'intermedio da 1:10 a 195,55 µl di TBS.

4. Ciascun campione di NHP è stato preparato con 10 µg/ml di DX2930 aggiungendo 2 µl dei 215 µg/ml di soluzione di DX2930 a 41 µl di NHP.

5. Ciascun campione di NHP è stato preparato con 2,5 nM di FXIIa aggiungendo 2 µl dei 56,25 nM di soluzione di FXIIa a 43 µl di ciascun campione di NHP, con e senza DX2930.

6. I campioni sono stati incubati con FXIIa a 37°C per 10 minuti. La reazione è stata interrotta aggiungendo 5 µl di 10X inibitori anti-

proteasi.

7. Ciascun campione di NHP con FXIIa, con DX2930 e FXIIa e il campione non trattato sono stati diluiti al 5% di plasma aggiungendo 5  $\mu$ l del campione a 95  $\mu$ l di TBS.

8. I campioni non ridotti sono stati preparati aggiungendo da 5  $\mu$ l di 4X di tampone campione a 15  $\mu$ l di campione.

9. I campioni ridotti sono stati preparati aggiungendo da 5  $\mu$ l di 4X di tampone campione e 2  $\mu$ l di 10X agente riducente a 13  $\mu$ l di campione.

10. Tutti i campioni sono stati scaldati a 95 °C per 5 minuti usando un blocco calore.

Caricamento, esecuzione e trasferimento di gel

1. Un volume di 1 l di 1X tampone di esecuzione SDS tris-acetato è stato preparato aggiungendo 50 ml di 20X tampone di corsa SDS tris-acetato a 950 ml di acqua DI.

2. Un volume di 1 l di 1X tampone di esecuzione MES è stato preparato aggiungendo 50 ml di 20X tampone di corsa SDS MES a 950 ml di acqua DI.

3. Un tampone del saggio (tampone Odyssey Blocking con Tween allo 0,2%) è stato preparato aggiungendo 1 ml di Tween 20 a 499 ml di tampone di blocco Odyssey.

4. Un tampone di lavaggio (PBS con Tween allo 0,1%) è stato preparato aggiungendo 1 pacchetto di PBS e 1 ml di Tween 20 a 900 ml di acqua DI. La soluzione è stata ben miscelata e sottoposta a QS

con 1 l di acqua DI. La soluzione finale è stata filtrata attraverso un sistema di filtrazione PES da 0,22  $\mu$ M.

5. Un volume di 4  $\mu$ l di un marcatore proteico monocromatico è stato aggiunto alla corsia 1 dei due gel.

6. Volumi di 13  $\mu$ l dei campioni non ridotti sono stati aggiunti alle corsie adeguate di un gel tris-acetato al 7%.

7. Volumi di 13  $\mu$ l dei campioni ridotti sono stati aggiunti alle corsie adeguate di un gel bis-tris al 4-12%.

8. I gel sono stati eseguiti a 125 volt per ~75 minuti.

9. Ciascun gel è stato singolarmente trasferito in una membrana usando colonne mini-transfer iBlot e il programma P0 del sistema di trasferimento iBlot.

10. Ciascuna membrana è stata trasferita in un vassoio di plastica contenente 20 ml di tampone di blocco Odyssey. Le membrane sono state incubate nel tampone di blocco Odyssey su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

11. Una soluzione di anticorpo primario di 1  $\mu$ g/ml è stata preparata aggiungendo 28,58  $\mu$ l del mAb anti-HMWK di topo, clone n. 11H05, 1,4 mg/ml a 29.971,42  $\mu$ l di tampone del saggio.

12. Il tampone di blocco è stato rimosso dai vassoi di plastica. Un volume pari a 20 ml di anticorpo primario è stato aggiunto a ciascun vassoio e le membrane sono state incubate su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

13. Un intermedio 1:10 di IgG IRDYe680 anti-topo di capra è

stato preparato aggiungendo 5 µl di IgG IRDye680 anti-topo di capra a 45 µl del tampone di saggio. La soluzione di anticorpo secondario è stata preparata con una diluizione di 1:15.000 aggiungendo 26,66 µl di intermedio 1:10 di IgG IRDye680 anti-topo di capra a 39,973.34 µl di tampone di saggio.

14. La soluzione di anticorpo primario è stata rimossa dai vassoi.

15. Ciascuna membrana è stata lavata per cinque minuti con 20 ml di tampone di lavaggio e quindi la soluzione di lavaggio è stata eliminata. Il lavaggio è stato ripetuto per un totale di 4 lavaggi.

16. Un volume pari a 20 ml di anticorpo secondario è stato aggiunto a ciascun vassoio e le membrane sono state incubate su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

17. La soluzione di anticorpo secondario è stata rimossa dai vassoi.

18. Ciascuna membrana è stata lavata per cinque minuti con 20 ml di tampone di lavaggio e quindi la soluzione di lavaggio è stata eliminata. Il lavaggio è stato ripetuto per un totale di 4 lavaggi.

19. Ciascuna membrana è stata sciacquata con PBS per 5 minuti.

20. Le membrane sono state analizzate usando LiCor Odyssey Clx.

### **Risultati:**

Le Tabelle 5 e 6 contengono i dati del campione non ridotto. Le

Tabelle 7 e 8 contengono i dati del campione ridotto. la percentuale di HMWK scisso è stata calcolata usando due metodi. La percentuale della doppia catena nella corsia è stata determinata usando la seguente equazione: somma del segnale a doppia catena / somma del segnale totale. La percentuale della doppia catena dal segnale non trattato è stata determinata usando la seguente formula:  $1 - (\text{Segnale a catena singola trattato} / \text{segnale a catena singola non trattato})$  I campioni trattati e non trattati sono stati preparati in maniera leggermente diversa dai campioni non trattati aventi una percentuale leggermente più alta di plasma nella preparazione del campione. Quindi i campioni non trattati hanno prodotto in generale segnali un po' più alti rispetto ai campioni trattati. La percentuale della doppia catena nel valore della corsia è stata usata per determinare la percentuale di HMWK scisso a causa della preparazione leggermente diversa del campione tra campioni trattati e non trattati.

La Tabella 16 contiene un riassunto dei risultati di attivazione e inibizione. In condizioni ridotte, i campioni di NHP di maschio e femmina non trattati contenevano una media del 16,1% e del 9,6% di HMWK scisso, rispettivamente. I campioni di NHP di maschio e femmina trattati con FXIIa contenevano una media del 42,0% e del 43,8% di HMWK scisso, rispettivamente. I campioni di NHP di maschio e femmina pre-trattati con DX-2930 con successivo trattamento con FXIIa contenevano una media del 29,5% e del 26,4% di HMWK scisso, rispettivamente.

In condizioni non ridotte, i campioni di NHP di maschio e

femmina non trattati contenevano una media del 32,0% e del 21,5% di HMWK scisso, rispettivamente. I campioni di NHP di maschio e femmina trattati con FXIIa contenevano una media del 61,2% e del 50,2% di HMWK scisso, rispettivamente. I campioni di NHP di maschio e femmina pre-trattati con DX-2930 con successivo trattamento con FXIIa contenevano una media del 43,6% e del 30,3% di HMWK scisso, rispettivamente.

**Conclusione:**

Il trattamento dei campioni di NHP con FXIIa ha aumentato la percentuale di HMWK scisso rispetto ai campioni non trattati. I campioni di NHP pre-trattati con DX-2930, con successiva attivazione di FXIIa, hanno prodotto meno HMWK scisso dei campioni trattati con solo FXIIa, ma una percentuale leggermente maggiore di HMWK scisso rispetto ai campioni non trattati. I campioni di NHP ridotti non trattati contenevano meno HMWK scisso rispetto ai campioni di NHP non trattati non ridotti. È stato anche scoperto che campioni di NHP non trattati, trattati con FXIIa, e pre-trattati con DX2930 con successivo trattamento con FXIIa hanno dato risultati riproducibili.

**Tabella 5. Inibizione di DX2930 non ridotto dell'attivazione di FXIIa, campioni maschili, segnali HMWK a catena singola/doppia, segnale totale, percentuale di HMWK a catena doppia**

<p><b>Attivazione non ridotta di NHP di maschio con fattore FXIIa, inibizione del fattore XIIa con DX2930</b></p>
---

Campion e maschile di NHP	FXII a (nM )	DX293 0 (µg/ml )	Segnale HMWK			Segna le totale	% caten a doppi a nella corsi a	% caten a doppi a dal segna le non trattat o
			Catena singola (120kD a)	Caten a doppi a (100 kDa)	Caten a doppi a (90 kDa)			
BRH7450 50	0	0	17900	4670	0	22570	20,7 %	N/D
BRH7450 50	2,5	0	8160	7750	1770	17680	53,8 %	54,4%
BRH7450 50	2,5	10	12600	6620	812	20032	37,1 %	29,6%
BRH7450 51	0	0	19600	3450	0	23050	15,0 %	N/D
BRH7450 51	2,5	0	10000	9430	2140	21570	53,6 %	49,0%
BRH7450 51	2,5	10	15300	6480	915	22695	32,6 %	21,9%
BRH7450 52	0	0	22500	8570	1100	32170	30,1 %	N/D

<b>BRH7450</b> <b>52</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	11000	10700	3050	24750	55,6 %	51,1%
<b>BRH7450</b> <b>52</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	16500	8500	1500	26500	37,7 %	26,7%
<b>BRH7450</b> <b>53</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	6370	13100	7390	26860	76,3 %	N/D
<b>BRH7450</b> <b>53</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	1710	8310	10500	20520	91,7 %	73,2%
<b>BRH7450</b> <b>53</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	4360	9310	6490	20160	78,4 %	31,6%
<b>BRH7450</b> <b>54</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	27100	5900	0	33000	17,9 %	N/D

**Tabella 6. Inibizione di DX2930 non ridotto dell'attivazione di FXIIa, campioni femminili, segnali HMWK a catena singola/doppia, segnale totale, percentuale di HMWK a catena doppia**

<b>Attivazione non ridotta di NHP di femmina con fattore FXIIa, inibizione del fattore XIIa con DX2930</b>						
			<b>Segnale HMWK</b>			<b>%</b>

<b>Campione femminile di NHP</b>	<b>FXII (nM)</b>	<b>DX293 (µg/ml)</b>	<b>Catena singola (120kDa)</b>	<b>Catena doppia (100 kDa)</b>	<b>Catena doppia (90 kDa)</b>	<b>Segnale totale</b>	<b>% catena doppia nella corsa</b>	<b>catena doppia dal segnale non trattato</b>
<b>BRH7450 65</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	14700	2500	161	17361	15,3 %	N/D
<b>BRH7450 65</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	4750	5550	3160	13460	64,7 %	67,7%
<b>BRH7450 65</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	10500	3270	453	14223	26,2 %	28,6%
<b>BRH7450 66</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	23200	4460	17,4	27677	16,2 %	N/D
<b>BRH7450 66</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	14200	10600	1780	26580	46,6 %	38,8%
<b>BRH7450 66</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	15100	5920	205	21225	28,9 %	34,9%
<b>BRH7450 67</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	26000	8610	300	34910	25,5 %	N/D
<b>BRH7450 67</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	13700	9470	1410	24580	44,3 %	47,3%

<b>BRH7450 67</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	19800	8880	795	29475	32,8 %	23,8%
<b>BRH7450 68</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	25400	9180	211	34791	27,0 %	N/D
<b>BRH7450 68</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	14200	12500	2610	29310	51,6 %	44,1%
<b>BRH7450 68</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	15800	7350	708	23858	33,8 %	37,8%
<b>BRH7450 69</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	20900	6470	0	27370	23,6 %	N/D
<b>BRH7450 69</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	17000	11500	1820	30320	43,9 %	18,7%
<b>BRH7450 69</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	21600	8960	198	30758	29,8 %	-3,3%
<p><b>% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena doppia/somma del segnale totale della corsia</b></p> <p><b>% catena doppia dal segnale non trattato: 1 - (Segnale a catena singola trattato / segnale a catena singola non trattato)</b></p>								

**Tabella 7. Inibizione di DX2930 ridotto dell'attivazione di FXIIa, campioni maschili, segnali HMWK a catena singola/doppia, segnale totale, percentuale di HMWK a catena doppia**

<b>Attivazione ridotta di NHP di maschio con fattore FXIIa, inibizione del fattore XIIa con DX2930</b>						
			<b>Segnale HMWK</b>			

<b>Campion e maschile di NHP</b>	<b>FXII a (nM )</b>	<b>DX293 0 (µg/ml )</b>	<b>Caten a singol a</b>	<b>Caten a doppi a (56 kDa)</b>	<b>Caten a doppi a (46 kDa)</b>	<b>Segnal e totale</b>	<b>% caten a doppi a nella corsi a</b>	<b>% catena doppi a dal segnal e non trattat o</b>
<b>BRH7450 50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	28300	0	0	28300	0,0%	N/D
<b>BRH7450 50</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	14400	3360	2620	20380	29,3 %	49,1%
<b>BRH7450 50</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	19200	2560	1430	23190	17,2 %	32,2%
<b>BRH7450 51</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	26800	0	0	26800	0,0%	N/D
<b>BRH7450 51</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	12800	2950	2580	18330	30,2 %	52,2%
<b>BRH7450 51</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	13900	2100	1210	17210	19,2 %	48,1%
<b>BRH7450 52</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	17800	853	1500	20153	11,7 %	N/D
<b>BRH7450 52</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	12100	2980	3250	18330	34,0 %	32,0%

<b>BRH7450</b> <b>52</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	16900	2790	2190	21880	22,8 %	5,1%
<b>BRH7450</b> <b>53</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	7280	4340	8430	20050	63,7 %	N/D
<b>BRH7450</b> <b>53</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	3180	5620	9240	18040	82,4 %	56,3%
<b>BRH7450</b> <b>53</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	6420	5470	6660	18550	65,4 %	11,8%
<b>BRH7450</b> <b>54</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	22100	625	586	23311	5,2%	N/D
<b>BRH7450</b> <b>54</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	9610	2660	2020	14290	32,8 %	56,5%
<b>BRH7450</b> <b>54</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	12500	2010	1300	15810	20,9 %	43,4%
<p><b>% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena doppia/somma del segnale totale della corsia</b></p> <p><b>% catena doppia dal segnale non trattato: 1 - (Segnale a catena singola trattato / segnale a catena singola non trattato)</b></p>								

**Tabella 8. Inibizione di DX2930 ridotto dell'attivazione di FXIIa, campioni femminili, segnali HMWK a catena singola/doppia, segnale totale, percentuale di HMWK a catena doppia**

<b>Attivazione ridotta di NHP di femmina con fattore FXIIa, inibizione del fattore XIIa con DX2930</b>						
			<b>Segnale HMWK</b>			

<b>Campione femminile di NHP</b>	<b>FXII (nM)</b>	<b>DX293 (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Catena singola</b>	<b>Catena doppia (56 kDa)</b>	<b>Catena doppia (46 kDa)</b>	<b>Segnale totale</b>	<b>% catena doppia nella corsa</b>	<b>% catena doppia dal segnale e non trattato</b>
<b>BRH7450 65</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	17300	2080	1240	20620	16,1 %	N/D
<b>BRH7450 65</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	4100	4880	3450	12430	67,0 %	76,3%
<b>BRH7450 65</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	9770	3740	1960	15470	36,8 %	43,5%
<b>BRH7450 66</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	21300	1770	753	23823	10,6 %	N/D
<b>BRH7450 66</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	9710	4280	2760	16750	42,0 %	54,4%
<b>BRH7450 66</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	13600	3990	1780	19370	29,8 %	36,2%
<b>BRH7450 67</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	21900	375	1850	24125	9,2%	N/D
<b>BRH7450 67</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	11900	5120	3430	20450	41,8 %	45,7%

<b>BRH7450 67</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	19000	3610	2440	25050	24,2 %	13,2%
<b>BRH7450 68</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	29400	525	966	30891	4,8%	N/D
<b>BRH7450 68</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	19600	5660	5130	30390	35,5 %	33,3%
<b>BRH7450 68</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	25100	4050	3260	32410	22,6 %	14,6%
<b>BRH7450 69</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	19900	500	688	21088	5,6%	N/D
<b>BRH7450 69</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	12000	2910	2560	17470	31,3 %	39,7%
<b>BRH7450 69</b>	<b>2,5</b>	<b>10</b>	15000	1790	1350	18140	17,3 %	24,6%
<p><b>% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena doppia/somma del segnale totale della corsia</b></p> <p><b>% catena doppia dal segnale non trattato: 1 - (Segnale a catena singola trattato / segnale a catena singola non trattato)</b></p>								

**Tabella 9. Percentuale media della doppia catena nella corsia, valori ridotti e non ridotti**

<b>Percentuale media della doppia catena nella corsia</b>				
<b>Campione</b>	<b>XIIa (nM)</b>	<b>DX2930 (µg/ml)</b>	<b>Ridotto</b>	<b>Non ridotto</b>
<b>Media maschile</b>	0	0	16,1%	32,0%
	2,5	0	42,0%	61,2%

	2,5	10	29,5%	43,6%
<b>Media femminile</b>	0	0	9,6%	21,5%
	2,5	0	43,8%	50,2%
	2,5	10	26,4%	30,3%

**Esempio 6. Inibizione dell'attivazione di FXIIa usando DX-2930 e DX-88**

**Scopo:**

Lo scopo di questo esperimento è stato determinare l'efficacia di DX-2930 e DX-88 sull'inibizione dell'attivazione di FXIIa. DX-2930 è stato testato a 5 concentrazioni: 200, 100, 30, 12, and 5 µg/ml. DX-88 è stato testato a 5 concentrazioni: 9,4, 4,7, 1,4, 0,56, e 0,24 µg/ml. Campioni pre-trattati con DX-2930 e DX-88 sono stati trattati con FXIIa. In aggiunta ai campioni pre-trattati, sono stati testati un campione non trattato e due campioni trattati con il solo FXIIa. I campioni sono stati trattati in condizioni ridotte.

**Procedura:**

1. Un pool di NHP è stato preparato aggiungendo 250 µl di ciascun campione di plasma, BRH745070, BRH745071 e BRH745048 a una provetta di microcentrifugato da 1,5 ml e ben miscelato.

2. Una soluzione di DX2930 da 4500 µg/ml è stata preparata aggiungendo 4,21 µl della soluzione madre di DX2930 (32,1 mg/ml) a 25,79 µl di TBS. Una soluzione di DX2930 da 2250 µg/ml è stata preparata aggiungendo 15 µl di soluzione da 4500 µg/ml a 15 µl di TBS. Una soluzione di DX2930 da 675 µg/ml è stata preparata aggiungendo

6 µl di soluzione da 2250 µg/ml a 14 µl di TBS. Una soluzione di DX2930 da 270 µg/ml è stata preparata aggiungendo 8 µl di soluzione da 675 µg/ml a 12 µl di TBS. Una soluzione di DX2930 da 112,5 µg/ml è stata preparata aggiungendo 10 µl di soluzione da 270 µg/ml a 14 µl di TBS.

3. Cinque campioni di plasma pre-trattato con DX-2930 sono stati preparati aggiungendo 2 µl di ciascuna soluzione di DX2930 a 41 µl del pool di NHP.

4. Una soluzione di DX88 da 211,5 µg/ml è stata preparata aggiungendo 6,28 µl della soluzione madre di DX88 (10,1 mg/ml) a 293,72 µl di TBS. Una soluzione di DX88 da 105,75 µg/ml è stata preparata aggiungendo 15 µl di soluzione da 211,5 µg/ml a 15 µl di TBS. Una soluzione di DX88 da 31,5 µg/ml è stata preparata aggiungendo 8,94 µl di soluzione da 105,75 µg/ml a 21,06 µl di TBS. Una soluzione di DX88 da 12,6 µg/ml è stata preparata aggiungendo 12 µl di soluzione da 31,5 µg/ml a 18 µl di TBS. Una soluzione di DX88 da 5,4 µg/ml è stata preparata aggiungendo 12,86 µl di soluzione da 12,6 µg/ml a 17,14 µl di TBS.

5. Cinque campioni di plasma pre-trattato con DX-88 sono stati preparati aggiungendo 2 µl di ciascuna soluzione di DX-88 a 41 µl del pool di NHP.

6. Un intermedio di 1:10 di FXIIa è stato preparato aggiungendo da 5 µl della soluzione madre (25.300 nM) a 45 µl di TBS. Una soluzione di FXIIa da 56,25 nM è stata preparata aggiungendo 4,45 µl

dell'intermedio da 1:10 a 195,55  $\mu$ l di TBS.

7. Ciascun campione di plasma pre-trattato con DX2930 e DX88 è stato trattato con 2,5 nM di FXIIa aggiungendo 2  $\mu$ l della soluzione da 56,25 nM di FXIIa a ciascun campione.

8. Due campioni contenenti solo FXIIa sono stati preparati aggiungendo 2  $\mu$ l di TBS e 2  $\mu$ l di soluzione di FXIIa da 56,25 nM a 41  $\mu$ l di pool di NHP.

9. Un campione non trattato è stato preparato aggiungendo 4  $\mu$ l di TBS a 41  $\mu$ l di pool di NHP.

10. Tutti i campioni contenenti FXIIa sono stati incubati a 37 °C per 10 minuti.

11. Un volume di 5  $\mu$ L di inibitori anti-proteasi è stato aggiunto a ciascun campione incluso il campione non trattato Il volume totale del campione per ciascuna replica era di 50  $\mu$ l.

12. Ciascun campione è stato diluito a ~5% di plasma aggiungendo 5  $\mu$ l del campione a 95  $\mu$ l di TBS.

13. I campioni sono stati preparati aggiungendo da 5  $\mu$ l di 4X di tampone campione e 2  $\mu$ l di 10X agente riducente a 13  $\mu$ l di campione.

14. Tutti i campioni sono stati scaldati a 95 °C per 5 minuti usando un blocco calore.

15. Un volume di 1 l di 1X tampone di esecuzione MES è stato preparato aggiungendo 50 ml di 20X tampone di corsa SDS MES a 950 ml di acqua DI.

16. Un tampone del saggio (tampone Odyssey Blocking con

Tween allo 0,2%) è stato preparato aggiungendo 1 ml di Tween 20 a 499 ml di tampone di blocco Odyssey.

17. Un tampone di lavaggio (PBS con Tween allo 0,1%) è stato preparato aggiungendo 1 pacchetto di PBS e 1 ml di Tween 20 a 900 ml di acqua DI. La soluzione è stata ben miscelata e sottoposta a QS con 1 l di acqua DI. La soluzione finale è stata filtrata attraverso un sistema di filtrazione PES da 0,22  $\mu$ M.

18. Un volume di 4  $\mu$ l di un marcatore proteico monocromatico è stato aggiunto alla corsia 1 dei due gel.

19. Volumi di 13  $\mu$ l dei campioni ridotti sono stati aggiunti alle corsie adeguate di un gel bis-tris al 4-12%.

20. Il gel sono stati eseguiti a 125 volt per ~75 minuti.

21. Il gel è stato trasferito in una membrana usando colonne mini-transfer iBlot e il programma P0 del sistema di trasferimento iBlot.

22. La membrana è stata trasferita in un vassoio di plastica contenente 20 ml di tampone di blocco Odyssey. La membrana è stata incubata nel tampone di blocco Odyssey su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

23. Una soluzione di anticorpo primario di 1  $\mu$ g/ml è stata preparata aggiungendo 14,29  $\mu$ l del mAb anti-HMWK di topo, clone n. 11H05, 1,4 mg/ml a 19.985,7  $\mu$ l di tampone del saggio.

24. Il tampone di blocco è stato rimosso dal vassoio di plastica. Un volume pari a 20 ml di anticorpo primario è stato aggiunto alla membrana e incubato su un agitatore per piastre a temperatura

ambiente per 1 ora.

25. Un intermedio 1:10 di IgG IRDye680 anti-topo di capra è stato preparato aggiungendo 5 µl di IgG IRDye680 anti-topo di capra a 45 µl del tampone di saggio. La soluzione di anticorpo secondario è stata preparata con una diluizione di 1:15.000 aggiungendo 13,33 µl di intermedio 1:10 di IgG IRDye680 anti-topo di capra a 19,986.7 µl di tampone di saggio.

26. La soluzione di anticorpo primario è stata rimossa dal vassoio.

27. La membrana è stata lavata per cinque minuti con 20 ml di tampone di lavaggio e quindi la soluzione di lavaggio è stata eliminata. Il lavaggio è stato ripetuto per un totale di 4 lavaggi.

28. Un volume pari a 20 ml di anticorpo secondario è stato aggiunto alla membrana e incubato su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

29. La soluzione di anticorpo secondario è stata rimossa dal vassoio.

30. La membrana è stata lavata per cinque minuti con 20 ml di tampone di lavaggio e quindi la soluzione di lavaggio è stata eliminata. Il lavaggio è stato ripetuto per un totale di 4 lavaggi.

31. La membrana è stata sciacquata con PBS per 5 minuti.

32. La membrana è stata analizzata usando LiCor Odyssey Clx.

### **Risultati:**

La Tabella 10 contiene i risultati dell'esperimento di inibizione di

DX-2930 e DX-88. La percentuale della doppia catena è stata calcolata entro ciascuna corsia e calcolata confrontando il segnale trattato con il segnale non trattato. Per questo confronto, è stata usata la percentuale della catena doppia nella corsia. Il pool di NHP non trattato ha prodotto una percentuale di valore della doppia catena del 3,8%. Quando il pool di NHP è stato trattato con il solo FXIIa, i due campioni duplicati hanno prodotto una percentuale dei valori della doppia catena del 24,4%. I campioni pre-trattati con DX-2930 hanno prodotto una percentuale leggermente inferiore di valori della catena doppia rispetto ai campioni preparati con DX-88. Campioni pre-trattati con 5 µg/ml di DX-2930 e 0,24 µg/ml di DX-88 hanno prodotto una percentuale di valori della catena doppia del 22,3% e del 23,9%, rispettivamente. Questi valori sono molto vicini alla percentuale del valore della catena doppia nel campione trattati con il solo FXIIa.

**Conclusione:**

I campioni pre-trattati con DX-2930 hanno prodotto una percentuale leggermente inferiore di valori della catena doppia rispetto ai campioni pre-trattati con DX-88.

**Tabella 10. Inibizione di FXIIa usando DX-2930 e DX-88, segnali di HMWK, percentuale di HMWK a catena doppia**

Inibizione dell'attivazione di contatto di FXIIa usando DX-88 e DX-2930					
2930					
Segnale HMWK					

<b>FXII a (nM)</b>	<b>DX293 0 (µg/ml)</b>	<b>DX88 (µg/ml )</b>	<b>Caten a singol a (110 kDa)</b>	<b>Caten a doppi a (56 kDa)</b>	<b>Caten a doppi a (46 kDa)</b>	<b>Segnal e totale</b>	<b>% caten a doppi a nella corsia</b>	<b>% catena doppia dal segnal e non trattato</b>
0,00	0,00	0,00	26600	413	643	27656	3,8%	N/D
2,50	0,00	0,00	20500	3920	2690	27110	24,4%	22,9%
2,50	0,00	0,00	21200	4470	2390	28060	24,4%	20,3%
2,50	200,00	0,00	27200	376	576	28152	3,4%	-2,3%
2,50	100,00	0,00	25300	206	212	25718	1,6%	4,9%
2,50	30,00	0,00	24700	784	1470	26954	8,4%	7,1%
2,50	12,00	0,00	23200	3170	1560	27930	16,9%	12,8%
2,50	5,00	0,00	20100	3630	2140	25870	22,3%	24,4%
2,50	0,00	9,40	22600	615	663	23878	5,4%	15,0%
2,50	0,00	4,70	22500	349	592	23441	4,0%	15,4%
2,50	0,00	1,40	21500	2210	1270	24980	13,9%	19,2%
2,50	0,00	0,56	20600	3340	1990	25930	20,6%	22,6%
2,50	0,00	0,24	19500	3910	2200	25610	23,9%	26,7%
<b>% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena doppia/somma del segnale totale della corsia</b> <b>% catena doppia dal segnale non trattato: 1 - (Segnale a catena singola trattato / segnale a catena singola non trattato)</b>								

## **Esempio 7. Determinazione dei livelli di chininogeno scisso in campioni di pazienti con HAE, RA, UC e CD**

### **Scopo:**

Lo scopo di questo esperimento è stato valutare i campioni di plasma trattato con anti-proteasi di pazienti con angioedema ereditario (HAE). Due campioni di HAE sono stati testati da ciascun paziente, un campione basale e un campione colpito da attacco. I campioni sono stati trattati in condizioni ridotte e non ridotte. Inoltre, i campioni da pazienti a cui è stata fornita una diagnosi di malattia di Crohn, artrite reumatoide e colite ulcerosa sono stati testati. Sono stati testati anche campioni di plasma umano normale. I campioni aggiuntivi sono stati testati solo in condizioni ridotte.

### **Procedura:**

1. Sono state testate sei serie di campioni di pazienti con HAE. Ciascun campione di plasma è stato preparato aggiungendo 5 µl di campione a 95 µl di TBS.

2. Sono stati testati cinque campioni di plasma con malattia di Crohn, cinque campioni di plasma con artrite reumatoide e cinque campioni di plasma con colite ulcerosa. Ciascun campione di plasma è stato preparato aggiungendo 5 µl di campione a 95 µl di TBS.

3. Sette campioni di plasma umano normale sono stati preparati per l'uso come controlli aggiungendo 5 µl di campione a 95 µl di TBS.

4. I campioni non ridotti sono stati preparati aggiungendo da 5 µl di 4X di tampone campione a 15 µl di campione.

5. Campioni ridotti sono stati preparati aggiungendo da 5  $\mu$ l di 4X di tampone campione e 2  $\mu$ l di 10X agente riducente a 13  $\mu$ l di campione.

6. Tutti i campioni sono stati scaldati a 95 °C per 5 minuti usando un blocco calore.

7. Un volume di 1 l di 1X tampone di esecuzione SDS tris-acetato è stato preparato aggiungendo 50 ml di 20X tampone di corsa SDS tris-acetato a 950 ml di acqua DI.

8. Un volume di 2 l di 1X tampone di esecuzione MES è stato preparato aggiungendo 100 ml di 20X tampone di corsa SDS MES a 1900 ml di acqua DI.

9. Un tampone del saggio (tampone Odyssey Blocking con Tween allo 0,2%) è stato preparato aggiungendo 2 ml di Tween 20 a 998 ml di tampone di blocco Odyssey.

10. Un tampone di lavaggio (PBS con Tween allo 0,1%) è stato preparato aggiungendo 1 pacchetto di PBS e 1 ml di Tween 20 a 900 ml di acqua DI. La soluzione è stata ben miscelata e sottoposta a QS con 1 l di acqua DI. La soluzione finale è stata filtrata attraverso un sistema di filtrazione PES da 0,22  $\mu$ M.

11. Un volume di 4  $\mu$ l di un marcatore proteico monocromatico è stato aggiunto alla corsia 1 dei quattro gel.

12. Volumi di 13  $\mu$ l dei campioni non ridotti sono stati aggiunti alle corsie adeguate di un gel tris-acetato al 7%.

13. Volumi di 13  $\mu$ l dei campioni ridotti sono stati aggiunti alle

corsie adeguate di gel bis-tris al 4-12%.

14. I gel sono stati eseguiti a 125 volt per ~75 minuti.

15. Ciascun gel è stato singolarmente trasferito in una membrana usando colonne mini-transfer iBlot e il programma P0 sul sistema di trasferimento iBlot.

16. Ciascuna membrana è stata trasferita in un vassoio di plastica contenente 20 ml di tampone di blocco Odyssey. Le membrane sono state incubate nel tampone di blocco Odyssey su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

17. Una soluzione di anticorpo primario di 1 µg/ml è stata preparata aggiungendo 57,14 µl del mAb anti-HMWK di topo, clone n. 11H05, 1,4 mg/ml a 79.942,86 µl di tampone del saggio.

18. Il tampone di blocco è stato rimosso dai vassoi di plastica. Un volume pari a 20 ml di anticorpo primario è stato aggiunto a ciascun vassoio e le membrane sono state incubate su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

19. Un intermedio 1:10 di IgG IRDYe680 anti-topo di capra è stato preparato aggiungendo 10 µl di IgG IRDye680 anti-topo di capra a 90 µl del tampone di saggio. La soluzione di anticorpo secondario è stata preparata con una diluizione di 1:15.000 aggiungendo 53,33 µl di intermedio 1:10 di IgG IRDye680 anti-topo di capra a 79,946.67 µl di tampone di saggio.

20. La soluzione di anticorpo primario è stata rimossa dai vassoi.

21. Ciascuna membrana è stata lavata per cinque minuti con 20 ml di tampone di lavaggio e quindi la soluzione di lavaggio è stata eliminata. Il lavaggio è stato ripetuto per un totale di 4 lavaggi.

22. Un volume pari a 20 ml di anticorpo secondario è stato aggiunto a ciascun vassoio e le membrane sono state incubate su un agitatore per piastre a temperatura ambiente per 1 ora.

23. La soluzione di anticorpo secondario è stata rimossa dai vassoi.

24. Ciascuna membrana è stata lavata per cinque minuti con 20 ml di tampone di lavaggio e quindi la soluzione di lavaggio è stata eliminata. Il lavaggio è stato ripetuto per un totale di 4 lavaggi.

25. Ciascuna membrana è stata sciacquata con PBS per 5 minuti.

26. Le membrane sono state analizzate usando LiCor Odyssey Ctx.

### **Risultati:**

Come atteso, la maggior parte di campioni di pazienti hanno mostrato un livello elevato di HMWK a catena doppia nei campioni colpiti da attacco, al contrario dei campioni basali. Le Tabelle 11 e 12 contengono i dati relativi a HAE per questo esperimento. La Tabella 13 contiene la serie di dati relativa ai campioni dei pazienti con colite ulcerosa e artrite reumatoide. La Tabella 14 contiene i dati relativi ai campioni dei pazienti con malattia di Crohn.

#### **Tabella 11. Campioni di pazienti con HAE non ridotti,**

**basale e con attacco, segnali HMWK, percentuale di catena doppia nella corsia**

<b>Campioni di pazienti con HAE non ridotti anti-proteasi, basali e con attacco</b>							
<b>ID paziente</b>	<b>Iniziali del paziente</b>	<b>HAE</b>	<b>Segnale HMWK</b>			<b>Segnale totale</b>	<b>% catena doppia nella corsia</b>
			<b>120 kDa</b>	<b>100 kDa</b>	<b>90 kDa</b>		
A3009	N18	Normale	15500	3750	N/D	19250	19,5%
A4970	AC	Basale	13000	4300	240	17540	25,9%
A4908	AC	Attacco	9450	5910	1740	17100	44,7%
A5564	BB	Basale	15900	5650	585	22135	28,2%
A5353	BB	Attacco	11600	10500	2340	24440	52,5%
A4607	FF	Basale	11400	4850	N/D	16250	29,8%
A4619	FF	Attacco	6770	6750	2090	15610	56,6%
A5346	DG	Basale	10800	3850	102	14752	26,8%
A5422	DG	Attacco	5650	2080	133	7863	28,1%
A4183	PC	Basale	9530	1190	N/D	10720	11,1%
A4671	PC	Attacco	8840	1570	N/D	10410	15,1%
A5248	GR	Basale	14300	4270	44,1	18614,1	23,2%
A2315	GR	Attacco	11600	4610	490	16700	30,5%

**% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena  
doppia/somma del segnale totale della corsia**

**Tabella 12. Campioni di pazienti con HAE ridotti, basale e con attacco, segnali HMWK, percentuale della catena doppia nella corsia**

<b>Campioni di pazienti con HAE ridotti anti-proteasi, basali e con attacco</b>							
<b>ID paziente</b>	<b>Iniziali del paziente</b>	<b>HAE</b>	<b>Segnale HMWK</b>				<b>% catena doppia nella corsia</b>
			<b>110 kDa</b>	<b>56 kDa</b>	<b>46 kDa</b>	<b>Segnale totale</b>	
A3009	N18	Normale	18700	802	926	20428	8,5%
A4970	AC	Basale	14500	2980	1480	18960	23,5%
A4908	AC	Attacco	8500	3540	2670	14710	42,2%
A5564	BB	Basale	12400	3160	1380	16940	26,8%
A5353	BB	Attacco	8980	3980	2620	15580	42,4%
A4607	FF	Basale	10900	2490	1620	15010	27,4%
A4619	FF	Attacco	6130	3930	2520	12580	51,3%
A5346	DG	Basale	11200	2400	709	14309	21,7%
A5422	DG	Attacco	7900	2640	749	11289	30,0%
A4183	PC	Basale	13900	1850	572	16322	14,8%
A4671	PC	Attacco	13500	2120	572	16192	16,6%
A5248	GR	Basale	19000	2120	1160	22280	14,7%

A2315	GR	Attacco	16400	3660	1580	21640	4,2%2
<b>% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena doppia/somma del segnale totale della corsia</b>							

**Tabella 13. Campioni di plasma da individui con colite ulcerosa e artrite reumatoide, segnali HMWK, percentuale di catena doppia nella corsia**

<b>Campioni dello stato patologico ridotto in K2EDTA e sodio citrato, colite ulcerosa e artrite reumatoide</b>							
<b>Campioni</b>	<b>Anticoagulante</b>	<b>Malattia</b>	<b>Segnale HMWK</b>				<b>% catena doppia nella corsia</b>
			<b>Catena singola (110 kDa)</b>	<b>Catena doppia (56 kDa)</b>	<b>Catena doppia (46 kDa)</b>	<b>Segnale totale</b>	
<b>A3005, N17</b>	<b>anti-proteasi</b>	<b>Normale</b>	20500	775	366	21641	5,3%
<b>BRH7450 75</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Normale</b>	18700	1340	802	20842	10,3%
<b>BRH7450 56</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Normale</b>	24200	893	782	25875	6,5%

<b>BRH7150 36</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	17400	3030	1340	21770	20,1 %
<b>BRH7150 37</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	17400	1220	694	19314	9,9%
<b>BRH7150 38</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	N/D	2140	1030 0	12440	100,0 %
<b>BRH7150 39</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	14100	1700	596	16396	14,0 %
<b>BRH7150 40</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Colite ulcerosa</b>	13300	1170	2070	16540	19,6 %
<b>BRH7150 41</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Artrite reumatoi de</b>	N/D	N/D	4950	4950	100,0 %
<b>BRH7150 42</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Artrite reumatoi de</b>	88	N/D	9250	9338	99,1 %
<b>BRH7150 43</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Artrite reumatoi de</b>	N/D	N/D	6900	6900	100,0 %
<b>BRH7150 44</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Artrite reumatoi de</b>	N/D	N/D	2850	2850	100,0 %

<b>BRH7150</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Artrite reumatoide</b>	6600	1860	1520	9980	33,9 %
<b>45</b>							
<b>% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena doppia/somma del segnale totale della corsia</b>							

**Tabella 14. Campioni di plasma da individui con malattia di Crohn, segnale HMWK, percentuale della catena doppia nella corsia**

<b>Campioni dello stato patologico ridotto in K2EDTA e sodio citrato, malattia di Crohn e psoriasi</b>								
<b>Campio ne</b>	<b>Anticoagul ante</b>	<b>Malatt ia</b>	<b>Segnale HMWK</b>				<b>Segn ale totale</b>	<b>% cate na dopp ia nella corsi a</b>
			<b>Cate na sing ola (150 kDa)</b>	<b>Cate na sing ola (110 kDa)</b>	<b>Cate na dopp ia (56 kDa)</b>	<b>Cate na dopp ia (46 kDa)</b>		
<b>A2992, N14</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Norm ale</b>	704	1290 0	384	576	14564	6,6%
<b>BRH745 047</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Norm ale</b>	1560	5820	N/D	192	7572	2,5%

<b>BRH745 076</b>	<b>Citrato di sodio</b>	<b>Normale</b>	5720	1230 0	382	480	18882	4,6%
<b>BRH715 026</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Malattia di Crohn</b>	N/D	1210 0	1230	1950	15280	20,8%
<b>BRH715 027</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Malattia di Crohn</b>	N/D	1630 0	668	1550	18518	12,0%
<b>BRH715 028</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Malattia di Crohn</b>	N/D	6650	504	2250	9404	29,3%
<b>BRH715 029</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Malattia di Crohn</b>	1900	1410 0	N/D	680	16680	4,1%
<b>BRH715 030</b>	<b>K2EDTA</b>	<b>Malattia di Crohn</b>	N/D	1320	3230	6020	10570	87,5%
<b>% catena doppia nella corsia: Somma del segnale a catena doppia/somma del segnale totale della corsia</b>								

### **ALTRE FORME DI REALIZZAZIONE**

Tutte le caratteristiche divulgate in questa descrizione possono essere combinate in qualsiasi combinazione. Ciascuna caratteristica descritta in questa specifica può essere sostituita con una caratteristica alternativa che serva allo stesso scopo, o equivalente o simile.

Pertanto, a meno che diversamente indicato, ciascuna caratteristica descritta è solo un esempio di una serie generica di caratteristiche equivalenti o simili.

### **ELENCO DELLE SEQUENZE**

<110> Dyax Corp.

Sexton, Daniel J.

Faucette, Ryan

Kenniston, Jon A.

Conley, Greg

Nixon, Andrew

TenHoor, Christopher

Adelman, Burt

Chyung, Yung

<120> VAUTAZIONE E TRATTAMENTO DI DISTURBI

MEDIATI DALLA BRADICHININA

<130> D0617.70063WO00

<140> TBD

<141> 2014-01-17

<150> Stati Uniti 61/754.607

<151> 20-01-2013

<160> 9

<170> PatentIn versione 3.5

<210> 1

< 211> 644

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr  
625 630 635 640

Asp Gly Leu Ser

<210> 2

< 211> 362

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

< 211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro  
 1 5 10 15  
 His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys  
 20 25 30  
 Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg  
 35 40 45  
 Lys His Asn Leu Gly His Gly Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His  
 50 55 60  
 Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His  
 85 90 95  
 Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His  
 100 105 110  
 Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn  
 115 120 125  
 Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr  
 130 135 140  
 Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly Pro Thr Pro Ile Pro  
 145 150 155 160  
 Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe Ser Asp Phe Gln Asp  
 165 170 175  
 Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile  
 180 185 190  
 Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly  
 195 200 205  
 Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys  
 210 215 220  
 Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu Ile Asn Pro Thr Thr  
 225 230 235 240  
 Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser  
 245 250 255

<210> 4

< 211> 304

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Polipeptide sintetico

<400> 4

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



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> 5

< 211> 58

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Polipeptide sintetico

<400> 5

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala  
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr  
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala  
35 40 45

Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala  
50 55

<210> 6

< 211> 122

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Polipeptide sintetico

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr  
 20 25 30  
 Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Tyr Arg Arg Ile Gly Val Pro Arg Arg Asp Glu Phe Asp Ile Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 7

< 211> 105

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Polipeptide sintetico

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp  
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
100 105

<210> 8

< 211> 60

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Polipeptide sintetico

<400> 8

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

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

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

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

<210> 9

< 211> 58

<212> PRT

<213> Sequenza artificiale

<220>

<223> Polipeptide sintetico

<400> 9

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

## **RIVENDICAZIONI**

**1.** Metodo per identificare un soggetto a rischio di o avente un disturbo mediato dalla callicreina plasmatica (pKal), il metodo comprendendo:

misurare un livello di un chininogeno ad alto peso molecolare scisso (HMWK) e facoltativamente un livello di un HMWK intatto in un campione di un soggetto;

determinare un valore di HMWK scisso; e

identificare il soggetto come a rischio di o avente un disturbo mediato da pKal se il valore di HMWK scisso è superiore a un valore di riferimento,

in cui il valore di riferimento si riferisce al valore di HMWK scisso in un soggetto sano;

e in cui il disturbo mediato da pKal è angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn.

**2.** Metodo della rivendicazione 1, in cui il valore di HMWK scisso è la percentuale di HMWK scisso nel campione.

**3.** Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-2, in cui i livelli di HMWK scisso e facoltativamente HMWK intatto sono misurati mediante un agente di rilevazione, che lega specificamente HMWK scisso rispetto a HMWK intatto, o lega specificamente HMWK intatto rispetto a HMWK scisso, in cui facoltativamente l'agente di rilevazione non lega chininogeno a basso peso molecolare (LMWK).

**4.** Metodo della rivendicazione 3, in cui l'agente di rilevazione è

un anticorpo; preferibilmente in cui l'anticorpo lega specificamente HMWK scisso rispetto a HMWK intatto e facoltativamente, non lega LMWK, più preferibilmente in cui l'agente di rilevazione è un anticorpo che lega il C-terminale della catena leggera di HMWK scisso.

**5.** Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui i livelli di HMWK intatto e HMWK scisso sono misurati mediante saggio Western blot.

**6.** Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui il campione è un campione di sangue o campione di plasma.

**7.** Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui il soggetto ha un sintomo del disturbo mediato da pKal; o in cui il soggetto è resistente a una terapia antistaminica, una terapia con corticosteroidi, o entrambe.

**8.** Metodo della rivendicazione 7, in cui il sintomo è edema.

**9.** Metodo della rivendicazione 7, in cui il sintomo è:

attacchi ricorrenti di tumefazione;

tumefazione in cui detta tumefazione è completamente o principalmente periferica; orticaria;

rossore, dolore e tumefazione in assenza di evidenza di infezione; e

edema non istamino-mediato.

**10.** Metodo di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui il soggetto è privo di sintomi di disturbo mediato da pKal al momento del prelievo del campione, non ha alcuna anamnesi di un sintomo del

disturbo mediato da pKal, o alcuna anamnesi del disturbo mediato da pKal.

**11.** Metodo di qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente inoltre determinare se il disturbo è suscettibile a trattamento con un inibitore di pKal, in cui il disturbo è suscettibile a trattamento con un inibitore di pKal se il valore di HMWK scisso è superiore al valore di riferimento.

**12.** Metodo per valutare un trattamento di un disturbo mediato da pKal in un soggetto, il metodo comprendendo:

misurare livelli di un HMWK scisso e facoltativamente livelli di un HMWK intatto in campioni raccolti dal soggetto prima e dopo il trattamento o durante il corso del trattamento;

determinare un valore di HMWK scisso in ciascun campione basato sui livelli di HMWK scisso e facoltativamente intatto nello stesso campione; e

valutare l'efficacia del trattamento basato su cambiamenti nei valori di HMWK scisso nei campioni prima e dopo il trattamento o durante il corso del trattamento,

in cui il disturbo mediato da pKal è angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn.

**13.** Composizione farmaceutica per l'uso nel trattamento di una malattia mediata da pKal di un soggetto, in cui la composizione comprende un inibitore di pKal e un trasportatore farmaceuticamente accettabile in cui il soggetto ha un valore di chininogeno ad alto peso

molecolare clivato (HMWK) che è superiore a un valore di riferimento, che si riferisce al valore di HMWK clivato in un soggetto sano; e in cui la malattia mediata da pKal è angioedema ereditario (HAE), artrite reumatoide, colite ulcerosa o malattia di Crohn.

\*\*\* \*\*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

## LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

### TAVOLA 1/7

Figura 1

“Cleaved HMWK” = HMWK scisso

“Active pKal” = pKal attivo

“prekallikrein” = precallicreina

“Bradykinin” = bradichinina

### TAVOLA 2/7

Figura 3

“Quantitation of Intact 1 Chain Kininogen by Western Blot in HAE Patient ANTI-PROTEASE Plasma” = Quantificazione di chininogeno a catena singola intatto mediante Western blot in plasma ANTI-PROTEASI di paziente con HAE

“Patient CM” = paziente CM

“Patient DG” = paziente DG

“Patient BB” = paziente BB

“Patient PC” = paziente PC

“Normal” = Normale

“1 catena KNG” = KNG a catena singola

“Patient, Basal” = paziente, basale

“Patient, Attack” = paziente, attacco

### TAVOLA 3/7

Figura 4

“Mouse anti-human HMWK Antibody specific for light-chain” = anticorpo HMWK anti-umano murino specifico per catena leggera

“1-Chain HMWK” = HMWK a catena singola

“2-Chain HMWK” = HMWK a catena doppia

“1-Chain” = catena singola

“2-Chain” = catena doppia

“Reducing agent” = Agente riducente

“Heavy Chain” = Catena pesante

“Light chain” = Catena leggera

“glass” = vetro

“plastic” = plastica

Figura 5

“Purified HMWK Licor Detection Linearity” = Linearità di rilevazione con  
Licro di HMWK purificato

“1-Chain HMWK” = HMWK a catena singola

“2-Chain HMWK” = HMWK a catena doppia

“Total Signal” = segnale totale

“Signal” = Segnale

Figura 6

“HAE Patient Basal/ Attack Paired Plasma Samples” = Campioni di  
plasma basale/con attacco appaiati di paziente con HAE

“Cleaved HMWK in HAE and normal Human Plasma” = HMWK scisso in  
plasma umano con HAE e normale

“Percentage cleaved HMWK” = Percentuale HMWK scisso

“Normal” = Normale

“HAE Basal” = HAE basale

“HAE Attack” = Attacco di HAE

#### **TAVOLA 4/7**

Figura 7A

“1-Chain HMWK” = HMWK a catena singola

“2-Chain HMWK (46 and 56 kDa)” = HMWK a catena doppia (46 e 56 kDa)

Figura 7B

“Reduced Comparison of FXIIa Activation Conditions” = confronto ridotto delle condizioni di attivazione di FXIIa

“% Two-Chain HMWK” = % HMWK a catena doppia

“Factor XIIa concentration” = concentrazione di fattore XIIa

“ice” = ghiaccio

#### **TAVOLA 5/7**

Figura 8A

“Ecallantide” = ecallantide

“C -25nM 1 and 2 Chain HMWK; N – Normal Plasma; + - Activated Human Plasma (No Drug)” = C - 25 nM e catena doppia HMWK; N - plasma normale; + - plasma umano attivato (nessun farmaco)

Figura 8B

“Cleaved HMWK with FXIIa Activation in Human Plasma” = HMWK scisso con attivazione di FXIIa nel plasma umano

“Percentage cleaved HMWK” = Percentuale HMWK scisso

“Drug concentration” = concentrazione del farmaco

#### **TAVOLA 6/7**

Figura 9

“Normal” = Normale

“Ulcerative colitis” = colite ulcerosa

“Rheumatoid arthritis” = artrite reumatoide

**TAVOLA 7/7**

Figura 10

“Normal” = Normale

“Crohn’s Disease” = malattia di Crohn

\*\*\* \*\*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

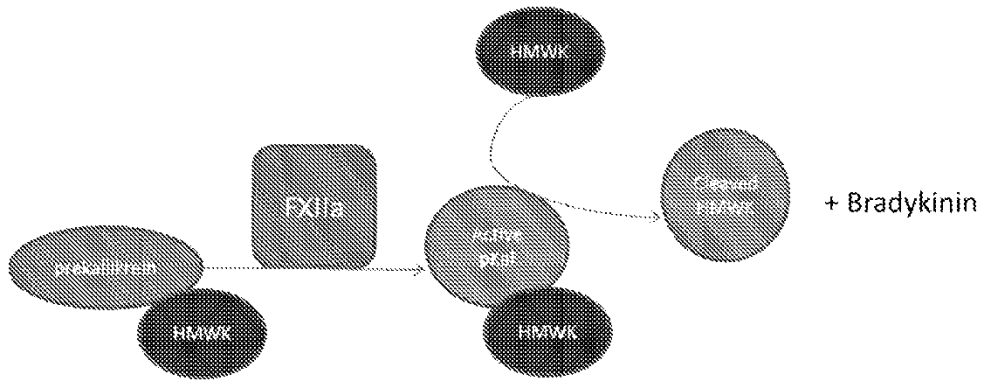


FIG. 1

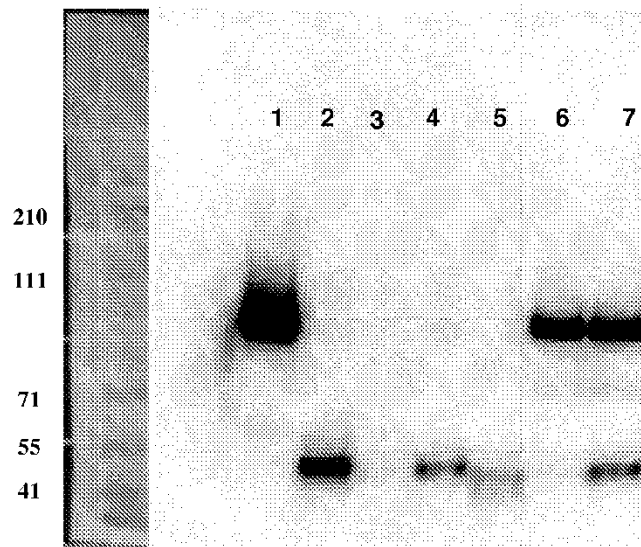


FIG. 2

Quantitation of Intact 1 Chain Kininogen  
by Western Blot in HAE Patient ANTI-PROTEASE Plasma

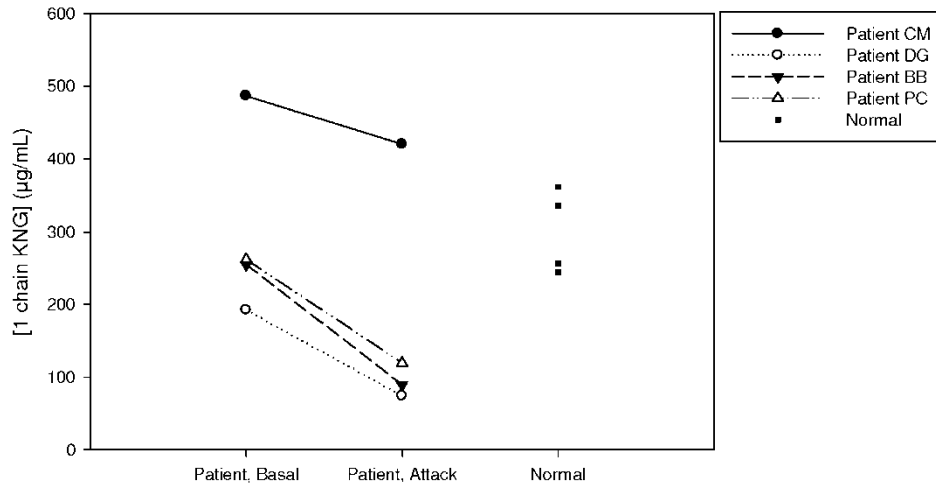


FIG. 3

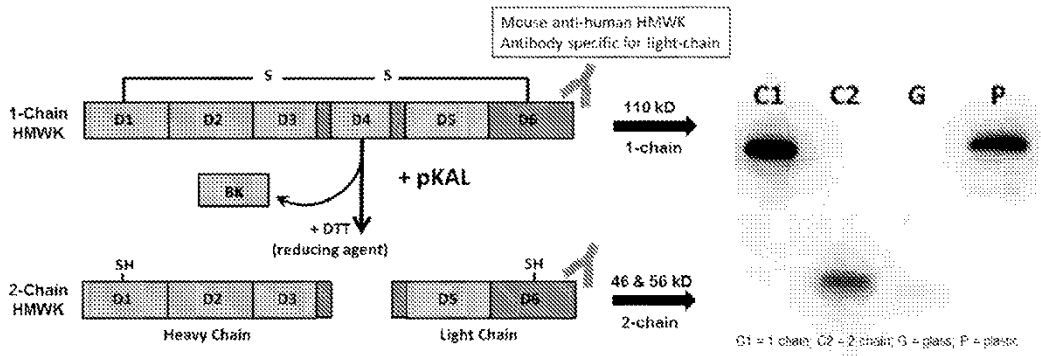


FIG. 4

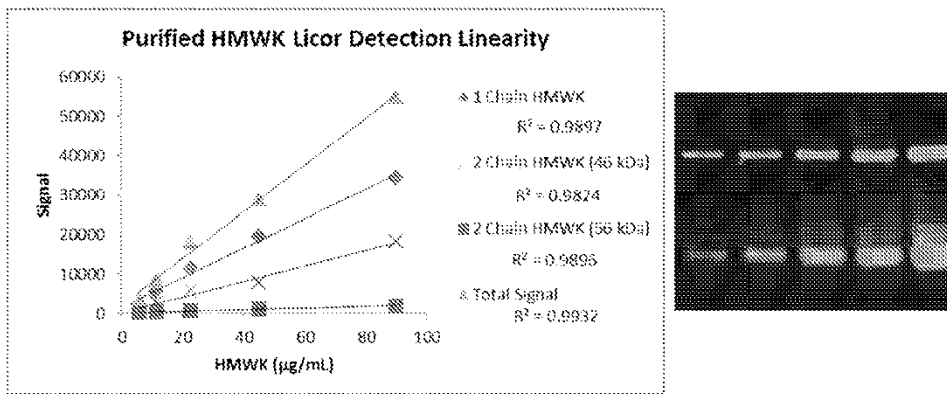


FIG. 5

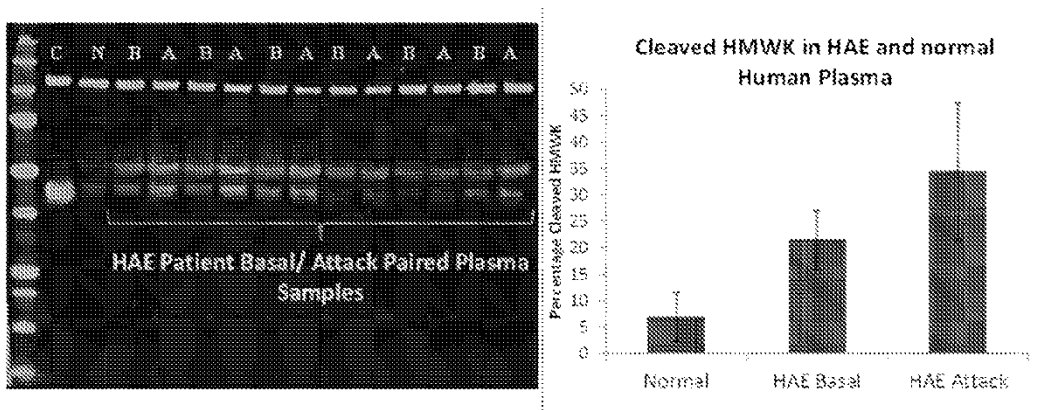


FIG. 6

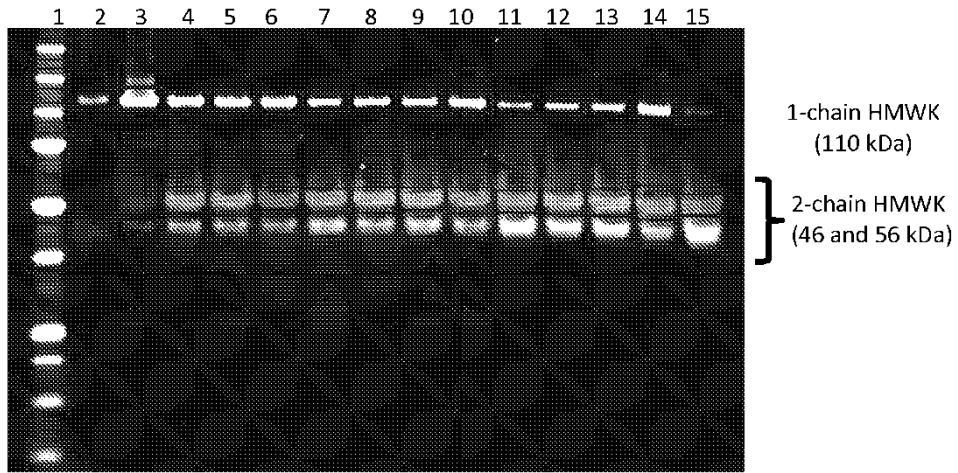


FIG. 7A

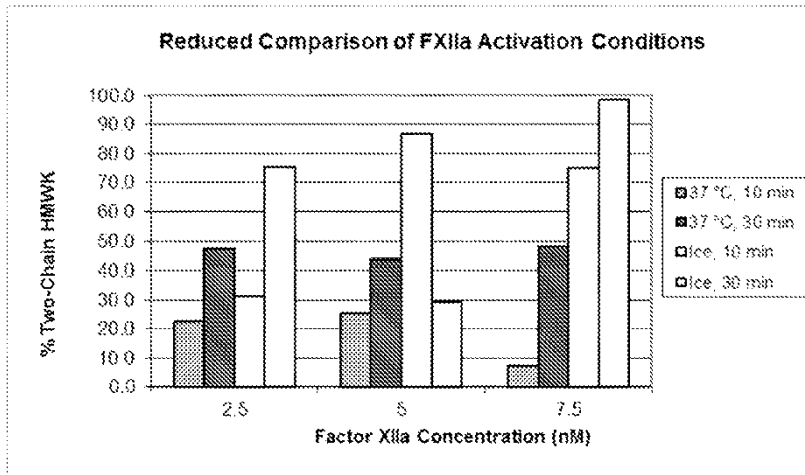


FIG. 7B

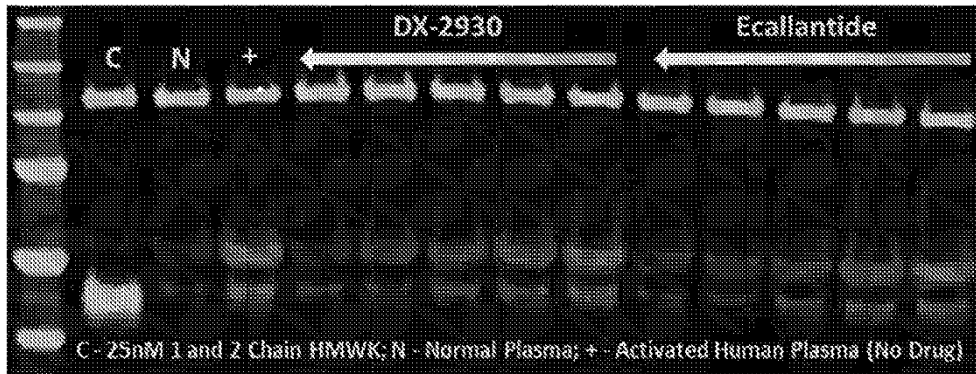


FIG. 8A

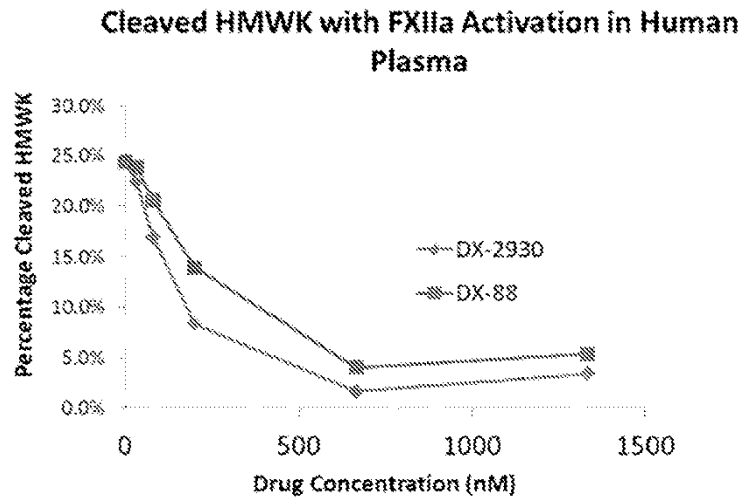


FIG. 8B

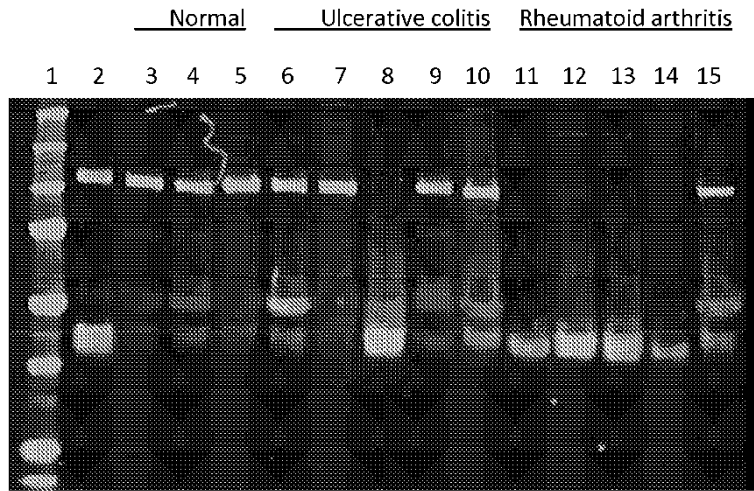


FIG. 9

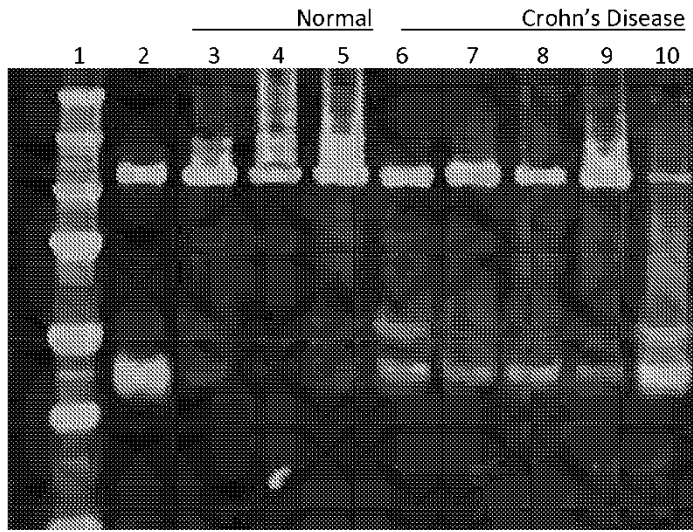


FIG. 10