



등록특허 10-2203880



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월15일

(11) 등록번호 10-2203880

(24) 등록일자 2021년01월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) **A61K 38/16** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
A61K 38/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7022389
(22) 출원일자(국제) 2014년01월17일
심사청구일자 2019년01월17일
(85) 번역문제출일자 2015년08월19일
(65) 공개번호 10-2015-0106006
(43) 공개일자 2015년09월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/012107
(87) 국제공개번호 WO 2014/113712
국제공개일자 2014년07월24일
(30) 우선권주장
61/754,607 2013년01월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02012094587 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
다이엑스 코퍼레이션
미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 웨어 웨이 300
(72) 발명자
섹스톤, 다니엘, 제이.
미국 매사추세츠주 02176 멜로즈 마빈 로드 59
파우셋, 라이언
미국 매사추세츠주 02476 알링턴 매사추세츠 애비뉴 1357
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 19 항

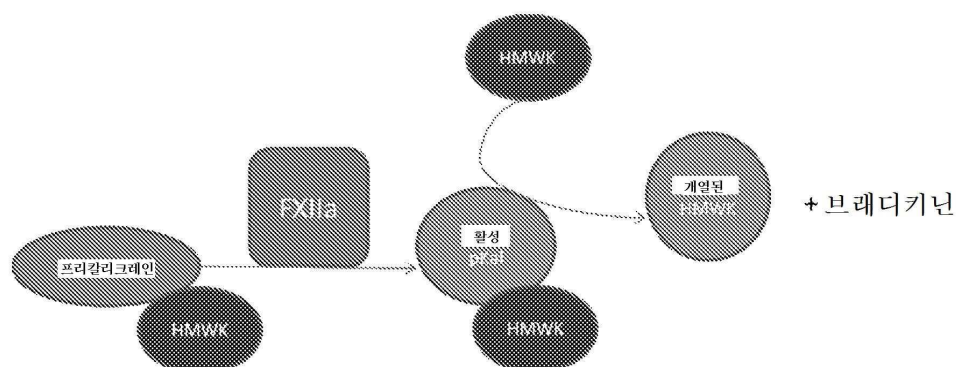
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 **브래디키닌 매개 장애의 평가 및 치료**

(57) 요약

본 개시내용은 대상체의 샘플에서 온전한 키니노젠 및/또는 개열된 키니노젠의 값(예를 들어, 백분율)에 기초하여 대상체, 예를 들어 pKa1 매개 또는 브래디키닌 매개 장애의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체를 평가하는 방법을 제공한다. 제공된 방법은 혈장 칼리크레인 매개 혈관 부종(KMA), 또는 평가 및 치료에서 유용한 pKa1에 의해 매개되는 다른 질환을 갖는 환자의 분석을 허용한다. 이러한 방법은 개열된 키니노젠 또는 온전한 키니노젠에 우선적으로 결합하는 검출제의 사용을 포함할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/17 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
C07K 16/36 (2013.01)
G01N 33/53 (2018.05)
G01N 2800/065 (2013.01)
G01N 2800/102 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

케니스톤, 존, 에이.

미국 매사추세츠주 02043 힙햄 롱매도우 로드 8

콘리, 그렉

미국 매사추세츠주 02139 케임브리지 #1 엘름 스트리트 64

닉슨, 앤드류

미국 매사추세츠주 02339 하노버 에버그린 레인 41

텐후어, 크리스토퍼

미국 매사추세츠주 01748 홉킨턴 웨지우드 드라이브 10

아델만, 버트

미국 매사추세츠주 01742 쿡코드 올드 피카드 로드 210

청, 영

미국 매사추세츠주 02421 렉싱턴 매사추세츠 애비뉴 2521

(56) 선행기술조사문헌

Charles Blais, Jr. et al., 'The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins', Peptides, 2000, Vol. 21, pp 1903-1940. 1부.*

US5047323 A

US20060115471 A1

W02011075684 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

pKa1 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 대상체를 확인하는 방법으로서,

대상체의 샘플에서 개열된 고분자량 키니노겐(high molecular weight kininogen: HMWK)의 수치 및 온전한 HMWK의 수치를 측정하는 단계;

상기 개열된 HMWK의 수치, 온전한 HMWK의 수치 또는 둘 다에 기초하여 상기 샘플에서 상기 개열된 HMWK의 값 또는 온전한 HMWK의 값을 결정하는 단계; 및

상기 개열된 HMWK의 값 또는 온전한 HMWK의 값이 기준값으로부터 벗어나는 경우, 상기 대상체를 pKa1 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로서 확인하는 단계를 포함하되;

상기 기준값은 건강한 대상체에서의 개열된 HMWK의 값을 지칭하는, pKa1 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 대상체를 확인하는 방법.

청구항 2

장애가 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인지를 결정하는 방법으로서,

상기 장애를 갖는 대상체의 샘플에서 개열된 고분자량 키니노겐(HMWK)의 수치 및 온전한 HMWK의 수치를 측정하는 단계;

상기 샘플에서 상기 개열된 HMWK의 값, 온전한 HMWK의 값 또는 둘 다를 결정하는 단계; 및

상기 개열된 HMWK의 값이 기준값으로부터 벗어나는 경우, 상기 장애를 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인 것으로서 확인하는 단계를 포함하되,

상기 기준값은 건강한 대상체에서의 개열된 HMWK의 값을 지칭하는, 장애가 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인지를 결정하는 방법.

청구항 3

대상체에서 pKa1 매개 장애의 치료를 평가하기 위한 정보를 제공하는 방법으로서,

치료 전에 및 후에 또는 치료 과정 동안에 상기 대상체로부터 수집된 샘플에서 개열된 고분자량 키니노겐(HMWK)의 수치 및 온전한 HMWK의 수치를 측정하는 단계;

동일한 샘플에서 상기 개열된 HMWK의 수치 및 온전한 HMWK의 수치에 기초하여 각각의 샘플에서 상기 개열된 HMWK의 값, 온전한 HMWK의 값 또는 둘 다를 결정하는 단계; 및

치료 전에 및 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 상기 샘플에서의 개열된 HMWK, 온전한 HMWK, 또는 개열된 HMWK 및 온전한 HMWK의 값의 변화에 기초하여 치료의 유효성을 평가하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 개열된 HMWK의 값 또는 상기 온전한 HMWK의 값은 상기 개열된 HMWK의 백분율 또는 상기 온전한 HMWK의 백분율인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 개열된 HMWK의 백분율이 결정되고, 상기 개열된 HMWK의 백분율이 기준값에 있거나 기준값보다 높은 경우 상기 대상체는 pKa1 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로서 확인되는, 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 개열된 HMWK 및 상기 온전한 HMWK의 수준은 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐

에 특이적으로 결합하거나, 개열된 HMWK와 비교하여 온전한 키니노겐에 특이적으로 결합하는 검출제에 의해 측정되는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 검출제는 저분자량 키니노겐(low molecular-weight kininogen: LMWK)에 결합하지 않는, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 검출제는 온전한 HMWK와 비교해서 개열된 HMWK에 특이적으로 결합하는 항체인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 검출제는 개열된 HMWK의 경쇄의 C 말단에 결합하는 항체인, 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 온전한 HMWK의 수치 및 상기 개열된 HMWK의 수준은 웨스턴 블롯 검정에 의해 측정되는, 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 샘플은 혈액 샘플 또는 혈장 샘플인, 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 pKa1 매개 장애는 유전성 혈관 부종(HAE), 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염 또는 크론 병인, 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 대상체는 pKa1 매개 장애의 증상을 갖거나, 또는 상기 대상체는 항히스타민 치료제, 코르티코스테로이드 치료제 또는 둘 다에 내성이 있는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 증상은, (i) 부종, (ii) 종창의 재발성 공격, (iii) 말초 두드러기인 종창, (iv) 감염 증거의 부재 하의 충혈, 통증 및 종창, 또는 (v) 비히스타민 매개 부종인, 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 대상체는 상기 샘플이 수집되는 때에 상기 pKa1 매개 장애의 증상을 갖지 않거나, 상기 pKa1 매개 장애의 증상의 병력을 갖지 않거나, 또는 pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않는, 방법.

청구항 16

제3항에 있어서, 상기 개열된 HMWK의 백분율이 결정되고, 상기 대상체는 pKa1 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로서 확인되며, 치료 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 상기 개열된 HMWK의 백분율의 감소는 상기 치료가 상기 대상체에서 효과적이라는 것을 나타내는, 방법.

청구항 17

제3항 또는 제16항에 있어서, 상기 치료는 pKa1 저해제를 포함하는, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 pKa1 저해제는 DX-88, EPIKAL-2 또는 DX-2930인, 방법.

청구항 19

대상체의 pKa1 매개 질환을 치료하는데 사용하기 위한 약제학적 조성물로서,

상기 조성물은 pKal 저해제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하되,
 상기 대상체는 기준값으로부터 벗어나는, 개열된 HMWK의 값, 온전한 HMWK의 값 또는 둘 다를 가지고,
 상기 대상체는 기준값 위의 개열된 HMWK의 값을 가지며,
 상기 pKal 저해제는 DX-2930, DX-88, 또는 EPIKAL-2인, 약제학적 조성물.

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호참조

[0002] 본원은 미국 가출원 제61/754,607호(2013년 1월 20일 출원)의 출원일의 이익을 주장한다. 상기 가출원의 전체 내용은 본 명세서에 참조문헌으로 포함된다.

배경 기술

[0003] 혈장 칼리크레인(plasma kallikrein: pKal)은 순환에서 주요 브래디키닌 생성 효소이다. pKal의 활성화는 유전성 혈관 부종(hereditary angioedema: HAE)과 연관된 질환 병리에 관련된 접촉 시스템을 통해 발생한다. 브래디키닌은 통증, 염증, 부종 및 혈관신생의 주요 매개자이다.

[0004] 키니노젠은 브래디키닌 및 칼리크레인과 같은 키닌의 전구체이다. 스플라이싱 변이체인 고분자량 키니노젠(high molecular-weight kininogen: HMWK) 및 저분자량 키니노젠(low molecular-weight kininogen: LMWK)의 2종의 인간 키니노젠이 존재한다. HMWK는 응고 및 염증에 대한 보조인자로서 주로 작용하고, pKal 매개 브래디키닌 생성에 대한 바람직한 기질이다. HMWK 및 LMWK 둘 다 시스테인 프로테아제 저해제이다.

발명의 내용

[0005] 혈장 칼리크레인(pKal)은 접촉 시스템의 세린 프로테아제 성분이고, 순환에서 주요 브래디키닌 생성 효소이다. 접촉 시스템은 외래 또는 음으로 하전된 표면에 노출 시 XIIa 인자에 의해 또는 프롤릴카복시펩티다제에 의해 내피 세포 표면 상에 활성화된다(Sainz I.M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007). 혈장 칼리크레인의 활성화는 XII 인자의 이의 피드백 활성화를 통해 내재 응고를 증폭시키고, 전염증성 노나펩타이드 브래디키닌의 생성을 통해 염증을 증대시킨다. 순환에서 주요 키니노겐가제로서, pKal은 맥관구조에서의 브래디키닌의 생성을 주로 담당한다. 혈장 칼리크레인의 주요 천연 저해제인 C1-저해제 단백질(C1-INH)의 유전자 결핍증은 유전성 혈관 부종(HAE)을 발생시킨다. HAE를 갖는 환자는 미공지 촉발 인자가 대개 참여하는 통증 있는 부종의 급성 공격을 겪는다(Zuraw B.L. et al., N Engl J Med 359, 1027-1036, 2008). 동물 모델에서의 약동학적 물질의 사용 또는 유전자 연구를 통해, 혈장 칼리크레인-키닌 시스템(plasma kallikrein-kinin system: 혈장 KKS)은 다양한 질환에 연류된다.

[0006] 본 명세서에 기재된 바대로, 온전한 키니노젠 또는 개열된 키니노젠 중 어느 하나에 특이적으로(예를 들어, 우선적으로) 결합하고, 임의로 LMWK에 결합하지 않는 검출 시약(예를 들어, 항체)을 사용하여 온전한(1-사슬) 및 개열된(2-사슬) 고분자량 키니노젠(HMWK)의 검출을 위해 웨스턴 블롯 검정을 개발하였다. 이러한 검출 시약을 사용하여 환자 혈장에서의 1-사슬 및 2-사슬 HMWK의 상대 양을 모니터링할 수 있다. 이 방법을 적용함으로써, 과도한 pKal 활성화에 의해 매개되는 것으로 공지된 질환 상태, 예컨대 부종성 HAE 공격에서 환자 샘플에서의 개열된 키니노젠의 수치(예를 들어, 백분율)가 상승하는 것으로 밝혀졌다. 다른 질환을 갖는 환자의 혈장에서의 개열된 키니노젠의 백분율을 후속하여 시험하여 활성 pKal이 그 질환과 연관되는지를 결정할 수 있다. 시험되고 건강한 혈장에 비해 개열된 키니노젠 상승을 갖는 것으로 밝혀진 다른 질환은 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis: RA), 궤양성 대장염(ulcerative colitis: UC) 및 크론병을 포함한다.

[0007] 따라서, 본 개시내용의 일 양상은 pKal 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 대상체를 확인하는 방법에 관한 것이고, 상기 방법은 (a) 예를 들어, 웨스턴 블롯 검정을 통해 대상체의 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)에서 개열된 키니노젠(예를 들어, HMWK)의 수치 및 온전한 키니노젠(예를 들어, LMWK)의 수치를 측정하는 단계; (b) 샘플에서 개열된 키니노젠의 값(예를 들어, 백분율), 온전한 키니노젠(예를 들어, LMWK)의 값 또는 둘 다를 결정하는 단계; 및 (c) 개열된 키니노젠의 값, 온전한 키니노젠의 값 또는 둘 다가 기준값으로부터 벗어나는 경우, pKal 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로서 대상체를 확인하는 단계를 포함한다. 몇몇 예에서, 개열된 키니노젠의 백분율이 결정되고, 샘플에서 개열된 키니노젠의 백분율이 기준값이거나 이보다 높은 경우, 대상체는 표적 질환의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로서 확인된다.

[0008] 몇몇 실시형태에서, 개열된 키니노젠 또는 온전한 키니노젠 중 어느 하나에 특이적으로(예를 들어, 우선적으로) 결합하는 검출제(예를 들어, 항체)에 의해 개열된 키니노젠의 수치 및 온전한 키니노젠의 수치가 측정된다. 이

러한 검출제(예를 들어, 항체)는 온전한 키니노겐 및 개열된 키니노겐 둘 다에 결합할 수 있지만, LMWK에 결합하지 않는다. 다른 실시형태에서, 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하거나 개열된 키니노겐과 비교하여 온전한 키니노겐에 특이적으로 결합하는 검출제(예를 들어, 항체)에 의해 개열된 키니노겐의 수치 및 온전한 키니노겐의 수치를 측정한다. 일 예에서, 검출 시약은 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하는 항체이다. 또 다른 예에서, 검출제는, LMWK에 존재하지 않는, 개열된 키니노겐의 경쇄의 C 말단에 결합하는 항체이다.

[0009] pKa1 매개 장애는 유전성 혈관 부종(HAE), 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염 또는 크론병일 수 있다. 대상체가 pKa1 매개 장애의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로서 확인된 경우, 본 명세서에 기재된 방법은 유효량의 pKa1 저해제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 예에서, pKa1 저해제는 DX-88, EPIKAL-2 또는 DX-2930이다.

[0010] 몇몇 실시형태에서, 샘플은 부종, 종창의 재발성 공격, 종창(여기서, 상기 종창은 완전히 또는 주로 말초임), 두드러기, 충혈, 통증 및 감염의 증거의 부재 하의 종창; 또는 비히스타민 매개 부종(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 pKa1 매개 장애의 증상을 갖는 대상체로부터 얻어진다. 다른 실시형태에서, 샘플은 샘플이 수집되는 때에 pKa1 매개 장애의 증상을 갖지 않거나, pKa1 매개 장애의 증상의 병력을 갖지 않거나, pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않는 대상체로부터 얻어진다. 대안적으로 또는 추가로, 대상체는 항히스타민 치료제, 코르티코스테로이드 치료제 또는 둘 다에 내성을 나타낸다.

[0011] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 장애가 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인지를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 장애를 갖는 대상체의 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)에서 개열된 키니노겐(예를 들어, HMWK)의 수치 및 온전한 키니노겐(예를 들어, HMWK)의 수치를 측정하는 단계; (b) 샘플에서 개열된 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율), 온전한 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율) 또는 둘 다를 결정하는 단계; 및 (c) 개열된 키니노겐의 값, 온전한 키니노겐의 값 또는 둘 다가 기준값으로부터 벗어나는 경우, 이 장애가 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인 것으로서 확인하는 단계를 포함한다. 일 예에서, 개열된 키니노겐의 백분율이 결정되고, 개열된 키니노겐의 백분율이 기준값이거나 이보다 높은 경우, 이 질환은 치료에 감수성인 것으로서 확인된다.

[0012] 몇몇 실시형태에서, 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하거나 개열된 키니노겐과 비교하여 온전한 키니노겐에 특이적으로 결합하는 검출제(예를 들어, 항체)에 의해 개열된 키니노겐의 수치 및 온전한 키니노겐의 수치를 측정한다. 몇몇 예에서, 검출 시약은 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하는 항체이다. 다른 예에서, 검출 시약은 개열된 키니노겐의 경쇄의 C 말단에 결합하는 항체이다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 온전한 키니노겐의 수치 및 개열된 키니노겐의 수치를 웨스턴 블롯 검정에 의해 측정할 수 있다.

[0013] 이 장애가 pKa1 저해제의 치료에 감수성인 것으로서 확인되는 경우, 상기 방법은 DX-88, EPIKAL-2 또는 DX-2930(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는 유효량의 pKa1 저해제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0014] 훨씬 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 대상체에서 pKa1 매개 장애의 치료를 평가하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 치료 전에 및 후에 또는 치료의 과정 동안에 대상체로부터 수집된 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)에서 개열된 키니노겐(예를 들어, HMWK)의 수치 및 온전한 키니노겐(예를 들어, HMWK)의 수치를 측정하는 단계; (b) 동일한 샘플에서 개열된 키니노겐의 수치 및 온전한 키니노겐의 수치에 기초하여 각각의 샘플에서 개열된 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율), 온전한 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율) 또는 둘 다를 결정하는 단계; 및 (c) 치료 전에 및 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 값의 변화에 기초하여 치료의 유효성을 평가하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 치료 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 개열된 키니노겐 백분율의 감소는 치료가 대상체에서 효과적이라는 것을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 치료는 유효량의 pKa1 저해제, 예를 들어 DX-88, EPIKAL-2 또는 DX-2930을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0015] 본 명세서에 기재된 임의의 평가 방법에서, 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하거나, 개열된 키니노겐과 비교하여 온전한 키니노겐에 특이적으로 결합하는 검출제(예를 들어, 항체)에 의해 개열된 키니노겐의 수치 및 온전한 키니노겐의 수치를 측정할 수 있다. 몇몇 예에서, 검출 시약은 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하는 항체이다. 다른 예에서, 검출제는 개열된 키니노겐의 경쇄의 C 말단에 결합하는 항체이다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서, 온전한 키니노겐의 수치 및 개열된 키니노겐의 수치를 웨스턴 블롯 검정에 의해 측정할 수 있다.

- [0016] 몇몇 실시형태에서, pKa1 매개 장애는 유전성 혈관 부종(HAE), 류마티스성 관절염, 궤양성 대장염 또는 크론병이다.
- [0017] 추가로, 본 개시내용은 샘플에서 개열된 키니노겐의 값, 온전한 키니노겐의 값 또는 둘 다를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 검출제와 온전한 키니노겐 및 개열된 키니노겐 사이의 상호작용을 허용하는 조건 하에 온전한 키니노겐 및 개열된 키니노겐을 함유하는 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)을 검출 시약과 접촉시키는 단계(여기서, 검출제는 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하거나, 개열된 키니노겐과 비교하여 온전한 키니노겐에 특이적으로 결합함); (b) 검출 시약과 이들의 상호작용에 기초하여 샘플에서 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 수치를 측정하는 단계; 및 (c) 개열된 키니노겐의 수치 및 온전한 키니노겐의 수치에 기초하여 샘플에서 개열된 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율), 온전한 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율) 또는 둘 다를 결정하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 검출 시약은 항체, 예컨대 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합하는 항체 또는 개열된 키니노겐의 경쇄의 C 말단에 결합하는 항체이다. 몇몇 실시형태에서, 온전한 키니노겐 및 개열된 키니노겐의 양을 웨스턴 블롯 검정에 의해 측정한다.
- [0018] 본 개시내용의 범위 내에 (i) 본 명세서에 기재된 바와 같은 유효량의 pKa1 저해제를 pKa1 매개 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 pKa1 매개 질환을 치료하는 방법(여기서, 대상체는 기준값으로부터 벗어나는 개열된 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율), 온전한 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율) 또는 둘 다를 가짐), (ii) 대상체의 pKa1 매개 질환을 치료하기 위한 용도에서의 약제학적 조성물(여기서, 상기 조성물은 pKa1 저해제 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하고, 대상체는 기준값과 비교하여 편차가 있는 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 값을 가짐), 및 (iii) pKa1 매개 질환, 예를 들어 HAE를 치료하기 위한 용도에서의 약제를 제조하기 위한 약제학적 조성물의 용도가 또한 있다. 몇몇 실시형태에서, 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 값은 샘플에서 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 백분율이다.
- [0019] 하기 실시형태는 또한 본 개시내용의 범위 내에 있다:
- [0020] 본 명세서에 대상체, 예를 들어 pKa1 매개 또는 브래디키닌 매개 장애의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체를 평가하는 방법이 제공된다. 혈장 칼리크레인 매개 혈관 부종(KMA), 또는 평가 및 치료에서 유용한 pKa1에 의한 매개된 다른 질환을 갖는 환자의 분석을 허용하는 방법이 제공된다.
- [0021] 본 개시내용의 실시형태는 예를 들어 혈장 칼리크레인에 의해 생성된 브래디키닌에 의해 야기된 부종을 앓고 있는 환자의 확인 및 치료에서의 바이오마커 및 이의 용도를 제공한다. 본 명세서에 개시된 방법, 조성물 및 장치는 다수의 방식에서 유용하다. 예를 들어, 상승한 접촉 시스템 활성화와 연관된 장애를 확인하기 위해 pKa1 마커의 수치를 이용할 수 있다. 초기 스크리닝은 예를 들어 질환의 전임상 모델에서 혈장 칼리크레인 저해제(예를 들어, DX-88, EPIKAL2 또는 DX-2930)에 의한 실험실내 또는 생체내 시험에 의해 추적관찰될 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 또한 약동학적 바이오마커로서 또는 그렇지 않으면 칼리크레인 저해제에 대한 대상체의 반응을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 혈장 칼리크레인에 의해 매개된 질환의 치료가 가능하게 하고, pKa1 매개 또는 브래디키닌 매개 장애, 예를 들어 HAE, 비히스타민 의존적 특발성 혈관 부종, 류마티스성 관절염, 크론병, 궤양성 대장염, 루푸스, 알츠하이머병, 패혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/관류 손상, 대뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 허파관 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 점막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관 부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 패혈증, 급성 중대뇌 동맥(middle cerebral artery: MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 전신성 홍반성 낭창 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스폴딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 과민증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안 증후군, 만성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)의 예방학적 치료 동안 투약을 조절하도록 하는 동반 진단에서 사용될 수 있다.
- [0022] 본 개시내용은, 본 명세서에 개시된 pKa1 활성화와 상관된 하나 이상의 마커(pKa1 마커), 예를 들어 온전한 키니노겐의 수치 및 개열된 키니노겐의 수치를 획득하고, 예를 들어 결정하여, 상기 대상체를 평가하거나 치료하는 단계를 포함하는, 대상체를 평가하거나 치료하는 방법, 예를 들어 히스타민 매개 장애로부터 pKa1 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 혈관 부종을 구별하거나, pKa1 매개 장애의 추가의 공격을 예측하는 방법을

제공한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 히스타민 매개 염증성 반응과 상관된 하나 이상의 마커(H-마커), 예를 들어 트립타제의 수치를 획득하는, 예를 들어 검출하는 단계를 포함한다.

[0023] 몇몇 실시형태에서, 상기 pKaI 매개 장애는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 pKaI 매개 장애는 비히스타민 의존적 특발성 혈관 부종, 류마티스성 관절염, 크론병, 궤양성 대장염, 루푸스, 알츠하이머병, 패혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/관류 손상, 대뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 해파린 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 점막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관 부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 패혈증, 급성 중대 뇌 동맥(MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 전신성 홍반성 낭창 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스폴딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 과민증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안 증후군, 만성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)으로부터 선택된다.

[0024] 본 개시내용은 또한 pKaI 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 혈관 부종 및 히스타민 관련 장애 둘 다와 일치하는 증상을 갖는 대상체를 평가하거나 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 a) 임의로, 상기 대상체가 pKaI 매개 장애 및 히스타민 관련 장애 중 하나 또는 둘 다와 일치하는 부종 또는 복부 불편과 같은 증상을 갖는지를 결정하는 단계; b) 상기 대상체가 상기 증상에 대해 항히스타민 치료제에 의해 치료되지 않는 경우, 상기 대상체를 항히스타민 치료제에 의해 치료하는 단계; c) pKaI 활성화와 상관된 하나 이상의 마커(pKaI 마커), 예를 들어 온전한 키니노젠 및 개열된 키니노젠의 수치를 획득하는, 예를 들어 검출하는 단계; d) 상기 수치가 미리 결정된 기준을 만족시키는 경우, 예를 들어 이것이 기준 수치이거나 이보다 큰 경우, 칼리크레인 저해제 치료에 대해 대상체를 선택하거나, 칼리크레인 저해제를 상기 대상체에게 투여하여, 상기 대상체를 평가하거나 치료하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 칼리크레인 저해제 치료에 대해 대상체를 선택하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 칼리크레인 저해제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 칼리크레인 저해제 치료에 대해 대상체를 선택하거나, 칼리크레인 저해제를 상기 대상체에게 투여하는 단계는 대상체가 상기 항히스타민 치료제에 비반응성이라는 결정 전에 발생하고, 예를 들어 항히스타민 치료제에 의한 상기 치료의 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간 또는 10시간 내에 발생한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 대상체가 pKaI 매개 장애 및 히스타민 관련 장애 둘 다와 일치하는 증상을 갖는다는 것을 결정하는 단계 및 pKaI 마커의 수치를 결정하기 위해 상기 환자로부터 샘플을 획득하는 단계는 서로에 대한 30분, 1시간, 2시간 또는 3시간 내에; 또는 건강관리 제공자에 대한 동일 방문 시에 발생한다.

[0025] 몇몇 실시형태에서, 상기 pKaI 저해제는 DX-88, DX-2930 또는 EpiKaI-2로부터 선택된다.

[0026] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 히스타민 매개 염증성 반응과 상관된 하나 이상의 마커(H-마커)의 수치를 획득하는, 예를 들어 결정하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 pKaI 매개 장애에 대해 감수성인지 평가된다. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 예를 들어 pKaI 매개 장애와 일치하는 증상, 예를 들어 부종, 예를 들어 HAE를 갖는다. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 원치 않는 pKaI 활성화를 특징으로 하는 장애의 증상을 갖고, 상기 대상체는 항히스타민 치료제가 투여된다. 특정한 실시형태에서, 상기 항히스타민 치료제는 본 명세서에 개시된 바대로 결정 단계 전에 또는 후에 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 8시간 또는 10시간 내에 투여된다. 특정한 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 본 명세서에 개시된 바대로 평가 또는 결정 전에, 후에 또는 동안에 항히스타민 치료제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0027] 몇몇 실시형태에서, 상기 결정 또는 평가에 반응하여, 칼리크레인 저해제를 상기 대상체에게 투여한다. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 하기 증상 또는 특성 중 하나 이상 또는 모두를 갖거나, 항히스타민 또는 코르티코스테로이드 치료제에 반응하지 않거나; 비히스타민 매개 부종을 갖는다: 종창의 재발성 공격; 종창(여기서, 상기 종창은 완전히 또는 주로 말초이고, 예를 들어, 대상체는 상당한 복부 또는 기도 종창을 갖지 않음); 두드러기; 충혈, 통증 및 감염의 증거의 부재 하의 종창. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 지속성 또는 재발성 부종을 갖고, 항히스타민 및 스테로이드 치료제 중 하나 또는 둘 다에 비반응성이다. 소정의 실시형태에서, 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKaI 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKaI 매개 장애의 병력을 갖고, 대상체는 HAE의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE의 병력을

갖거나; 대상체는 IAE의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 IAE의 병력을 갖거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 갖거나; 대상체는 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖거나: 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖는다.

[0028] 몇몇 실시형태에서, 대상체는 예를 들어 HAE에 대한 예를 들어 예방학적 치료에서 칼리크레인 저해제에 의해 치료되고, 칼리크레인 저해제에 대한 대상체의 반응은 평가되거나 모니터링되고, 임의로, 상기 모니터링에 반응하여, 치료가 선택되거나 투여되고, 예를 들어 결정에 반응하여, 칼리크레인 저해제의 투약량은 조정된다. 몇몇 실시형태에서, pKa1 마커의 결정은 동반 진단의 상황에서 수행되고, 임의로, 치료제의 투여는 결정에 기초하여 주어지거나 보류된다. 소정의 실시형태에서, 상기 치료에 대한 반응성은 임박한 급성 공격, 예를 들어 HAE 또는 IEA 공격을 확인하는 것에 따라 달라진다. 특정한 실시형태에서, 상기 대상체는 특발성 혈관 부종에 대한 감수성에 대해 평가된다. 특정한 실시형태에서, 상기 평가는 상기 대상체가 pKa1 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 장애, 예를 들어 pKa1 매개 혈관 부종 또는 히스타민 매개 장애, 예를 들어 알레르기 식품 반응을 앓고 있는지를 결정하는 단계를 포함한다.

[0029] 몇몇 실시형태에서, 대상체는 HAE 또는 IAE와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 HAE 또는 IAE와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖고, 대상체는 HAE의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE의 병력을 갖거나; 대상체는 IAE의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 IAE의 병력을 갖거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 갖거나; 대상체는 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖지 않고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖거나: 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS와 같은 pKa1 매개 장애의 병력을 갖고, 식품 알레르기와 같은 히스타민 매개 장애의 병력을 갖는다.

[0030] 몇몇 실시형태에서, pKa1 마커, 예를 들어 본 명세서에 개시된 pKa1 마커는 항체 기반 시약에 의해 검출된다. 소정의 실시형태에서, pKa1 마커는 샌드위치 면역검정에 의해 검출된다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 전기영동 분리 검정, 예를 들어 웨스턴 블롯에 의해, 예를 들어 키니노젠, 예를 들어 온전한 키니노젠 또는 개열된 키니노젠 중 하나 또는 둘 다의 수치를 획득하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, pKa1 마커, 예를 들어 키니노젠은 예를 들어 다른 생성물로부터 분석물질의 웨스턴 블롯에 의한, 분리, 예를 들어 전기영동 분리에 의존하는 검정에서 검출된다.

[0031] 몇몇 실시형태에서, pKa1 마커는 샌드위치 면역검정에 의해 검출되고, 제2 pKa1 마커, 예를 들어 키니노젠은 예를 들어 다른 생성물로부터 분석물질의 웨스턴 블롯에 의한, 분리, 예를 들어 전기영동 분리에 의존하는 검정에서 검출된다. 소정의 실시형태에서, pKa1 마커의 검출은 정성적이다. 소정의 실시형태에서, pKa1 마커의 검출은 정량적이다. 특정한 실시형태에서, 온전한 키니노젠의 수치 및 개열된 키니노젠의 수치를 각각 검출한다.

[0032] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 pKa1 마커, 예를 들어 온전한 키니노젠 또는 개열된 키니노젠의 수치를 기준값과 비교하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준값은 예를 들어 하나 이상의 HAE 대상체에서 HAE에서의 상기 pKa1 마커의 수치의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준값은 급성 공격 동안, 예를 들어 하나 이상의 HAE 대상체에서 공격 동안 HAE에서의 상기 pKa1 마커의 수치의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준값은 예를 들어 하나 이상의 IAE 대상체에서 IAE에서의 pKa1 마커의 수치의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준값은 급성 공격 동안, 예를 들어 하나 이상의 IAE 대상체에서 급성 공격 동안 IAE에서의 pKa1 마커의 수치의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준값은 예를 들어 HAE 또는 IAE의 병력을 갖지 않는 하나 이상의 대상체에서 HAE 또는 IAE의 부재 하의 pKa1 마커의 수치의 함수이다.

[0033] 특정한 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 비교에 반응하여 대상체를 분류하는 단계, 예를 들어 pKa1 매개

장애에 대한 위험에 대해 대상체를 분류하는 단계 또는 상기 대상체로부터 치료제를 투여하거나 보류하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 비교에 반응하여 상기 대상체에 대해 치료제를 선택하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 비교에 반응하여 상기 대상체로부터 치료제, 예를 들어 칼리크레인 결합제; 브래디키닌 B2 수용체 길항제; 또는 C1-INH 대체 물질을 투여하거나 보류하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 상기 치료제는 pKa1 저해제, 예를 들어 DX-88; EpiKa1-2 및 DX-2930으로부터 선택되는 pKa1 저해제의 투여이다.

[0034] 몇몇 실시형태에서, 상기 대상체로부터의 샘플은 2개 이상의 마커, 예를 들어 pKa1 마커 또는 H 마커에 대한 포획 물질, 예를 들어 항-H 마커 항체를 포함하는 기질과 접촉하고; 임의로, 적어도 하나의 포획 물질은 pKa1 마커에 대한 포획 물질이다.

[0035] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 상기 대상체로부터 샘플, 예를 들어 혈액 또는 혈장 샘플을 획득하는 단계를 포함한다.

[0036] 몇몇 실시형태에서, (제1 마커에 대한) 제1 포획 물질 및 (제2 마커에 대한) 제2 포획 물질은 제1 마커의 존재에 대한 신호가 제2 마커의 존재에 대한 신호와 구별될 수 있도록 기질에 배치된다. 소정의 실시형태에서, (제1 마커에 대한) 상기 제1 포획 물질은 제1 위치 또는 주소에 위치하고, (제2 마커에 대한) 상기 제2 포획 물질은 제2 위치 또는 주소에 위치한다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 위치 또는 주소 및 상기 제2 위치 또는 주소는 상기 기질과 중첩하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 포획 물질은 제1 pKa1 마커에 대한 것이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 포획 물질은 제1 pKa1 마커에 대한 것이고, 상기 제2 포획 물질은 제2 pKa1 마커에 대한 것이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 포획 물질은 pKa1 마커에 대한 것이고, 상기 제2 포획 물질은 H-마커에 대한 것이다.

[0037] 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 기질을 검출 가능한, 예를 들어 항체와 접촉시켜 pKa1 마커의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 항체는 착색된 생성물을 생성하거나, 광자를 방출하거나, 광자를 흡수하거나, 기질을 변경하거나, 기질의 전도율을 변경하는 모이어티에 의해 표지된다. 소정의 실시형태에서, 상기 항체는 전기화학발광을 이용하는 모이어티에 의해 표지된다. 소정의 실시형태에서, 상기 항체는 레지움에 의해 표지된다. 특정한 실시형태에서, 상기 기질은 메조 스케일 디스커버리 장치(meso scale discovery device)에서 제공된다. 특정한 실시형태에서, 상기 기질은 혈액 및 혈장 중 하나 또는 둘 다와 사용하기에 적합한 딥-스틱 장치(dip-stick device)로서 제공된다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 포획 물질 및 상기 제2 포획 물질은 공통 또는 유체 연결 챔버, 예를 들어 챔버, 예를 들어 웰 또는 오목부(depression), 멀티 챔버 장치, 예를 들어 다중웰 플레이트에 배치된다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 포획 물질 및 상기 제2 포획 물질은 기질에 인쇄된다.

[0038] 몇몇 실시형태에서, 제1 pKa1 마커에 대한 상기 포획 물질은 상기 기질 상의 제1 위치에 있고, 제2 pKa1 마커에 대한 상기 포획 물질은 상기 기질 상의 제2 위치에 있고, 상기 제1 위치 및 제2 위치는 제1 pKa1 마커의 존재에 대한 신호가 제2 pKa1 마커에 대한 신호로부터 구별될 수 있도록 상기 기질에 배치된다. 소정의 실시형태에서, 상기 기질은 제3 위치에서 제3 마커에 대한 포획 물질을 포함하고, 제3 위치는 제3 마커의 존재에 대한 신호가 상기 제1 마커 및 제2 마커로부터의 신호로부터 구별될 수 있도록 상기 기질에 배치된다.

[0039] 몇몇 실시형태에서, 기질과 상기 샘플의 접촉의 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 또는 5시간 내에 샘플에서의 pKa1 마커의 수치를 결정할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 기질과 상기 샘플의 접촉의 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 또는 5시간 내에 샘플에서의 2개의 pKa1 마커의 수치를 결정할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 2개의 pKa1 마커의 수치의 결정은 동시에 수행된 검정에서 이루어지고, 예를 들어 항온처리 또는 시험에 대한 다른 간격은 서로 중첩한다.

[0040] 또 다른 양상에서, 본 발명은 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 복수의 pKa1 마커에 대한 포획 물질을 포함하는 기질을 제공한다.

[0041] 추가의 양상에서, 본 발명은 장애가 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인지를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 예를 들어 상기 장애를 앓고 있는 대상체 또는 상기 장애에 대한 동물 모델에서 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나의 또는 복수의 pKa1 마커의 수치를 평가하는 단계; 결정된 수치를 기준과 비교하는 단계 (여기서, 미리 결정된 기준을 만족시키는 수치(예를 들어, 이것이 기준 수치이거나 이보다 높은 경우)는 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인 장애를 나타냄)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 실험실내 또는 생체내 또는 상기 장애의 동물 모델에서 칼리크레인 저해제의 영향을 평가하는 단계를 포함한다.

- [0042] 또 다른 양상에서, 본 발명은 pKa1 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 예를 들어 본 명세서에 기재된 방법에 의해 본 명세서에 기재된 pKa1 마커의 수치를 평가하는 단계, 결정하는 단계 및 상기 평가에 반응하여 치료를 선택하는, 예를 들어 칼리크레인 저해제의 투약량 또는 투약 빈도 중 하나 또는 둘 다를 선택하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 칼리크레인 저해제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 환자는 상기 평가 전에 칼리크레인 저해제가 투여된다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 선택되는 투약량 또는 빈도로 칼리크레인 저해제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0043] 추가의 양상에서, 본 발명은 장애가 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인지를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 예를 들어 상기 장애를 앓고 있는 대상체 또는 상기 장애에 대한 동물 모델에서 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나의 또는 복수의 pKa1 마커의 수치를 평가하는 단계; 결정된 수치를 기준과 비교하는 단계 (여기서, 미리 결정된 기준을 만족시키는 수치(예를 들어, 이것이 기준 수치이거나 이보다 높은 경우)는 pKa1 저해제에 의한 치료에 감수성인 장애를 나타냄)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 실험실내 또는 생체내 또는 상기 장애의 동물 모델에서 칼리크레인 저해제의 영향을 평가하는 단계를 포함한다.
- [0044] 또 다른 양상에서, 본 발명은 최소 접촉 활성화에 의해 샘플, 예를 들어 혈액의 수집을 위한 방법 및 장치를 특징으로 한다. 일 실시형태에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 포획 시약, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 예를 들어 DX-88과 서열이 유사한 폴리펩타이드, 예를 들어 1개, 2개 또는 5개 이하의 아미노산 잔기로 DX-88과 다른 것, 예를 들어 EPIKAL-2가 내부에 배치된 용기를 특징으로 한다. 용기는 동일한 용기에서 대상체로부터의 샘플, 예를 들어 혈액의 수집 및 샘플에서의 pKa1 관련 마커, 예를 들어 pKa1과 포획 시약의 결합을 허용하도록, 예를 들어 아퍼처(aperture), 개구, 격막 등에 의해 구성된다. 결합 중, 예를 들어 pKa1의 측정을 동일한 용기에서 수행할 수 있거나, 실시형태에서, 기질은 측정에 대한 이전의 용기로부터 제거되고, 예를 들어 측정은 또 다른 장치 내에 또는 상에 있을 수 있다. 실시형태에서, 용기의 용적은 0.5 내지 100, 0.5 내지 50, 0.5 내지 10, 1 내지 100, 1 내지 50, 또는 1 내지 25ml이다. 일 실시형태에서, 포획 시약, 예를 들어 pKa1 포획 시약은 용기의 내면에 배치된다. 포획 시약은 표면에 결합된 제1 특이적 결합 파트너 및 포획 시약에 커플링된 제2 특이적 결합 파트너에 의해 표면에 커플링될 수 있다. 특이적 결합 파트너의 예는 바이오틴 및 아비딘이다. 일 실시형태에서, 바이오티닐화 포획 시약, 예를 들어 pKa1 포획 시약, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 예를 들어 DX-88과 서열이 유사한 폴리펩타이드, 예를 들어 1개, 2개 또는 5개 이하의 아미노산 잔기로 DX-88과 다른 것, 예를 들어 Epikal-2는 아비딘으로 코팅된 용기의 표면에 배치된다.
- [0045] 본 개시내용은 혈장 칼리크레인 매개 혈관 부종(KMA), 또는 평가 및 치료에서 유용한 pKa1에 의해 매개되는 다른 질환을 갖는 환자를 확인할 수 있는 바이오마커를 제공한다.
- [0046] 바이오마커를 통해 pKa1 활성화를 나타내는 것으로 밝혀진 환자는 급성 부종성 공격 연관 HAE의 치료에 대해 승인받은 pKa1의 작은 단백질 저해제인 DX-88과 같은 pKa1 저해제에 의한 치료에 대한 후보이다. 다른 pKa1 저해제는 완전 인간 항체 저해제인 DX-2930을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 바이오마커를 통해 pKa1 활성화를 나타내는 것으로 밝혀진 환자는 브래디키닌 B2 수용체 길항제, 예를 들어 인카티반트(Incatibant)(Firazyr(등록상표))에 의한 치료에 대한 후보이다. 몇몇 실시형태에서, 바이오마커를 통해 pKa1 활성화를 나타내는 것으로 밝혀진 환자는 C1-INH 대체 물질, 예를 들어 정제된 인간 살균 나노여과 C1-INH 농축물(베리너트(Berinert)(등록상표))에 의한 치료에 대한 후보이다.
- [0047] 본 발명의 실시형태는 환자, 예를 들어 혈장 칼리크레인에 의해 생성된 브래디키닌에 의해 야기된 부종을 앓고 있는 환자의 확인 및 치료에서의 바이오마커 및 이의 용도를 제공한다. 본 명세서에 개시된 방법, 조성물 및 장치는 다수의 방식에서 유용하다. 예를 들어, 상승한 접촉 시스템 활성화와 연관된 장애를 확인하기 위해 pKa1 마커의 수치를 이용할 수 있다. 초기 스크리닝은 예를 들어 질환의 전임상 모델에서 혈장 칼리크레인 저해제(예를 들어, DX-88, EPIKAL2 또는 DX-2930)에 의한 실험실내 또는 생체내 시험에 의해 추적관찰될 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 또한 약동학적 바이오마커로서 또는 그렇지 않으면 칼리크레인 저해제에 대한 대상체의 반응을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 혈장 칼리크레인에 의해 매개된 질환의 치료가 가능하게 하고, HAE의 예방학적 치료 동안 투약을 조절하거나, 임박한 급성 HAE 공격을 확인하도록 동반 진단에서 사용될 수 있다.
- [0048] 본원 및 이하에 기재된 것에 걸쳐 인용된 참조 문헌, 등록 특허, 공개 또는 비공개 특허 출원을 포함하는 모든 인용된 문헌의 내용은 본 명세서에 언급된 목적 또는 대상을 위해 본 명세서에 명확히 참조문헌으로 그 전문이 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0049]

도 1은 혈장 칼리크레인의 접착 시스템 활성화와 관련된 부재의 도시이다.

도 2는 웨스턴 블롯 분석에 의한 개열된 키니노젠 검출을 나타낸다. 환원 조건 하에 SDS-PAGE(3-8% 트리스-아세트레이트)를 사용하여 샘플을 분석하고, PVDF 막으로 옮기고 면역블로팅한다. 1 레인 - 50nM 온전한 키니노젠; 2 레인 - 50nM 개열된 키니노젠; 3 레인 - 50nM 저분자량 키니노젠; 4 레인 - 1:20 시트르산나트륨 인간 혈장(유리 수집관); 5 레인 - 1:20 시트르산나트륨 인간 혈장(플라스틱) 칼리크레인 처리됨; 6 레인 - 1:20 시트르산나트륨 인간 혈장(플라스틱); 7 레인 - 1:20 시트르산나트륨 인간 혈장(플라스틱) 20nM 2 사슬 키니노젠 첨가됨.

도 3은 공격 동안 관찰된 환자 샘플에서의 온전한 키니노젠(즉, 1-사슬)의 검출을 나타낸다. 항프로테아제 억제제를 함유하는 시트르산화 혈장 관에서 환자 혈장 샘플을 수집하였다.

도 4는 pK₁에 의한 개열 후의 1-사슬 HMWK 및 2-사슬 HMWK의 도메인 구조의 도식 및 개열된 키니노젠의 경쇄에 결합하는 항체를 사용한 HMWK의 사슬-1 및 사슬-2를 검출하는 웨스턴 블롯을 나타낸다. C1= 1-사슬 HMWK, C2 = 2-사슬 HMWK, G = 유리, P = 플라스틱.

도 5는 반정량적 검정으로서의 정제된 HMWK의 리코(LICOR) 검출을 나타낸다. 정제된 인간 HMWK 및 개열된 HMWK를 HMWK 결합 인간 혈장에서 9.0μg/ml 내지 5.6μg/ml로부터 적정하였다. 샘플을 TBS 및 샘플 로딩 완충제(DTT에 의해)로 1:20 희석하였다. 희석된 샘플을 4-12% 비스-트리스 겔 중에 실행하고, 전기영동 후, 나이트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 블로팅 후, 블롯을 마우스 항-인간 HMWK 항체(클론 11H05호)(이 항체는 HMWK의 경쇄에 특이적임) 및 염소 항마우스 IR 염료 680을 사용하여 가시화하였다. IR 염료 680의 여기 신호를 검출할 수 있는 리코 오디세이(Odyssey) IR 스캐너를 사용하여 겔을 스캐닝하였다.

도 6은 HAE 환자 샘플의 웨스턴 블롯 및 리코 분석을 나타내고, HAE 환자 샘플이 더 높은 내인성 수치의 개열된 HMWK를 나타낸다는 것을 입증한다. 기준 및 공격 HAE 환자 혈장 둘 다 리코(리코) 분석에 의해 비질환 상태 혈장과 비교하여 더 높은 백분율의 개열된 HMWK를 가졌다. 분석된 혈장 샘플을 항프로테아제 용액 중에 수집하였고, 이 용액은 동일한 수집 시간에 동일한 환자로부터의 시트르산나트륨 혈장 샘플과 비교할 때 추가의 접착 활성화로부터 HAE 환자 혈장을 보호하였다. 그래프에서의 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 7은 웨스턴 블롯 및 FXIIa 활성화 조건의 평가를 도시한 그래프를 나타낸다. 도 7a: 상이한 온도(얼음 대 37℃) 및 항온처리 시간(10분 대 30분)에서 상이한 농도의 FXIIa에 의해 활성화된 정상 인간 혈장의 리코 검출에 의한 웨스턴 블롯. 1 레인: 분자량 마커; 2 레인: 정제된 1-사슬 및 2-사슬 HMWK; 3 레인: 정상 인간 혈장; 4 레인: 37℃에서의 10분 동안 정상 인간 혈장 + 2.5nM FXIIa; 5 레인: 37℃에서의 30분 동안 정상 인간 혈장 + 2.5nM FXIIa; 6 레인: 얼음에서 10분 동안 정상 인간 혈장 + 2.5nM FXIIa; 7 레인: 얼음에서 30분 동안 정상 인간 혈장 + 2.5nM; 8 레인: 37℃에서 10분 동안 정상 인간 혈장 + 5nM FXIIa; 9 레인: 37℃에서 30분 동안 정상 인간 혈장 + 5nM FXIIa; 10 레인: 얼음에서 10분 동안 정상 인간 혈장 + 5nM FXIIa; 11 레인: 얼음에서 30분 동안 정상 인간 혈장 + 5nM FXIIa; 12 레인: 37℃에서 10분 동안 정상 인간 혈장 + 7.5nM FXIIa; 13 레인: 37℃에서 30분 동안 정상 인간 혈장 + 7.5nM FXIIa; 14 레인: 얼음에서 10분 동안 정상 인간 혈장 + 7.5nM FXIIa; 15 레인: 얼음에서 30분 동안 정상 인간 혈장 + 7.5nM FXIIa. 도 7b: 리코 신호 강도를 이용하여 결정된 각각의 레인에서의 2-사슬 HMWK의 백분율 [2-사슬 HMWK(%) = (46kDa 신호 + 56kDa 신호)/(46kDa 신호 + 56kDa 신호 + 110kDa 신호)].

도 8은 웨스턴 블롯 및 pK₁ 활성의 FXIIa 활성화에 대한 DX-88 및 DX-2930의 저해를 도시한 그래프를 나타낸다. 도 8a: 에칼란타이드(Ecallantide) 및 DX-2930이 생체외 인간 혈장에 첨가될 때 pK₁에 의한 HMWK의 개열을 저지한다는 것을 도시하는 웨스턴 블롯 분석. 도 8b: FXIIa의 존재 하의 개열된 HMWK의 생성에 대한 DX-88 및 DX-2930의 영향을 나타내는 차트. 혼주된 시트르산나트륨 인간 혈장을 1370 내지 34.3nM 범위의 농도의 DX-2930 또는 에칼란타이드로 예비처리하였다. 모든 샘플(비처리 샘플을 포함)을 2.5nM FXIIa의 첨가에 의해 활성화하였다. 이후, 프로테아제 저해제 각테일의 첨가에 의해 효소를 저해하였다. 동일 물 농도의 에칼란타이드 및 DX-2930은 비처리 혈장 샘플과 비교하여 혼주된 인간 혈장에서 개열된 HMWK의 양을 동등하게 감소시킨다. C = 25nM 1 및 2 사슬 HMWK; N = 정상 혈장; + = 활성화 인간 혈장(약물 무).

도 9는 궤양성 대장염(UC) 및 류마티스성 관절염(RA)을 갖는 환자에서의 접착 시스템 활성화의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 1 레인: 분자량 마커; 2 레인: 정제된 1-사슬 및 2-사슬 HMWK; 3 내지 5 레인: 정상 인간 혈장; 6 내지 10 레인: UC 환자로부터의 혈장; 11 내지 15 레인: RA 환자로부터의 혈장. 각각의 레인에서의 샘플에 관

한 추가의 상세내용은 표 3에 제공되어 있다.

도 10은 크론병(CD)을 갖는 환자에서의 접촉 시스템 활성화의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. 1 레인: 분자량 마커; 2 레인: 정제된 1-사슬 및 2-사슬 HMWK; 3 내지 5 레인: 정상 인간 혈장; 6 내지 10 레인: CD 환자로부터의 혈장. 각각의 레인에서의 샘플에 관한 추가의 상세내용은 표 4에 제공되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

편의를 위해, 본 발명의 추가의 설명 전에, 명세서, 실시예 및 청구범위에 사용된 소정의 용어가 본 명세서에 정의되어 있다. 다른 용어는 본 명세서에 나타난 것처럼 정의된다.

단수 형태 "일", "하나" 및 "이것"은 문맥이 명확히 다르게 나타내지 않는 한 복수 언급을 포함한다.

본 명세서에 사용된 바대로, "획득한다" 또는 "획득하는"은 예를 들어 물리적 집합체 또는 값을 "직접적으로 획득" 또는 "간접적으로 획득"함으로써 물리적 집합체 또는 값, 예를 들어 숫자 값의 보유를 얻는 것을 의미한다. "직접적으로 획득하는"은 물리적 집합체 또는 값을 얻기 위해 프로세스를 수행하는 것(예를 들어, 그 용어가 본 명세서에 정의된 바대로 샘플에서 검정 또는 시험을 수행하거나 "샘플을 분석하는" 것)을 의미한다. "간접적으로 획득하는"은 또 다른 당사자 또는 공급원(예를 들어, 물리적 집합체 또는 값을 직접적으로 획득한 제3 당사자 실험실)으로부터 물리적 집합체 또는 값을 수취하는 것을 의미한다. 물리적 집합체를 직접적으로 획득하는 것은 프로세스를 수행하는 것, 예를 들어 물리적 물질, 예를 들어 출발 물질의 물리적 변화를 포함하는 샘플을 분석하는 것을 포함한다. 예시적인 변화는 2개 이상의 출발 물질로부터 물리적 집합체를 만드는 것, 물질을 전단 또는 단편화시키는 것, 물질을 분리하거나 정제하는 것, 2개 이상의 별개의 집합체를 혼합물로 합하는 것, 공유 또는 비공유 결합을 파괴하거나 형성하는 것을 포함하는 화학 반응을 수행하는 것을 포함한다. 값을 직접적으로 획득하는 것은 샘플 또는 또 다른 물질의 물리적 변화를 포함하는 프로세스를 수행하는 것, 예를 들어 물질, 예를 들어 샘플, 분석물질 또는 시약의 물리적 변화를 포함하는 분석 프로세스(때때로 본 명세서에서 "물리적 분석"이라 칭함)를 수행하는 것, 분석 방법, 예를 들어 하기 중 하나 이상을 포함하는 방법을 수행하는 것을 포함한다: 또 다른 물질로부터 물질, 예를 들어 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 분리 또는 정제; 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 또 다른 물질, 예를 들어 완충제, 용매 또는 반응물과의 조합; 또는 예를 들어 분석물질의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경; 또는 예를 들어 시약의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 시약 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경.

본 명세서에 사용된 바대로, 샘플을 "분석하는" 것은 샘플 또는 또 다른 물질, 예를 들어 출발 물질의 물리적 변화를 포함하는 프로세스를 수행하는 것을 포함한다. 예시적인 변화는 2개 이상의 출발 물질로부터 물리적 집합체를 만드는 것, 물질을 전단 또는 단편화시키는 것, 물질을 분리하거나 정제하는 것, 2개 이상의 별개의 집합체를 혼합물로 합하는 것, 공유 또는 비공유 결합을 파괴하거나 형성하는 것을 포함하는 화학 반응을 수행하는 것을 포함한다. 샘플을 분석하는 것은 물질, 예를 들어 샘플, 분석물질 또는 시약의 물리적 변화를 포함하는 분석 프로세스(때때로 본 명세서에서 "물리적 분석"이라 칭함)를 수행하는 것, 분석 방법, 예를 들어 하기 중 하나 이상을 포함하는 방법을 수행하는 것을 포함할 수 있다: 또 다른 물질로부터 물질, 예를 들어 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 분리 또는 정제; 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 또 다른 물질, 예를 들어 완충제, 용매 또는 반응물과의 조합; 또는 예를 들어 분석물질의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경; 또는 예를 들어 시약의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 시약 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경.

용어 "효현제"는, 본 명세서에 사용된 바대로, 단백질의 바이오활성을 모방하거나 상향조절(예를 들어, 강화 또는 보강)하는 물질을 의미하도록 의도된다. 효현제는 야생형 단백질의 적어도 하나의 바이오활성을 갖는 야생형 단백질 또는 이의 유도체일 수 있다. 효현제는 또한 단백질의 적어도 하나의 바이오활성을 증가시키는 화합물일 수 있다. 효현제는 또한 폴리펩타이드와 또 다른 분자, 예를 들어 표적 펩타이드 또는 핵산의 상호작용을 증가시키는 화합물일 수 있다.

용어 "길항제"는 본 명세서에 사용된 바대로 단백질의 적어도 하나의 바이오활성을 하향조절(예를 들어, 억제 또는 저해)하는 물질을 의미하도록 의도된다. 길항제는 단백질과 또 다른 분자, 예를 들어 표적 펩타이드 또는

효소 기질 사이의 상호작용을 저해하거나 감소시키는 화합물일 수 있다. 길항제는 또한 존재하는 발현된 단백질의 양을 감소시키거나 저해하는 화합물일 수 있다. 통상적으로, 단백질 또는 유전자의 저해는, 본 명세서에 기재되거나 당해 분야에서 인정된 하나 이상의 방법에 의해 측정된, 적어도 10% 이상, 예를 들어 20%, 30%, 40% 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 또는 관련 활성의 감소, 또는 1배 초과, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 50배, 100배 이상의 발현 또는 관련 활성의 감소를 의미한다.

[0057] 본 명세서에 사용된 바대로, "결합 친화도"는 겔보기 결합 상수 또는 K_a 를 의미한다. K_a 는 분해 상수(K_d)의 역수이다. 결합 단백질은, 예를 들어 특정한 표적 분자에 대해 적어도 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} 및 $10^{11} M^{-1}$ 의 결합 친화도를 가질 수 있다. 제2 표적에 비해 제1 표적에 대한 결합 단백질의 더 높은 친화도 결합은 제2 표적의 결합에 대한 K_a (또는 숫자 값 K_d)보다 제1 표적의 결합에 대한 더 높은 K_a (또는 더 적은 숫자 값 K_d)로 표시될 수 있다. 이러한 경우에, 결합 단백질은 제2 표적(예를 들어, 제2 입체구성의 동일한 단백질 또는 이의 모방체; 또는 제2 단백질)에 비해 제1 표적(예를 들어, 제1 입체구성의 단백질 또는 이의 모방체)에 대해 특이성을 갖는다. (예를 들어, 특이성 또는 다른 비교에 대한) 결합 친화도의 차이는 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000 또는 10^5 배일 수 있다.

[0058] 결합 친화도는 평형 투석, 평형 결합, 겔 여과, ELISA, 표면 플라즈몬 공명 또는 (예를 들어, 형광 검정을 이용한) 분광법을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 결합 친화도를 평가하기 위한 예시적인 조건은 트리스-완충제(50mM 트리스, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂(pH 7.5)) 중에 있다. 이 기술은 결합 단백질(또는 표적) 농도의 함수로서 결합 및 유리 결합 단백질의 농도를 측정하도록 이용될 수 있다. 결합 결합 단백질의 농도([결합])는 유리 결합 단백질의 농도([유리]) 및 표적에서의 결합 단백질에 대한 결합 부위의 농도와 관련되고, 여기서 (N)은 하기 식에 의해 표적 분자마다 결합 부위의 수이다:

[0059] $[결합] = N \cdot [유리] / ((1/K_a) + [유리])$.

[0060] K_a 를 정확히 결정하는 것이 항상 필요한 것이 아니더라도, 이것이 때때로 예를 들어 ELISA 또는 FACS 분석과 같은 방법을 이용하여 측정된 친화도의 정량적 측정을 얻기에 충분하므로 K_a 에 비례하고, 따라서 친화도의 정성적 측정을 얻도록, 또는 실험실내 또는 생체내 검정과 같은 기능적 검정에서, 예를 들어 활성에 의해 친화도의 추론을 얻도록, 더 높은 친화도가 예를 들어 2배 더 높은지를 결정하는 것과 같은 비교에 사용될 수 있다.

[0061] 용어 "결합 단백질"은 표적 분자와 상호작용할 수 있는 단백질을 의미한다. 이 용어는 "리간드"와 상호 교환되어 사용된다. "혈장 칼리크레인 결합 단백질"은 혈장 칼리크레인과의 상호작용(예를 들어, 결합)할 수 있는 단백질을 의미하고, 특히 혈장 칼리크레인과 우선적으로 또는 특이적으로 상호작용하고/하거나 이를 저해하는 단백질을 포함한다. 단백질은 동일한 조건 하에 단백질의 부재 하에 혈장 칼리크레인의 활성과 비교하여 혈장 칼리크레인의 활성을 감소시키는 경우 혈장 칼리크레인을 저해한다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 항체이다.

[0062] 용어 "포획 시약"은 리간드에 특이적으로 결합하는 모이어티를 의미한다.

[0063] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "복합체" 또는 "복합체 형성"은 서로에 대해 특이적 친화도를 갖는 구성원 사이의 복합체를 의미한다.

[0064] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기에 의해 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당해 분야에 정의되어 있다. 이 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들어, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 아이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다.

[0065] 생물중합체에 대한 모티프 서열은 아미노산이 변할 수 있는 위치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 상황에서 기호 "X"는 일반적으로 달리 기재되지 않은 한 임의의 아미노산(예를 들어, 임의의 20개의 천연 아미노산)을 의미하고, 예를 들어 임의의 비시스테인 아미노산을 의미한다. 다른 허용되는 아미노산은 또한 예를 들어 괄호 및 슬래시를 사용하여 표시될 수 있다. 예를 들어, "(A/W/F/N/Q)"는 알라닌, 트립토판, 페닐알라닌, 아스파라긴 및 글루타민이 이 특정한 위치에서 허용된다는 것을 의미한다.

- [0066] 본 명세서에 사용된 바대로, "검출 시약"은 검출하고자 하는 모이어티에 결합하는 모이어티를 의미한다. 통상적으로, 이것은 신호, 예를 들어 형광을 생성하거나, 측정 가능한 화합물을 생성한다.
- [0067] "에피토프"는 결합 단백질(예를 들어, 항체, 예컨대 Fab 또는 전장 항체)에 의해 결합된 표적 화합물 상의 부위를 의미한다. 표적 화합물이 단백질인 경우, 이 부위는 전부 아미노산 성분으로 이루어지거나, 전부 단백질의 아미노산의 화학 변형(예를 들어, 글라이코실 모이어티)으로 이루어지거나, 이들의 조합으로 이루어질 수 있다. 중첩하는 에피토프는 적어도 하나의 공통의 아미노산 잔기, 글라이코실기, 포스페이트기, 설페이트기 또는 다른 분자 특징을 포함한다.
- [0068] 제1 결합 단백질이 제2 결합 단백질이 결합하는 표적 화합물 상의 동일한 부위에 결합하거나, 제2 결합 단백질이 결합하는 부위와 중첩(예를 들어, 아미노산 서열 또는 다른 분자 특징(예를 들어, 글라이코실기, 포스페이트기 또는 설페이트기)의 면에서, 예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 중첩)하는 부위에 결합하는 경우, 제1 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 제2 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 "동일한 에피토프에 결합한다".
- [0069] 에피토프에 대한 제1 결합 단백질의 결합이 에피토프에 결합하는 제2 결합 단백질의 양을 (예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상) 감소시키는 경우, 제1 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 제2 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 "결합에 대해 경쟁한다". 경쟁은 직접적(예를 들어, 제1 결합 단백질은 제2 결합 단백질이 결합한 에피토프와 동일하거나 이와 중첩하는 에피토프에 결합함) 또는 간접적(예를 들어, 에피토프에 대한 제1 결합 단백질의 결합은 에피토프에 결합하는 제2 결합 단백질의 능력을 감소시키는 표적 화합물의 입체 변화를 발생시킴)일 수 있다.
- [0070] 본 명세서에 사용된 바대로, "기능적" 생물학적 분자는 이것이 특징으로 하는 특성 및/또는 활성을 나타내는 형태의 생물학적 분자이다.
- [0071] 2개의 서열 사이의 "상동성" 또는 "서열 동일성"(이 용어는 본 명세서에서 상호 교환되어 사용됨)의 계산을 하기와 같이 수행한다. 최적 비교 목적을 위해 서열을 정렬한다(예를 들어, 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 다에서 갭이 도입될 수 있고, 비교 목적을 위해 비상동성 서열을 버릴 수 있음). 최적 정렬은 12의 갭 패널티(gap penalty), 4의 갭 연장 패널티(gap extend penalty) 및 5의 프레임 시프트 갭 패널티(frameshift gap penalty)를 갖는 블러섬(Blossum) 62 스코어링 매트릭스를 갖는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 이용하여 최고의 점수로서 결정된다. 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 제1 서열에서의 위치를 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 점유하는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다(본 명세서에 사용된 바대로 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동일함). 2개의 서열 사이의 동일성의 백분율은 서열이 공유한 동일한 위치의 수의 함수이다.
- [0072] 바람직한 실시형태에서, 비교 목적을 위해 정렬된 기준 서열의 길이는 기준 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 60% 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% 또는 100%이다. 예를 들어, 기준 서열은 면역글로불린 가변 도메인 서열의 길이일 수 있다.
- [0073] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "낮은 엄격도, 중간 엄격도, 높은 엄격도 또는 매우 높은 엄격도 조건 하에 하이브리드화한다"는 하이브리드화 및 세척에 대한 조건을 기술한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 가이드라인은 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 확인될 수 있다. 수성 및 비수성 방법은 이 참조문헌에 기재되어 있고, 이 중 어느 하나가 이용될 수 있다. 본 명세서에서 언급한 특정한 하이브리드화 조건은 하기와 같다: (1) 약 45°C에서의 6X 염화나트륨/나트륨 시트레이트(SSC) 중에서, 이어서 적어도 50°C(세척의 온도는 낮은 엄격도 조건 하에 55°C로 증가할 수 있음)에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 2회 세척의 낮은 엄격도 하이브리드화 조건; (2) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 60°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 중간 엄격도 하이브리드화 조건; (3) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 높은 엄격도 하이브리드화 조건; 및 (4) 65°C에서의 0.5M 인산나트륨, 7% SDS, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 매우 높은 엄격도 하이브리드화 조건. 매우 높은 엄격도 조건(4)이 바람직한 조건이고, 달리 기재되지 않은 한 사용되어야 하는 것이다. 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 또는 이의 보체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 결합 단백질을 코딩하는 핵산에 낮은, 중간, 높은 또는 매우 높은 엄격도로 하이브리드화하는 핵산을 포함한다. 핵산은 기준 핵산의 길이와 동일한 길이 또는 이의 30%, 20% 또는 10% 내일 수 있다. 핵산은 본 명세서에 기재

된 면역글로불린 가변 도메인 서열을 코딩하는 구역에 상응할 수 있다.

[0074] "단리된 조성물"은 단리된 조성물이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 조성물을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 인공으로 또는 천연으로 생성된 조성물은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0075] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "실험실내"는 다세포 유기체 내보다는 인공 환경, 예를 들어 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양 등에서 발생하는 사건을 의미한다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "생체내"는 다세포 유기체, 예컨대 인간 또는 비인간 동물 내에 발생하는 사건을 의미한다.

[0077] "단리된 조성물"은 단리된 조성물이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 조성물을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 인공으로 또는 천연으로 생성된 조성물은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0078] "단리된" 단백질은 단리된 단백질이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 단백질을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 단백질은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0079] 용어 "칼리크레인"(예를 들어, 혈장 칼리크레인)은 세린 프로테아제 패밀리의 하위그룹인 펩티다제(단백질 중에 펩타이드 결합을 개열시키는 효소)를 의미한다. 혈장 칼리크레인은 키니노겐을 개열시켜 강력한 전염증성 펩타이드인 키닌을 생성시킨다.

[0080] 용어 "칼리크레인 저해제"는 칼리크레인을 저해하는 임의의 물질 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, DX-88(또한 본 명세서에서 "PEP-1"이라 칭함)은 혈장 칼리크레인(NP_000883)의 강력한($K_i < 1\text{nM}$) 및 특이적 저해제이다. (또한, 예를 들어 WO 제95/21601호 또는 WO 제2003/103475호를 참조).

[0081] 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "DX-2922"는 용어 "X101-A01"과 상호 교환되어 사용된다. 이 항체의 다른 변이체는 이하에 기재되어 있다.

항체 식별	설명
X63-G06	HC가 M160-G12와 동일하지만 LC가 다른, ROLIC을 이용하여 발견된 비생식선 Fab
X81-B01	HEK 293T 세포에서 생성된 생식선 IgG
X101-A01	HC 및 LC가 X81-B01과 동일한, CHO 세포에서 생성된 생식선 IgG
DX-2922	X101-A01의 대안적인 명명법

[0082]

[0083] 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "DX-2930"은 용어 "X124-G01"과 상호 교환되어 사용된다. 이 항체의 다른 변이체는 이하에 기재되어 있다.

항체 식별	설명
M162-A04	과지 디스플레이를 이용하여 발견된 비생식선 Fab
M199-A08	M162-A04의 친화도 성숙에 의해 유래한, 중쇄 CDR3 가변 Fab
X115-F02	가변 중쇄가 X124-G01과 동일한, 293T 세포에서 생성된 생식선 Fab
X124-G01 또는 DX-2930	HC의 C 말단 Lys가 X124-G01에서 제거되었다(DX-2930으로 공지됨)는 것을 제외하고는, LC 및 HC가 X115-F02와 동일한, CHO 세포에서 생성된 생식선 IgG.

[0084]

[0085] 용어 "조절자"는, 조절을 발생시킬 수 있는 생물학적 물질, 예컨대 박테리아, 식물, 진균, 또는 동물 세포 또는 조직으로부터 만들어진, 폴리펩타이드, 핵산, 마크로분자, 복합체, 분자, 소분자, 화합물, 중 등(천연 발생 또는 비천연 발생) 또는 추출물을 의미한다. 조절자는 검정에서의 포함에 의해 기능적 특성, 생물학적 활성 또는 프로세스의 저해제 또는 활성화자, 또는 이들의 조합(직접적으로 또는 간접적으로)(예를 들어, 효현제, 부분 길항제, 부분 효현제, 역효현제, 길항제, 항미생물제, 미생물 감염 또는 증식의 저해제 등)으로서 가능한 활성화에 대해 평가될 수 있다. 이러한 검정에서, 일시에 많은 조절자는 스크리닝될 수 있다. 조절자의 활성화는 공지되거나,

비공지되거나, 부분 공지될 수 있다.

- [0086] "비필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 폐지하지 않거나 더 바람직하게는 이를 실질적으로 변경하지 않으면서 결합체, 예를 들어 항체의 야생형 서열로부터 변경될 수 있는 잔기이지만, "필수" 아미노산 잔기의 변경은 실질적인 활성을 손실시킨다.
- [0087] 본 방법에 의해 치료하고자 하는 "환자", "대상체" 또는 "숙주"(이들 용어는 상호 교환되어 사용됨)는 인간 또는 비인간 동물을 의미할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 칼리크레인 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 장애, 예를 들어 유전성 혈관 부종(HAE)이 의심되거나, 이의 위험이 있거나, 이를 앓고 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 비히스타민 의존적 특발성 혈관 부종, 류마티스성 관절염, 크론병, 궤양성 대장염, 루푸스, 알츠하이머병, 폐혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/관류 손상, 대뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 폐파관 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 점막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장 폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관 부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 폐 혈증, 급성 중대뇌 동맥(MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 전신성 홍반성 낭창 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스폴딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 과민증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안 증후군, 만성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)의 위험이 있거나, 이를 앓고 있다.
- [0088] 용어 "프리칼리크레인" 및 "혈장 프리칼리크레인"은 본 명세서에서 상호 교환되어 사용되고, 프리칼리크레인으로도 공지된 활성 혈장 칼리크레인의 지모겐 형태를 의미한다.
- [0089] 대상체에서의 질환을 "예방하는" 또는 "예방한다"의 용어는 대상체를 약제학적 치료로 처리하는 것, 예를 들어 질환의 적어도 하나의 증상이 예방되게 하는 약물의 투여, 즉 이것이 원치않는 병증의 발생에 대해 숙주를 보호 하도록 원치않는 병증(예를 들어, 숙주 동물의 질환 또는 다른 원치않는 상태)의 임상 표출 전에 투여되는 것을 의미한다. 질환을 "예방한다"는 또한 "예방" 또는 "예방학적 치료"로 칭해질 수 있다.
- [0090] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "실질적으로 동일한"(또는 "실질적으로 상동성")은 제1 아미노산 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열이 유사한 활성, 예를 들어 결합 활성, 결합 선호도 또는 생물학적 활성을 갖도록 (또는 이를 갖는 단백질을 코딩하도록), 제2 아미노산 또는 핵산 서열과 동일한 또는 동등한(예를 들어, 유사한 측쇄, 예를 들어 보존된 아미노산 치환을 가짐) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 충분한 수를 포함하는 제 1 아미노산 또는 핵산 서열을 의미하도록 본 명세서에서 사용된다. 항체의 경우에, 제2 항체는 동일한 특이성 및 동일한 항원에 비해 적어도 50%, 적어도 25% 또는 적어도 10%의 친화도를 갖는다.
- [0091] 본 명세서에 개시된 서열에 대한 서열 유사성 또는 상동성(예를 들어, 적어도 약 85%의 서열 동일성)은 또한 본 원의 일부이다. 몇몇 실시형태에서, 서열 동일성은 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상일 수 있다.
- [0092] 또한, 핵산 분절이 가닥의 보체에 선택적 하이브리드화 조건(예를 들어, 매우 엄격한 하이브리드화 조건) 하에 하이브리드화할 때 실질적인 동일성이 존재한다. 핵산은 전체 세포 중에, 세포 용해물 중에 또는 부분 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다.
- [0093] 생물중합체에 대한 모티프 서열은 아미노산이 변할 수 있는 위치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 상황에서 기호 "X"는 일반적으로 달리 기재되지 않은 한 임의의 아미노산(예를 들어, 임의의 20개의 천연 아미노산)을 의미하고, 예를 들어 임의의 비시스테인 아미노산을 의미한다. 다른 허용되는 아미노산은 또한 예를 들어 괄호 및 슬래시를 사용하여 표시될 수 있다. 예를 들어, "(A/W/F/N/Q)"는 알라닌, 트립토판, 페닐알라닌, 아스파라긴 및 글루타민이 이 특정한 위치에서 허용된다는 것을 의미한다.
- [0094] 임의의 분야 공지된 방법에 의해 통계 유의성을 결정할 수 있다. 예시적인 통계 시험은 스튜던트 T-시험, 만 휘 트니(Mann Whitney) U 비모수 시험 및 윌콕슨(Wilcoxon) 비모수 통계 시험을 포함한다. 몇몇 통계학적으로 유의적인 관계는 0.05 또는 0.02 미만의 P 값을 갖는다. 2개의 상태 사이의 구별 가능한 정성적 또는 정량적 차이를 나타내는 예를 들어 용어 "유도한다", "저해한다", "강화한다", "상승시킨다", "증가시킨다", "감소시킨다" 등은 2개의 상태 사이의 차이, 예를 들어 통계학적으로 유의적인 차이를 의미할 수 있다.
- [0095] 본 명세서에 사용된 바대로, "샘플"은 대상체로부터의 조직, 예를 들어 혈액, 혈장 또는 단백질을 포함하는 조

성물을 의미한다. 샘플은 대상체로부터 취한 초기 비처리 샘플, 및 후속하여 처리된, 예를 들어 부분 정제된 또는 보존된 형태 둘 다를 포함한다. 예시적인 샘플은 혈액, 혈장, 눈물 또는 점액을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 샘플은 혈액 또는 혈장 샘플이다.

[0096] "치료학적으로 효과적인 투약량"은 바람직하게는 비처리 대상체에 비해 통계학적으로 유의적인 정도 또는 적어도 약 20%, 더 바람직하게는 적어도 약 40%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 60% 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 80%로, 측정 가능한 매개변수, 예를 들어 혈장 칼리크레인 활성을 조절한다. 측정 가능한 매개변수, 예를 들어 질환 관련 매개변수를 조절하는 화합물의 능력은 인간 장애 및 병증에서 효능을 예견하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 조성물의 이 특성은 실험실내 매개변수를 조절하는 화합물의 능력을 검사함으로써 평가될 수 있다.

[0097] 대상체에서 질환(또는 병증)을 "치료하는" 또는 질환을 갖는 대상체를 "치료하는"은 질환의 적어도 하나의 증상이 치유되거나 경감되거나 감소하도록 대상체를 약제학적 치료로 처리하는 것, 예를 들어 약물의 투여를 의미한다.

[0098] 대상체에서의 질환을 "예방하는"의 용어는 대상체를 약제학적 치료로 처리하는 것, 예를 들어 질환의 적어도 하나의 증상이 예방되게 하는 약물의 투여, 즉 이것이 원치않는 병증의 발생에 대해 숙주를 보호하도록 원치않는 병증(예를 들어, 숙주 동물의 질환 또는 다른 원치않는 상태)의 임상 표출 전에 투여되는 것을 의미한다. 질환을 "예방하는"은 또한 "예방" 또는 "예방학적 치료"로 칭해질 수 있다.

[0099] "예방학적 유효량"은 원하는 예방학적 결과를 성취하는 데 필요한 효과적인 양, 투약량 및 기간을 의미한다. 통상적으로, 예방학적 용량이 질환 전에 또는 이의 초기 병기에 대상체에서 사용되므로, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 낮을 것이다.

[0100] 알파벳 또는 숫자 도입부를 포함하는 도입부는 단지 이해 및 해석의 편의를 위한 것이고, 반대에 대한 명확한 표시의 부재 시, 제약인 순서 또는 선호도의 계급을 부여하지 않는다.

[0101] 개열된 HMWK 및 온전한 HMWK의 검출

[0102] 혈장 칼리크레인은 고분자량 키니노겐(HMWK)인 기질에 대부분 결합한 프리칼리크레인이라 불리는 불활성 지모겐으로서 순환한다. 자극에 대한 반응 시, FXII은 FXIIa로 활성화된다. FXIIa는 프리칼리크레인을 개열시켜 활성 혈장 칼리크레인을 형성한다(도 1). 순환하는 프리칼리크레인의 대략 75-90%는 HMWK의 도메인 6과의 비활성 부위 상호작용을 통해 HMWK에 결합한다. 유리 및 HMWK 결합 활성 pKal은 개열된 HMWK 및 브래디키닌을 생성한다. 혈장 칼리크레인 활성화의 바이오마커가 표 2에 기재되어 있다. 바이오마커의 적합성은 HAE의 급성 공격의 존재 및 부재 하에 이의 수치에 의해 입증될 수 있다. 이러한 바이오마커의 수치는 또한 브래디키닌 매개 부종 또는 pKal 활성화에 의해 매개된 다른 질환의 공격 동안 변경될 수 있다. 표 2를 참조한다.

[0103] **표 2. KMA와 연관된 바이오마커**

[0104] 표 2는 pKal 또는 브래디키닌 매개 장애에 대해 대상체를 평가하기 위해 표 2 및 본 명세서에서 그 외 기재된 방법에 의해 평가될 수 있는 마커를 제공한다. 표 2는 pKal 또는 브래디키닌 매개 장애와 연관된 마커의 수치의 변경의 방향을 나타낸다.

바이오 마커	검정	정상에 비해 HAE 환자에서의 기준 수치	접촉 활성화에 의한 Δ	비고
온전한 HMWK	ELISA, 웨스턴 블롯	변하지 않음	감소	키니노젠 결핍 혈장에 의한 APTT 또는 면역검정을 이용하여 온전한 키니노젠을 측정하기 위한 시험이 이용 가능하다: www.diapharma.com/downloads/68201025811.pdf
개열된 HMWK	ELISA, 웨스턴 블롯	증가	증가	개열된 키니노젠은 HAE 공격 동안 전체 키니노젠을 약 47% 증가시킬 수 있다. - 개열된 키니노젠은 또한 패혈증, 간경변 동안 증가한다. 검정은 a) 온전한 키니노젠과 반대로 개열된 키니노젠에 특이적인 항체; 또는 b) 개열된 및 온전한 키니노젠을 분리하고 정량화할 수 있는 검정 포맷(예, 웨스턴 블롯)을 이용할 수 있다. 이 검정은 순환하는 항-pKai 항체에 감수성이 아니고, 세포 표면 결합 활성 pKai이 국소화 브래디키닌 매개 혈관 부종에서 주요 원인인지에 따라 달라진다.

[0105]

[0106]

본 개시내용은 적어도 부분적으로 환자 샘플에서의 NMWK의 특정한 형태의 값(예를 들어, 개열된 HMWK의 백분율)이 소정의 pKai 매개 질환(예를 들어, HAE) 및 자가면역 질환(예를 들어, RA, UC 및 크론병)과 상관된다는 발견에 기초한다. 따라서, 개열된 HMWK, 온전한 HMWK 또는 둘 다의 값(예를 들어, 백분율)은 이러한 질환을 갖거나 이의 위험이 있는 대상체를 확인하고, pKai 저해제에 의한 치료에 감수성일 것 같은 장애를 확인하고, 하나 이상의 pKai 저해제를 포함하는 질환 치료의 유효성을 평가하기 위한 바이오마커로서 사용될 수 있다.

[0107]

검출 시약

[0108]

몇몇 실시형태에서, HMWK의 다른 형태와 비교하여 HMWK의 일 형태에 특이적으로(우선적으로) 결합하는 검출 시약(예를 들어, 항체)은 후보 환자로부터의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)일 수 있는 샘플에서 개열된 HMWK의 수치를 결정하기 위해 본 명세서에 기재된 검정 방법에서 사용될 수 있다. 일 예에서, 검출 시약은 온전한 HMWK와 비교하여 개열된 HMWK에 특이적으로 결합하는 항체이다. 또 다른 예에서, 검출 시약은 개열된 형태와 비교하여 온전한 HMWK에 특이적으로 결합하는 항체이다. 대안적으로 또는 추가로, 항체는 개열된 HMWK의 경쇄의 C 말단에 특이적으로 결합한다. LMWK가 대안적인 스플라이싱으로 인해 개열된 HMWK의 경쇄의 C 말단 단편을 함유하지 않으므로, 이러한 항체는 LMWK로부터 HMWK를 구별하도록 사용될 수 있다.

[0109]

항원 또는 에피토프에 "특이적으로 결합하는" 검출 시약은 당해 분야에서 널리 이해되는 용어이고, 이러한 특이적 결합을 결정하는 방법은 또한 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 검출 시약, 예컨대 항체는 대안적인 표적과 반응하거나 회합하는 것보다 특정한 표적 항원과 더 빈번히, 더 신속히, 더 긴 기간 동안 및/또는 더 높은 친화도로 반응하거나 회합하는 경우 "특이적 결합"을 나타낸다고 말해진다. 검출 시약은 다른 물질(예를 들어, 온전한 HMWK)에 결합하는 것보다 더 높은 친화도, 친화성으로, 더 용이하게 및/또는 더 긴 기간 동안 결합하는 경우 표적 항원(예를 들어, 개열된 HMWK) 또는 이의 에피토프에 "특이적으로 결합한다". 예를 들어, 항원(예를 들어, 개열된 HMWK 또는 개열된 HMWK의 경쇄의 C 말단)에 특이적으로(또는 우선적으로) 결합하는 항체 또는 이 내부의 항원 에피토프는 다른 항원(예를 들어, 온전한 HMWK) 또는 동일한 항원에서의 다른 에피토프에 결합하는 것보다 더 높은 친화도, 친화성으로, 더 용이하게 및/또는 더 긴 기간 동안 이 표적 항원에 결합하는 항체이다. 이 정의를 이해함으로써, 예를 들어 제1 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 제2 표적 항원에 특이적으로 또는 우선적으로 결합하거나 결합하지 않을 수 있는 것으로 또한 이해된다. 그러므로, "특이적 결합" 또는 "우선적 결합"은 배타적 결합을 (비록 포함할 수는 있지만) 반드시 필요한 것은 아니다. 반드시 그런 것은 아니지만, 일반적으로, 결합에 대한 언급은 우선적 결합을 의미한다. 몇몇 예에서, 표적 항원 또는 이의 에피토프에 "특이적

으로 결합하는" 항체는 다른 항원 또는 동일한 항원에서의 다른 에피토프에 결합하지 않을 수 있다.

[0110] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 검정 방법에서 사용하기 위한 항체는 표적 항원 또는 항원 에피토프(예를 들어, 개열된 키니노젠, 온전한 HMWK 또는 개열된 키니노젠의 경쇄의 C 말단)에 대해 적합한 결합 친화도를 갖는다. 본 명세서에 사용된 바대로, "결합 친화도"는 겔보기 결합 상수 또는 K_A 를 의미한다. K_A 는 분해 상수 (K_D)의 역수이다. 본 명세서에 기재된 항체는 적어도 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M 이하의 결합 친화도(K_D)를 가질 수 있다. 결합 친화도 증가는 K_D 감소에 상응한다. 제2 항원에 비해 제1 항원에 대한 항체의 더 높은 친화도 결합은 제2 항원의 결합에 대한 K_A (또는 숫자 값 K_D)보다 제1 항원의 결합에 대한 더 높은 K_A (또는 더 작은 숫자 값 K_D)로 표시될 수 있다. 이런 경우에, 항체는 제2 항원에 비해 제1 항원에 대해 특이성을 갖는다. (예를 들어, 특이성 또는 다른 비교에 대한) 결합 친화도의 차이는 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10,000 또는 10^5 배일 수 있다.

[0111] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "항체"는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 단백질을 의미한다. 예를 들어, 항체는 중쇄(H) 가변 구역(본 명세서에서 VH로 축약), 및 경쇄(L) 가변 구역(본 명세서에서 VL이라 축약)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 2개의 중쇄(H) 가변 구역 및 2개의 경쇄(L) 사슬 가변 구역을 포함한다. 용어 "항체"는 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, 단일 사슬 항체, Fab 및 sFab 단편, F(ab')₂, Fd 단편, Fv 단편, scFv 및 도메인 항체(dAb) 단편(de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; **26**(3):629-39) 및 완전한 항체를 포함한다. 항체는 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM(및 이의 아형)의 구조적 특징을 가질 수 있다. 항체는 임의의 공급원 유래일 수 있지만, 영장류(인간 및 비인간 영장류) 및 영장류화가 바람직하다.

[0112] VH 및 VL 구역은 "프레임워크 구역"("framework region: FR")이라 칭하는 더 보존된 구역 사이의 "상보성 결정 구역"("complementarity determining region: CDR")이라 칭하는 추가변 구역으로 추가로 세분될 수 있다. 프레임워크 구역 및 CDR의 정도는 정확히 정의되어 있다(문헌[Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 간행물 91-3242호, 및 Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917] 참조, 또한 www.hgmp.mrc.ac.uk 참조). 카밧 정의가 본 명세서에서 사용된다. 각각의 VH 및 VL은 통상적으로, 아미노 말단으로부터 카복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다.

[0113] 항체의 VH 또는 VL 사슬은 중쇄 또는 경쇄 불변 구역의 전부 또는 일부를 추가로 포함하여 각각 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 사슬을 형성할 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 2개의 중쇄 면역글로불린 사슬 및 2개의 경쇄 면역글로불린 사슬의 사합체이고, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬은 예를 들어 이황화 결합에 의해 상호 연결된다. IgG에서, 중쇄 불변 구역은 CH1, CH2 및 CH3인 3개의 면역글로불린 도메인을 포함한다. 경쇄 불변 구역은 CL 도메인을 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 구역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 구역은 통상적으로 전통적인 보체 시스템의 제1 성분(C1q) 및 면역계(예를 들어, 이펙터 세포)의 다양한 세포를 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에 대한 항체의 결합을 매개한다. 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다의 유형일 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 글라이코실화된다. 항체는 항체 의존적 세포독성 및/또는 보체 매개 세포독성에 대해 기능적일 수 있다.

[0114] 항체의 하나 이상의 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 CDR은 인간, 예를 들어 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 및 LC CDR3일 수 있다. 각각의 경쇄 CDR은 인간일 수 있다. HC CDR3은 인간일 수 있다. 하나 이상의 프레임워크 구역은 인간, 예를 들어 HC 또는 LC의 FR1, FR2, FR3 및 FR4일 수 있다. 예를 들어, Fc 구역은 인간일 수 있다. 일 실시형태에서, 모든 프레임워크 구역은 인간이고, 예를 들어 인간 체세포 세포, 예를 들어 면역글로불린을 생성하는 조혈 세포 또는 비조혈 세포에 의해 생성된 항체의 프레임워크의 서열을 갖는다. 일 실시형태에서, 인간 서열은 예를 들어 생식선 핵산에 의해 코딩된 생식선 서열이다. 일 실시형태에서, 선택된 Fab의 프레임워크(FR) 잔기는 가장 유사한 영장류 생식선 유전자, 특히 인간 생식선 유전자에서 상응하는 잔기의 아미노산 유형으로 전환될 수 있다. 하나 이상의 불변 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 가변 도메인, 불변 구역, 불변 도메인(CH1, CH2, CH3, CL1), 또는 전체 항체의 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 100%는 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다.

[0115] 항체의 전부 또는 일부는 면역글로불린 유전자 또는 이의 분절에 의해 코딩될 수 있다. 예시적인 인간 면역글로

불린 유전자는 카파, 람다, 알파(IgA1 및 IgA2), 감마(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), 델타, 엡실론 및 뮤 불변 구역 유전자, 및 많은 면역글로불린 가변 구역 유전자를 포함한다. 전장 면역글로불린 "경쇄"(약 25KDa 또는 약 214개의 아미노산)는 NH₂ 말단(약 110개의 아미노산)에서 가변 구역 유전자에 의해 코딩되고, COOH- 말단에서 카파 또는 람다 불변 구역 유전자에 의해 코딩된다. 전장 면역글로불린 "중쇄"(약 50KDa 또는 약 446개의 아미노산)는 유사하게 가변 구역 유전자(약 116개의 아미노산) 및 다른 상기 언급된 불변 구역 유전자 중 하나, 예를 들어 (약 330개의 아미노산을 코딩하는) 감마에 의해 코딩된다. HC CDR3이 약 3개의 아미노산 잔기로부터 35 개 초과인 아미노산 잔기로 변하므로, 인간 HC의 길이가 상당히 변한다.

[0116] 전장 항체의 용어 "항원 결합 단편"은 관심 있는 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 전장 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 전장 항체의 용어 "항원 결합 단편" 내에 포함된 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 구역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546); 및 (vi) 작용성을 보유하는 단리된 상보성 결정 구역(CDR)을 포함한다. 더욱이, VL 및 VH인 Fv 단편의 2개의 도메인이 별개의 유전자에 의해 코딩되더라도, 이들이, 단일 사슬 Fv(scFv)로서 공지된 1가 분자를 형성하도록 VL 및 VH 구역이 쌍을 지은, 단일 단백질 사슬을 만들게 하는, 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용하여 이들은 연결될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,260,203호, 제4,946,778호 및 제4,881,175호; 문헌[Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]을 참조한다.

[0117] 항체 단편은 당해 분야의 당업자에게 공지된 종래의 기술을 포함하는 임의의 적절한 기술을 이용하여 얻어질 수 있다. 용어 "단일특이적 항체"는 특정한 표적, 예를 들어 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타내는 항체를 의미한다. 이 용어는 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"(이는 항체가 어떻게 생성되는지와 무관하게 본 명세서에 사용된 바대로 단일 분자 조성물의 항체 또는 이의 단편 제제를 의미함)을 포함한다.

[0118] 본 명세서에 사용된 바대로, "인간화" 면역글로불린 가변 구역은, 면역글로불린 가변 구역이 정상 인간에서 면역원성 반응을 발생시키지 않도록, 충분한 수의 인간 프레임워크 아미노산 위치를 포함하도록 변형된 면역글로불린 가변 구역을 의미한다. "인간화" 면역글로불린의 상세내용은 예를 들어 미국 제6,407,213호 및 미국 제5,693,762호를 포함한다.

[0119] 저해 상수(K_i)는 저해제 효력의 측정치를 제공하고; 이것은 효소 활성을 반으로 감소시키는 데 필요한 저해제의 농도이고, 효소 또는 기질 농도에 의존하지 않는다. 겘보기 K_i(K_{i,app})는 반응의 정도(예를 들어, 효소 활성)에 대한 상이한 농도의 저해제(예를 들어, 저해 결합 단백질)의 저해 효과를 측정함으로써; 모리슨 식(Morrison equation)(식 1)에 대한 저해제 농도의 함수가 겘보기 K_i 값의 예측치를 생성하면서, 유사-1차 속도 상수의 변화를 맞추므로써, 상이한 기질 농도에서 얻어진다. K_i는 기질 농도에 대한 K_{i,app}의 도면의 선형 회귀 분석으로부터 추출된 y 절편으로부터 얻어진다.

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

[0120]

[0121] 식 중, v = 측정된 속도; v₀ = 저해제의 부재 하의 속도; K_{i,app} = 겘보기 저해 상수; I = 전체 저해제 농도; 및 E = 전체 효소 농도.

[0122] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 검출 시약은 검출 가능한 라벨에 접합될 수 있고, 관심 있는 항원(예를 들어, 개열된 HMWK 및 온전한 HMWK)에 대한 검출 시약의 결합은 검출 가능한 라벨로부터 방출된 신호의 강도에 기초하여 결정될 수 있다. 대안적으로, 검출 시약에 특이적인 2차 항체를 사용할 수 있다. 하나 이상의 항체는 검출 가능한 라벨에 커플링될 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 라벨은 본 명세서에 기재된 검정 방법에서 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 검출 가능한 라벨은 형광단을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "형광단"(또한 "형광성 라벨" 또는 "형광성 염료"라 칭함)은 한정된 여기 과정에서 광 에너지를 흡수하고 상이한 파장에서 광 에너지를 방출하는 모이어티를 의미한다. 몇몇 실시형태에서, 검출 모이어티는 효소이거나 이를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 효소는 무색 기질로부터 유색 생성물을 생성하는 것

(예를 들어, β -갈락토시다제)이다.

[0123] 고분자량 키니노겐

[0124] 고분자량 키니노겐(HMWK)은 분자량이 대략 110kDa인 단일 폴리펩타이드(1-사슬) 다중-도메인(도메인 1-6) 단백질로서 혈장에 존재한다(도 4). HMWK는 도메인 4 내에서 pKa에 의해 개열되어 9개의 아미노산, 전염증성 펩타이드 브래디키닌 및 HMWK의 2-사슬 형태(개열된 키니노겐)를 방출시킨다. HMWK의 2 사슬은 HMWK의 도메인 1-3을 함유하는 중쇄 및 HMWK의 도메인 5 및 6을 함유하는 경쇄이다. 중쇄 및 경쇄는 분자량이 각각 대략 56 및 46 킬로달톤이다. 도 4.

[0125] 온전한 HMWK

[0126] 본 명세서에서 "온전한 키니노겐"이라 또한 칭하는 온전한 고분자량 키니노겐(HMWK)은 예를 들어 응고제 또는 면역학적 방법, 예를 들어 방사면역검정을 이용하여 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kerbirou-Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2):2734-86] 참조). 인간 HMWK의 경쇄에 대한 단일클론 항체가 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Reddigari, S.R. & Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74:695-702]을 참조한다. 발색 기질에 의존하는 HMWK에 대한 검정을 또한 이용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Scott, C.F. et al. Thromb Res, 1987, 48(6):685-700; Gallimore, M.J. et al. Thromb Res, 2004, 114(2):91-96]을 참조한다.

[0127] HMWK를 코딩하는 인간 유전자는 키니노겐 1(KNG1)이다. KNG1은 전사되고 대안적으로 스플라이싱되어 HMWK 또는 저분자량 키니노겐(LMWK)을 코딩하는 mRNA를 형성한다. HMWK의 예시적인 단백질 서열이 하기 제공된다:

>gi|156231037|ref|NP_001095886.1| 키니노겐-1 아이소폼 1 전구체 [호모 사피엔스]

```

MKLITILFLCSRLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVIDAALKKYNSQNSNNQFVLYRITEATKTVGSDT
FYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQY
DCLGCVHPDISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVAGLNFRITYSIVQTNCSKEN
FLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCIDIYPGKDFVQPTKICVGCPRDIPTNSPELEE
TLTHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLD
CNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSFPRSSRIGEIKEETTVSPHTSMAPAQDEERDSG
KEQGHTRRDWGHGHEKQRKHNLGHGKHHERDQGHGHRGHGHLGHGHEQQHGLGHGKHFKLDDDLHQQGGHV
LDHGHKHKHGHGKHGKHNGKNGKNGWTEHLASSSEDSTPSAQTEKTEGPTPIPSLAKPGVITVTF
SDFQSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDITSPKCPGRPWKSVSEINPTTQ
MKESYYFDLTDGLS (서열 번호 1)

```

[0128]

[0129] 개열된 HMWK

[0130] 본 명세서에서 "개열된 키니노겐"이라 또한 칭하는 개열된 고분자량 키니노겐(HMWK)은 예를 들어 실시예 1 및 실시예 3 내지 7에 기재된 방법, 예를 들어 웨스턴 블롯을 이용하여 평가될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 개열된 HMWK의 경쇄가 평가될 수 있다. 개열된 HMWK에 결합하는 항체, 예컨대 개열된 HMWK의 경쇄에 결합하는 항체(예를 들어, C 말단 잔기를 포함하는 에피토프)를 사용할 수 있다. 일 예는 마우스 mAb 클론 11H05이다. 게다가, 개열된 HMWK는 질량 분광법을 이용하여 평가될 수 있다. 개열된 HMWK의 수치를 평가하기 위한 면역블로팅 기술은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Buhler R. et al. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(3):223-232]을 참조한다.

[0131] 개열된 키니노겐의 중쇄 및 경쇄의 예시적인 서열이 하기 제공된다.

> 개열된 키니노겐-1 중쇄

```

QESQSEEIDCNDKDLFKAVIDAALKKYNSQNSNNQFVLYRITEATKTVGSDTFYSFKYEI
KEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTA
QYDCLGCVHPDISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVAGLNFRIT
YSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCIDIYPGKDFVQ
PPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLTHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVAGKKYF
IDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISL
MK (서열 번호 2)

```

[0132]

> 개열된 키니노젠-1 경쇄

SSRIGEIKEETTVPSPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGKHER
DQGHGHRQGHGLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDDDLEHQGGHVLHDHGKHKHGHGKHKKNK
GKKNGKHNGWKTEHLASSSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDQSDLI
ATMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPIISDFPDITSPKCPGRPWKSVSEINPTT
QMKESYYFDLTDGLS (서열 번호 3)

[0133]

[0134]

검정 포맷

[0135]

본 명세서에 개시된 바이오마커의 값(예를 들어, 절대 양 또는 수치 또는 상대 양 또는 수치, 예컨대 백분율) 또는 본 명세서에 개시된 바이오마커의 값의 변화는 본 명세서에 기재된 검정 및/또는 당해 분야에 공지된 검정을 이용하여 평가될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체로부터의 샘플에서의 개열된 키니노젠의 백분율을 본 명세서에 기재된 임의의 방법에서 사용한다.

[0136]

바이오마커의 수치를 평가하기 위해 이용될 수 있는 검정은 예를 들어 면역검정, 예를 들어 웨스턴 블롯, 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)(예를 들어, 샌드위치 ELISA), 방사면역검정, 전기화학발광 기반 검출 검정, 및 관련 기술을 포함한다. 질량 분광법 기반 접근법을 또한 이용할 수 있다. 발색 기질에 의존하는 검정을 또한 이용할 수 있다. 검정, 예를 들어 웨스턴 블롯 검정은 정량적 영상화 시스템, 예를 들어 상업적으로 구입 가능한 리코 영상화 기술(예를 들어, 리코 바이오사이언시스(리코 Biosciences)사의 오디세이(등록상표) CLx 적외선 영상화 시스템 참조)의 사용을 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 전기화학발광 검출 검정, 또는 전기화학발광 및 패턴형성된 어레이 기술의 조합에 의존하는 검정을 이용한다(예를 들어, 메조 스케일 디스커버리(MSD)사제의 ECL 또는 멀티-어레이(MULTI-ARRAY) 기술 검정).

[0137]

본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "측정하는" 또는 "측정", 또는 대안적으로 "검출하는" 또는 "검출"은, 이러한 물질의 정성적 또는 정량적 농도 수치의 편차를 포함하는, 샘플 내의 물질의 존재, 부재, 분량 또는 양(유효량일 수 있음)을 평가하는 것 또는 그렇지 않으면 대상체의 값 또는 분류를 평가하는 것을 의미한다.

[0138]

몇몇 실시형태에서, 제공된 검정은 고속 플랫폼에서 수행될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 고속 검정을 위해 다중웰 플레이트, 예를 들어 24개, 48개, 96개, 384개 이상의 웰 플레이트를 사용할 수 있다. 각각의 웰에서 동시에 개별적인 검정을 수행할 수 있다. 따라서, 검정 쓰루풋을 증가시키기 위해 동시에 복수의 웰을 측정하게 하는 플레이트를 사용하는 것이 일반적으로 바람직하다. 몇몇 실시형태에서, 이 플랫폼에 동시에 다중웰(예를 들어, 4개, 16개, 24개, 48개, 96개, 384개 이상의 웰)을 영상화할 수 있는 플레이트 리더기를 사용할 수 있다. 예를 들어, 상업적으로 구입 가능한 플레이트 리더기(예를 들어, 퍼킨 엘머(Perkin Elmer, 메사추세츠주 왈탐)사로부터 구입 가능한 플레이트::비전 시스템)를 사용할 수 있다. 이 플레이트 리더기는 동역학 기반 형광 분석을 할 수 있다. 플레이트::비전 시스템은 고 수집 효율 광학부품을 갖고, 동시의 96웰의 분석에 설계된 특수 광학부품을 갖는다. 추가의 적합한 평행한 플레이트 리더기는 SAFIRE(테칸(Tecan), 캘리포니아주 산호세), FLIPRETETRA(등록상표)(모레콜라 디바이시스(Molecular Devices), 캘리포니아주 유니온 시티), FDSS7000(하마마츠(Hamamatsu), 뉴저지주 브릿지워터) 및 CellLux(퍼킨 엘머, 메사추세츠주 왈탐)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0139]

몇몇 실시형태에서, 본 발명의 고속 스크리닝 검정은 자동화된(예를 들어, 로봇 검정에 적합함).

[0140]

키트

[0141]

본 개시내용은 또한 예를 들어 인간 환자로부터의 생물학적 샘플을 함유하는 샘플에서 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠을 평가하는 데 사용하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 다른 형태와 비교하여 개열된 키니노젠 또는 온전한 키니노젠에 특이적으로 결합하는 검출 시약, 및 임의로 대조군으로서의 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠을 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 키트는 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠에 대한 검출 시약의 결합을 검출하기 위한 2차 항체 및/또는 시약을 추가로 포함한다.

[0142]

몇몇 실시형태에서, 키트는 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 따라 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 포함된 설명서는 인간 환자로부터 수집된 생물학적 샘플일 수 있는 샘플에서 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠의 수치를 측정하기 위해 키트에 포함된 성분을 어떻게 사용하는지의 설명을 포함할 수 있다.

[0143]

키트의 사용에 관한 설명서는 일반적으로 본 명세서에 기재된 검정 방법을 수행하기 위한 각각의 성분의 양 및 적합한 조건에 대한 정보를 포함한다. 키트 내의 성분은 단위 용량, 벌크 패키지(예를 들어, 다중 용량 패키지)

또는 하위단위 용량으로 있을 수 있다. 본 발명의 키트에 제공된 설명서는 통상적으로 라벨 또는 패키지 인서트 위의 서면 설명서(예를 들어, 키트에 함유된 종이 시트)이지만, 기계로 판독 가능한 설명서(예를 들어, 자기 또는 광학 저장 디스크에 보유된 설명서)가 또한 허용된다.

[0144] 라벨 또는 패키지 인서트는 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠의 수치를 평가하기 위해 키트가 사용된다는 것을 나타낸다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법을 수행하기 위해 설명서가 제공될 수 있다.

[0145] 본 발명의 키트는 적합한 패키징에 있다. 적합한 패키징은 바이알, 병, 용기(jar), 가요성 패키징(예를 들어, 밀봉 마일러(Mylar) 또는 플라스틱 백) 등을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 특수 장치, 예컨대 흡입기, 비강 투여 장치(예를 들어, 분무기) 또는 인퓨전 장치, 예컨대 미니펌프와 조합하여 사용하기 위한 패키징이 또한 고려된다. 키트는 무균 접근 포트(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘이 뚫을 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음)를 가질 수 있다. 용기는 또한 무균 접근 포트(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘이 뚫을 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음)를 가질 수 있다.

[0146] 키트는 임의로 추가의 성분, 예컨대 완충제 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 보통, 키트는 용기 및 용기 위의 또는 이와 연관된 라벨 또는 패키징 인서트(들)를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0147] 질환 진단 및 예후에서의 검정 방법의 적용

[0148] 본 명세서에 기재된 검정 방법 및 키트는 질환의 평가, 예를 들어 질환의 진단 또는 예후에 적용될 수 있다. 평가는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환, 예를 들어 pKa1 매개 장애, 예컨대 HAE 및 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 크론병의 위험이 있거나 이를 갖는 것으로서 대상체를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 평가는 또한 질환의 치료를 모니터링하는 단계, 예컨대 PKa1 매개 장애, 예컨대 HAE에 대해 치료의 유효성을 평가하는 단계를 포함할 수 있다. 추가로, 평가는 pKa1 저해제에 의해 치료될 수 있는 질환을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[0149] A. 진단

[0150] 몇몇 실시형태에서, 후보 대상체(예를 들어, PKa1 매개 장애, 예컨대 HAE 또는 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 크론병을 갖는 것으로 의심되는 인간 환자)로부터 수집된 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)에서 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠의 수치를 결정하기 위해 검정 방법 및 키트를 수행한다. 이후, 개열된 키니노젠의 수치를 샘플에서의 온전한 키니노젠 또는 키니노젠의 전체 양과 비교하여 샘플에서의 개열된 키니노젠의 값(예를 들어, 백분율), 온전한 키니노젠의 값 또는 둘 다를 결정할 수 있다. 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠의 값을 기준값과 비교하여 대상체가 PKa1 매개 장애, 예를 들어 HAE 또는 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 크론병을 갖거나 이의 위험이 있는지를 결정할 수 있다. 예를 들어, 개열된 키니노젠의 백분율이 기준 숫자이거나 이보다 큰 경우, 대상체는 pKa1 매개 장애, 예컨대 HAE, RA, UC 및 크론병을 갖거나 이의 위험이 있는 것으로서 확인될 수 있다. 대안적으로, 온전한 키니노젠의 백분율이 기준 숫자이거나 이보다 낮은 경우, 대상체는 pKa1 매개 장애, 예컨대 HAE, RA, UC 및 크론병을 갖거나 이의 위험이 있는 것으로서 확인될 수 있다.

[0151] 기준값은 개열된 키니노젠의 백분율의 대조군 수준일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대조군 수준은 대조군 샘플, 예컨대 바람직하게는 후보 대상체와 동일한 종인 건강한 대상체 또는 건강한 대상체의 집단으로부터 얻은 샘플(예를 들어, 혈액 또는 혈장 샘플)에서 개열된 키니노젠의 백분율이다. 본 명세서에 사용된 바대로, 건강한 대상체는 개열된 키니노젠 및/또는 온전한 키니노젠의 수치가 측정되는 때에 표적 질환(예를 들어, PKa1 매개 장애, 예컨대 HAE 또는 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 크론병)이 겹보기에 없거나 질환의 병력을 갖지 않는 대상체이다.

[0152] 대조군 수준은 또한 미리 결정된 수준일 수 있다. 이러한 미리 결정된 수준은 표적 질환을 갖지 않거나 이의 위험을 갖지 않는 대상체의 집단에서 개열된 키니노젠의 백분율을 나타낼 수 있다. 이것은 또한 표적 질환을 갖는 대상체의 집단에서 개열된 키니노젠의 백분율을 나타낼 수 있다.

[0153] 미리 결정된 수준은 다양한 형태를 취할 수 있다. 예를 들어, 이것은 단일 컷오프 값, 예컨대 중앙 또는 평균일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이러한 미리 결정된 수준은 비교 그룹에 기초하여 확립될 수 있고, 예컨대 여기서 하나의 규정된 그룹은 표적 질환을 갖는 것으로 공지되어 있고, 또 다른 규정된 그룹은 표적 질환을 갖지 않는 것으로 공지되어 있다. 대안적으로, 미리 결정된 수준은 범위, 예를 들어 미리 결정된 백분위 내의 대조군 집단

에서의 개열된 키니노겐의 백분율을 나타내는 범위일 수 있다.

- [0154] 본 명세서에 기재된 바대로 대조군 수준은 일상적인 기술에 의해 결정될 수 있다. 몇몇 예에서, 대조군 수준은 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 대조군 샘플에서 종래의 방법(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 시험 샘플에서 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 수치를 얻기 위한 동일한 검정)을 수행함으로써 얻어질 수 있다. 다른 예에서, 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 수치는 대조군 집단의 구성원으로부터 얻어질 수 있고, 결과는 대조군 집단에서 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 수치를 나타내는 대조군 수준(미리 결정된 수준)을 얻기 위해, 예를 들어 컴퓨터 프로그램에 의해 분석될 수 있다.
- [0155] 후보 대상체로부터 얻은 샘플에서의 개열된 키니노겐의 백분율을 본 명세서에 기재된 바와 같은 기준값과 비교함으로써, 후보 대상체가 PKaI 매개 질환(예를 들어, HAE 또는 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 크론병)을 갖거나 이의 위험이 있는지에 대해 결정할 수 있다. 예를 들어, 후보 대상체의 샘플에서의 개열된 키니노겐의 백분율이 기준값으로부터 벗어나는 경우(예를 들어, 기준값과 비교하여 증가하는 경우), 후보 대상체는 이 질환을 갖거나 이의 위험이 있는 것으로서 확인될 수 있다. 기준값이 표적 질환을 갖는 대상체의 집단에서 개열된 키니노겐의 백분율 범위를 나타내는 경우, 이 범위에 해당하는 후보의 샘플에서의 개열된 키니노겐의 백분율은 후보 대상체가 표적 질환을 갖거나 이의 위험이 있다는 것을 나타낸다.
- [0156] 본 명세서에 사용된 바대로, "상승한 수치 또는 기준값보다 높은 수치"는 개열된 키니노겐의 수치/백분율이 기준값, 예컨대 대조군 샘플에서의 개열된 키니노겐의 수치/백분율의 미리 결정된 스트레스홀드보다 높다는 것을 의미한다. 대조군 수준은 본 명세서에 자세히 기재되어 있다. 개열된 키니노겐의 상승한 백분율은 기준값보다 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% 이상 높은 개열된 키니노겐의 백분율을 포함한다. 개열된 키니노겐의 상승한 백분율은 또한 0의 상태(예를 들어, 샘플에서 포획 시약에 결합하는 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐이 검출 가능하지 않거나 없음)로부터 0이 아닌 상태(예를 들어, 약간의 또는 검출 가능한 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐)의 현상을 증가시키는 것을 포함한다.
- [0157] 본 명세서에 사용된 바대로, "감소한 백분율/수치 또는 기준값보다 낮은 백분율/수치"는 개열된 키니노겐의 수치/백분율이 기준값, 예컨대 대조군 샘플에서의 개열된 키니노겐의 미리 결정된 스트레스홀드보다 낮다는 것을 의미한다. 대조군 수준은 본 명세서에 자세히 기재되어 있다. 감소한 개열된 키니노겐의 수치는 기준값보다 예를 들어 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% 이상 낮은 개열된 키니노겐을 포함한다. 포획 시약에 결합하는 감소한 개열된 키니노겐의 수치는 또한 0이 아닌 상태(예를 들어, 샘플에서의 약간의 또는 검출 가능한 개열된 키니노겐)로부터 0의 상태(예를 들어, 샘플에서 개열된 키니노겐이 검출 가능하지 않거나 없음)의 현상을 감소시키는 것을 포함한다.
- [0158] 몇몇 실시형태에서, 후보 대상체는 pKaI 매개 장애, 예를 들어 HAE 또는 자가면역 질환, 예컨대 RA, UC 및 크론병의 증상을 갖는 인간 환자이다. 예를 들어, 대상체는 부종, 종창(여기서, 상기 종창은 완전히 또는 주로 말초임); 두드러기; 충혈, 통증 및 감염의 증거의 부재 하의 종창; 비히스타민 매개 부종, 종창의 재발성 공격 또는 이들의 조합을 갖는다. 다른 실시형태에서, 대상체는 샘플이 수집된 때에 pKaI 매개 장애의 증상을 갖지 않거나, pKaI 매개 장애의 증상의 병력을 갖지 않거나, pKaI 매개 장애, 예컨대 HAE의 병력을 갖지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 항히스타민 치료제, 코르티코스테로이드 치료제 또는 둘 다에 내성을 나타낸다.
- [0159] (i) HAE
- [0160] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 활성을 포함하는 질환 또는 병증은 유전성 혈관 부종(HAE)이다. 유전성 혈관 부종(HAE)은 또한 "퀸케(Quincke) 부종", C1 에스테라제 저해제 결핍증, C1 저해제 결핍증 및 유전성 혈관신경성 부종(HANE)으로 공지되어 있다. HAE는 예를 들어 사지, 얼굴, 생식기, 위장관 및 기도에 영향을 미칠 수 있는 심각한 종창(혈관 부종)의 재발성 삽화를 특징으로 한다. HAE의 증상은 예를 들어 팔, 다리, 입술, 눈, 혀 및/또는 목의 종창; 목 종창 및 갑작스런 목숨을 포함할 수 기도 폐색; 명확한 원인이 없는 복부 경련의 반복 삽화; 및/또는 장의 종창(중증일 수 있고, 복부 경련, 구토, 탈수, 설사, 통증 및/또는 쇼크를 발생시킬 수 있음)을 포함한다. 이 HAE를 갖는 개인의 약 1/3이 공격 동안 윤곽성 홍반이라 불리는 가렵지 않은 발진을 전개시킨다.
- [0161] 기도의 종창은 삶을 위협할 수 있고, 몇몇 환자에서 사망을 야기한다. 사망률은 15-33%로 추정된다. HAE는 매년 약 15,000 내지 30,000개의 응급실 방문을 발생시킨다.
- [0162] 외상 또는 스트레스, 예를 들어 치아 시술, 질병(예를 들어, 바이러스 질병, 예컨대 감기 및 독감), 월경 및 수

술은 혈관 부종의 공격을 촉발할 수 있다. HAE의 급성 공격을 예방하기 위해, 환자는 이전에 야기된 공격을 갖는 특수 자극을 피하도록 시도할 수 있다. 그러나, 많은 경우에, 공지된 촉발물질 없이 공격이 발생한다. 통상적으로, HAE 증상은 처음에 어린이에서 나타나고, 사춘기 동안 악화된다. 대체로, 치료되지 않은 개인은 1주 내지 2주마다 공격을 갖고, 대부분의 삽화는 약 3일 내지 4일 동안 지속한다 (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema). 공격의 빈도 및 기간은 유전성 혈관 부종을 갖는 사람 중에서, 심지어 동일한 가족의 사람 중에서 매우 변한다.

[0163] I형, II형 및 III형으로 공지된 3개의 유형의 HAE가 존재한다. HAE가 50,000명 중 1명의 사람에게 영향을 미치고, I형이 사례의 약 85%를 차지하며, II형이 사례의 약 15%를 차지하고, III형이 매우 희귀한 것으로 추정된다. III형이 가장 새로 기재된 형태이고, 원래 여성에게만 발생하는 것으로 생각되었지만, 이환된 남성을 갖는 가족이 확인되었다.

[0164] HAE는 상염색체 우성 패턴으로 유전되어서, 이환된 사람은 1명의 이환된 부모로부터 돌연변이를 유전 받을 수 있다. 돌연변이의 새로운 유전자가 또한 발생할 수 있고, 따라서 HAE는 이의 가족에서 장애의 병력을 갖지 않은 사람에서 또한 발생할 수 있다. 사례의 20-25%는 새로운 자발적 돌연변이로부터 생기는 것으로 추정된다.

[0165] 세르핀G1 유전자의 돌연변이는 유전성 혈관 부종 I형 및 II형을 발생시킨다. 세르핀G1 유전자는 염증을 조절하는 데 중요한 C1 저해제 단백질을 만드는 명령을 제공한다. C1 저해제는 염증을 촉진하는 소정의 단백질의 활성을 차단한다. 유전성 혈관 부종 I형을 발생시키는 돌연변이는 혈액 중 C1 저해제의 수치를 감소시킨다. 반대로, II형을 발생시키는 돌연변이는 비정상적으로 작용하는 C1 저해제를 생성시킨다. 적절한 수치의 기능적 C1 저해제 없이는, 과도한 양의 브래디키닌이 생성된다. 브래디키닌은 혈관벽을 통해 신체 조직으로 유체의 누출을 증가시킴으로써 염증을 촉진한다. 신체 조직에서의 과도한 유체 축적은 유전성 혈관 부종 I형 및 II형을 갖는 개인에서 보이는 종창의 삽화를 발생시킨다.

[0166] F12 유전자의 돌연변이는 유전성 혈관 부종 III형의 몇몇 경우와 연관된다. F12 유전자는 응고 XII 인자를 만드는 명령을 제공한다. 혈액 응고(응혈)에서의 중요한 역할 이외에, XII 인자는 또한 염증의 중요한 자극제이고, 브래디키닌의 생성에 관여한다. F12 유전자의 소정의 돌연변이는 활성이 증가한 XII 인자를 생성시킨다. 그 결과, 더 많은 브래디키닌이 생성되고, 혈관벽은 더 누출이 되어, 종창의 삽화를 발생시킨다. 유전성 혈관 부종 III형의 다른 원인은 공지되어 있지 않다. 하나 이상의 아직 확인되지 않은 유전자의 돌연변이는 이 경우에 장애에 원인이 될 수 있다.

[0167] HAE는 알레르기 또는 다른 의학 병증으로부터 생긴 혈관 부종의 다른 형태와 유사하게 존재할 수 있지만, 이것은 원인 및 치료에서 상당히 다르다. 유전성 혈관 부종이 알레르기로 오진될 때, 이것은 항히스타민, 스테로이드 및/또는 에피네프린(통상적으로 HAE에서 비효과적이지만, 에피네프린은 삶을 위협하는 반응에 사용될 수 있음)으로 가장 흔히 치료된다. 오진은 또한 복부 종창을 갖는 환자에 대해 불필요한 시험적 수술을 발생시키고, 몇몇 HAE 환자에서 복부 통증은 정신신체증(psychosomatic)으로 부정확하게 진단된다.

[0168] HAE의 증상은, 예를 들어 질의서, 예를 들어 환자, 임상의 또는 가족 구성원이 완료한 질의서를 사용하여 평가될 수 있다. 이러한 질의서는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 육안 아날로그 스케일을 포함한다. 예를 들어, 문헌[McMillan, C.V. et al. Patient. 2012;5(2):113-26]을 참조한다.

[0169] (ii) 류마티스성 관절염

[0170] 류마티스성 관절염(RA)은 관절 종창 및 통증을 발생시키는 자가면역, 만성 염증성 질환이고, 보통 관절 파괴를 발생시킨다. RA는 일반적으로 재발/관해 과정을 따르고, 질환 활성의 "폭발(flare)"은 질환 증상의 관해와 섞여 있다. RA는 쇼그렌 증후군(눈물샘 및 침샘에 의해 야기된 안구 건조증 및 구강 건조증), 늑막염(심호흡 및 기침 시 통증을 야기하는 흉막의 염증), 류마티스성 결절(폐 내에 발생하는 염증의 결절 부위), 심낭염(아래로 눕거나 앞으로 기댈 때 통증을 야기하는 심막의 염증), 펠티 증후군(Felty syndrome)(대상체가 더 쉽게 감염되게 하는, RA와 관련하여 관찰되는 백혈구 감소증 및 비종) 및 혈관염(혈류를 차단할 수 있는 혈관의 염증)을 포함하는 다수의 추가의 염증성 장애와 연관된다. 혈장 칼리크레인은 류마티스성 관절염과 연루된다.

[0171] 활성 RA의 증상은 피로, 식욕 부족, 낮은 등급의 열, 근육 및 관절 쑤심 및 강직을 포함한다. 근육 및 관절 강직은 아침에 및 비활동의 기간 동안에 보통 가장 현저하다. 폭발 동안, 관절은 일반적으로 윤활막염의 결과로서 흔히 빨개지고 부풀어지고 통증이 생기고 따라워진다.

[0172] 류마티스성 관절염에 대한 치료는 약제, 휴식, 관절 강화 운동 및 관절 보호의 조합을 포함한다. 류마티스성 관절염을 치료하기 위해, 소염 "제1선 약물" 및 "질환 변경 항류마티스성 약물"(Disease-Modifying

Antirheumatic Drug: DMARD)의 2개의 종류의 약제를 사용한다. 제1선 약물은 NSAIDS(예를 들어, 아스피린, 나프록센, 이부프로펜 및 에토돌락) 및 코티손(코르티코스테로이드)을 포함한다. DMARD, 예컨대 금(예를 들어, 금염, 금 티오글루코스, 금 티오말레이트, 경구 금), 메토틱세이트, 설파살라진, D-페니실라민, 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 클로르암부실 및 사이클로스포린, 레플루노마이드, 에타네르셉트, 인플릭시맵, 아나킨라 및 아달리무맵 및 하이드록시클로로퀸은 질환 관해를 촉진하고 진행성 관절 파괴를 예방하지만, 이들은 소염제가 아니다.

[0173] RA 및 RA의 증상을 평가하기에 유용한 스케일은 예를 들어 류마티스성 관절염 중증도 스케일(Rheumatoid Arthritis Severity Scale)(RASS; Bardwell et al., (2002) *Rheumatology* **41**(1):38-45), SF-36 관절염 특수 건강 지수(Arthritis Specific Health Index)(ASHI; Ware et al., (1999) *Med. Care.* **37**(5 Suppl):MS40-50), 관절염 영향 측정 스케일(Arthritis Impact Measurement Scales) 또는 관절염 영향 측정 스케일 2(AIMS 또는 AIMS2; Meenan et al. (1992) *Arthritis Rheum.* **35**(1):1-10); 스탠포드 건강 평가 질의서(Health Assessment Questionnaire: HAQ), HAQII 또는 변형 HAQ(예를 들어, 문헌[Pincus et al. (1983) *Arthritis Rheum.* **26**(11):1346-53] 참조)를 포함한다.

[0174] (iii) 염증성 장염(IBD) - 크론병 및 궤양성 대장염

[0175] 염증성 장 질환(IBD)은 대장 및 몇몇 경우에 소장의 염증성 병증의 그룹이다. IBD의 주요 형태는 크론병 및 궤양성 대장염(UC)이다. 교원성 대장염, 림프구성 대장염, 허혈성 대장염, 전환 대장염(diversion colitis), 베체트 증후군, 감염성 대장염 및 부정성 대장염의 IBD의 다른 형태가 더 적은 사례를 차지한다. 크론병과 UC 사이의 주요 차이는 염증성 변화의 위치 및 성질이다. 크론병은 입에서부터 항문까지의 임의의 위장관 부분(피부 병변)에 영향을 미칠 수 있지만, 대부분의 사례는 말단 회장에서 시작한다. 궤양성 대장염은 반대로 대장 및 직장으로 제한된다. 미시적으로, 궤양성 대장염은 점막(장의 상피 내막)으로 제한되지만, 크론병은 전체 장 벽에 영향을 미친다. 마지막으로, 크론병 및 궤양성 대장염은 상이한 비율로 장 이외의 소견(예컨대, 간 문제, 관절염, 피부 소견 및 눈 문제)으로 존재한다.

[0176] IBD의 증상은 복부 통증, 구토, 설사, 혈변, 체중 감소, 체중 증가 및 다양한 관련 합병증 또는 질환(관절염, 괴저성 농피증, 원발성 경화성 담관염)을 포함한다. 진단은 일반적으로 병리학적 병변의 생체검사에 의해 대장 내시경에 의한다.

[0177] IBD에 대한 치료는, 중증도의 수준에 따라, 증상을 조절하기 위해 면역억제제를 요할 수 있다. 면역억제제, 예컨대 아자티오프린, 메토틱세이트 또는 6-머캅토피린을 사용할 수 있다. 가장 흔히, IBD의 치료는 메살라민의 형태를 요한다. 대개는, 스테로이드는 질환 폭발을 조절하기 위해 사용되고, 유지 약물로서 일단 허용된다. 생물학제, 예컨대 인플릭시맵은 크론병 또는 궤양성 대장염을 갖는 환자를 치료하기 위해 사용된다. 중증의 사례는 수술, 예컨대 장 절제, 협착성형술, 또는 일시적 또는 영구적 결장루 또는 회장루를 요할 수 있다. IBD에 대한 대안적인 약제 치료는 다양한 형태로 존재하지만, 이러한 방법은 연장된 스테로이드 노출 또는 수술 절제를 피하기 위해 기초하는 병리학에 집중한다. 보통, 치료는 높은 소염 작용을 갖는 프레드니손과 같은 약물을 투여함으로써 시작한다. 염증이 성공적으로 조절되면, 환자는 질환이 관해로 유지되도록 더 약한 약물, 예컨대 아사콜(메살라민)로 보통 전환된다. 성공적이지 않은 경우, 상기 언급된 면역억제 약물과 메살라민(또한 소염 작용을 가질 수 있음)의 조합은 환자에 따라 투여되거나 투여되지 않을 수 있다.

[0178] (iv) 다른 pK_{al} 매개 또는 브래디키닌 매개 장애

[0179] 혈장 칼리크레인 활성과 관련된 다른 예시적인 질환 또는 병증은 비히스타민 의존적 특발성 혈관 부종, 류마티스성 관절염, 크론병, 궤양성 대장염, 루푸스, 알츠하이머병, 패혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/관류 손상, 대뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 헤파린 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 점막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관 부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 패혈증, 급성 중대뇌 동맥(MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 진신성 홍반성 낭창 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스폴딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 과민증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안 증후군, 만성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)을 포함한다.

- [0180] 본 명세서에 기재된 바대로 PKaI 매개 장애를 갖거나 이의 위험이 있는 것으로서 확인된 대상체는 적합한 치료, 예컨대 본 명세서에 기재된 것으로 처리될 수 있다.
- [0181] B. 치료 유효성의 평가
- [0182] 본 명세서에 기재된 검정 방법은 또한 PKaI 매개 장애(예를 들어, HAE)에 대한 치료의 유효성을 평가하도록 적용될 수 있다. 예를 들어, 복수의 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액 또는 혈장 샘플)은 치료 전에 및 후에 또는 치료의 과정 동안에 치료가 수행된 대상체로부터 수집될 수 있다. 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 수치는 본 명세서에 기재된 임의의 검정 방법에 의해 측정될 수 있고, 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 값(예를 들어, 백분율)이 따라서 결정될 수 있다. 개열된 키니노겐의 백분율이 치료 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 감소하거나(이전에 수집된 샘플과 비교하여 이후에 수집된 샘플에서의 개열된 키니노겐 백분율), 온전한 키니노겐의 백분율이 치료 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 증가하는 경우, 이는 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다. 몇몇 예에서, 치료는 치료제, 예컨대 본 명세서에 기재된 바와 같은 칼리크레인 결합제, 본 명세서에 기재된 바와 같은 브래디키닌 B2 수용체 길항제, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 C1-INH 대체 물질을 포함한다. 치료제의 예는 DX-2930 또는 DX88을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.
- [0183] 대상체가 치료에 반응성이 아닌 것으로서 확인되는 경우, 치료제의 더 높은 용량 및/또는 투약의 빈도는 확인된 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 치료에 반응하는 것으로서 확인되거나 추가의 치료를 필요로 하지 않는 대상체에서 치료제의 투약량 또는 투약의 빈도가 유지되거나 저하되거나 중지된다. 대안적으로, 상이한 치료는 제1 치료에 반응성이 아닌 것으로 밝혀진 대상체에 적용될 수 있다.
- [0184] pKaI 저해제에 의한 치료에 감수성인 장애의 확인
- [0185] pKaI 저해제에 의해 치료될 수 있는 장애를 확인하기 위해 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 값은 또한 의존될 수 있다. 이 방법을 실행하기 위해, 표적 질환을 갖는 대상체로부터 수집된 샘플(예를 들어, 혈액 샘플 또는 혈장 샘플)에서의 개열된 키니노겐의 수치 및/또는 온전한 키니노겐의 수치는 적합한 검정, 예를 들어 본 명세서에 기재된 것, 예컨대 웨스턴 블롯 검정에 의해 측정될 수 있다. 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 값, 예컨대 백분율은 본 명세서에 기재된 바대로 결정될 수 있다. 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 값은 본 명세서에 기재된 바와 같은 기준값과 비교될 수 있다. 개열된 키니노겐의 값/온전한 키니노겐이 기준값으로부터 벗어나는 경우(예를 들어, 상승 또는 감소), 이것은 pKaI 저해제가 질환을 치료하는 데 효과적일 수 있다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 개열된 키니노겐의 백분율이 치료 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 감소하는 경우, 치료는 효과적인 것으로서 확인될 수 있다. 대안적으로, 온전한 키니노겐의 백분율이 치료 후에 또는 치료의 과정에 걸쳐 증가하는 경우, 치료는 효과적인 것으로서 확인될 수 있다.
- [0186] 몇몇 실시형태에서, 개열된 키니노겐 및/또는 온전한 키니노겐의 수치는 키니노겐의 다른 형태와 비교하여 개열된 키니노겐 또는 온전한 키니노겐 중 어느 하나에 특이적으로 결합하는 검출 시약(예를 들어, 항체)을 사용하여 측정될 수 있다. 몇몇 예에서, 항체는 온전한 키니노겐과 비교하여 개열된 키니노겐에 특이적으로 결합한다. 다른 예에서, 항체는 개열된 키니노겐의 경쇄의 C 말단에 특이적으로 결합한다.
- [0187] 질환이 pKaI 저해제에 감수성인(이에 의해 치료될 수 있는) 것으로서 확인되는 경우, 상기 방법은 유효량의 pKaI 저해제, 예를 들어 DX-88, EPIKAL-2 또는 DX-2930을 질환을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0188] 치료
- [0189] 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 의해 확인되는, pKaI 매개 또는 브래디키닌 매개 장애의 위험이 있거나 이를 앓는(예를 들어, 갖는) 대상체는 임의의 적절한 치료제에 의해 치료될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제공된 방법은 바이오마커 검출과 같은 제공된 검정의 결과에 기초하여 대상체에 대해 치료를 선택하는 단계를 포함한다.
- [0190] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은, 바이오마커 검출과 같은 검정의 결과에 기초하여 대상체에게 투여하기 위한, 치료제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 칼리크레인 결합제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 브래디키닌 B2 수용체 길항제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 C1-INH 대체 물질을 선택하는 단계 또는 투여하는 단계 중 하나 또는 둘 다를 포함한다.
- [0191] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질 또는 폴리펩타이드는 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합제는 칼리크레인 저해제, 예를 들어 펩타이드, 소분자 저해제, 칼리크레인 항체 또는 이들의 단편이다. 몇몇 실시형태에서, 브래디키닌 B2 수용체의 길항제는 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서,

C1-INH 대체 치료제는 대상체에게 투여된다.

[0192] 치료제, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 예를 들어 브래디키닌 B2 수용체 길항제, 예를 들어 C1-INH 대체 물질은 혈장 칼리크레인 및/또는 브래디키닌 활성을 포함하는 질환 또는 병증의 치료를 위해 병용 치료의 일부로서 또 다른 치료제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 칼리크레인 저해제, 브래디키닌 B2 수용체 길항제 또는 C1-INH 대체 물질 중 하나 이상, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 브래디키닌 B2 수용체 길항제 또는 C1-INH 대체 물질 중 하나 이상 및 또 다른 치료제와의 병용 치료는 복수의 상이한 구성으로 제공될 수 있다. 제1 물질은 다른 치료제의 투여 전에 또는 후에 투여될 수 있다. 몇몇 상황에서, 제1 물질 및 또 다른 치료제(예를 들어, 치료 물질)는 동시에 또는 가까운 시간적 근접성으로(예를 들어, 주사 사이의 짧은 시간 간격, 예컨대 동일한 치료 세션 동안) 투여된다. 제1 물질 및 다른 치료제는 또한 더 긴 시간적 간격으로 투여될 수 있다.

[0193] 혈장 칼리크레인 결합제

[0194] 혈장 칼리크레인 결합제(예를 들어, 결합 단백질, 예를 들어 폴리펩타이드, 예를 들어 저해 폴리펩타이드, 예를 들어 항체, 예를 들어 저해 항체, 또는 다른 결합제, 예를 들어 소분자)는 다양한 질환 및 병증, 예를 들어 혈장 칼리크레인 활성을 포함하는 질환 및 병증에 유용한 치료제이다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 활성을 포함하는 질환 또는 병증은 유전성 혈관 부종(HAE)이다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질 또는 폴리펩타이드는 pKal 매개 또는 브래디키닌 매개 장애의 위험이 있거나 이를 앓고 있는 대상체에게 투여된다.

[0195] 조직 및/또는 혈장 칼리크레인 중 어느 하나인, 칼리크레인의 다수의 유용한 단백질 저해제는 쿠니츠 도메인(Kunitz domain)을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바대로, "쿠니츠 도메인"은 적어도 51개의 아미노산을 갖고 적어도 2개 및 바람직하게는 3개의 이황화를 포함하는 폴리펩타이드 도메인이다. 이 도메인은 폴딩되어 제1 시스테인과 제6 시스테인, 제2 시스테인과 제4 시스테인 및 제3 시스테인과 제5 시스테인은 이황화 결합을 형성하거나(예를 들어, 58개의 아미노산을 갖는 쿠니츠 도메인에서, 시스테인은 하기 제공된 BPTI 상동성 서열의 수에 따라 5번, 14번, 30번, 38번, 51번 및 55번 아미노산에 상응하는 위치에 존재할 수 있고, 이황화는 5번과 55번, 14번과 38번 및 30번과 51번 위치의 시스테인 사이에 형성될 수 있음), 2개의 이황화가 존재하는 경우, 이들은 이의 시스테인의 상응하는 하위세트 사이에 형성될 수 있다. 각자의 시스테인 사이의 간격은 하기 제공된 BPTI 서열의 넘버링에 따라 5번 내지 55번, 14번 내지 38번 및 30번 내지 51번에 상응하는 위치 사이의 상기 간격의 7개, 5개, 4개, 3개, 2개, 1개 또는 0개의 아미노산 내에 있을 수 있다. BPTI 서열은 임의의 제너릭 쿠니츠 도메인에서 특정 위치를 언급하도록 기준으로 사용될 수 있다. 정렬된 시스테인의 수가 최대화되는 베스트 피트 정렬(best fit alignment)을 확인함으로써 관심 있는 쿠니츠 도메인과 BPTI의 비교를 수행할 수 있다.

[0196] BPTI의 쿠니츠 도메인의 (높은 해상도의) 3D 구조가 공지되어 있다. X선 구조 중 하나는 "6PTI"로서 브룩하벤(Brookhaven) 단백질 데이터 은행에 수탁되어 있다. 몇몇 BPTI 동족체의 3D 구조(Eigenbrot *et al.*, (1990) Protein Engineering, 3(7):591-598; Hynes *et al.*, (1990) Biochemistry, 29:10018-10022)가 공지되어 있다. 적어도 81개의 쿠니츠 도메인 서열이 공지되어 있다. 공지된 인간 동족체는 조직 인자 경로 저해제(tissue factor pathway inhibitor: TFPI)로서 또한 공지된 LACI의 3개의 쿠니츠 도메인(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), α -트립신 간 저해제의 2개의 쿠니츠 도메인, APP-I(Kido *et al.*, (1988) J. Biol. Chem., 263(34):18104-18107), 콜라겐으로부터의 쿠니츠 도메인, TFPI-2의 3개의 쿠니츠 도메인(Sprecher *et al.*, (1994) PNAS USA, 91:3353-3357), 간세포 성장 인자 활성화 저해제 1형의 쿠니츠 도메인, 간세포 성장 인자 활성화 저해제 2형의 쿠니츠 도메인, 미국 특허 공보 제2004-0152633호에 기재된 쿠니츠 도메인을 포함한다. LACI는 3개의 쿠니츠 도메인을 함유하는 분자량이 39kDa인 인간 혈청 포스포글라이코단백질(표 1의 아미노산 서열)이다.

표 1: 예시적인 천연 쿠니츠 도메인

LACI: (서열 번호 4)	1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedehtiit dtelpplklM 51 HSFCFAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC 101 KKMCTRDnan riikttlqge kpdfCfleeed pgiCrgyitr yfynngtkqC 151 erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn gfqvdnygtq lnavnnsltP 201 qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC 251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm 신호 서열 (1-28) 은 대문자이고 밑줄 표시된다 LACI-K1 (50-107) 은 대문자이다 LACI-K2 (121-178) 는 밑줄 표시된다 LACI-K3 (211-270) 은 볼드체이다
BPTI (서열 번호 5)	1 2 3 4 5 123456789012345678901234567890123456789012345678 RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA

[0197]

[0198]

상기 쿠니츠 도메인은 LACI-K1(50번 내지 107번 잔기), LACI-K2(121번 내지 178번 잔기) 및 LACI-K3(213번 내지 270번 잔기)으로 칭해진다. LACI의 cDNA 서열은 문헌[Wun *et al.* (J. Biol. Chem., 1988, 263(13):6001-6004)]에 보고되어 있다. 문헌[Girard *et al.* (Nature, 1989, 338:518-20)]은 3개의 쿠니츠 도메인의 각각의 P1 잔기가 변경된 돌연변이 연구를 보고하였다. VIIa 인자(F.VIIa)가 조직 인자와 복합체화될 때 LACI-K1은 F.VIIa를 저해하고, LACI-K2는 Xa 인자를 저해한다.

[0199]

예시적인 쿠니츠 도메인을 함유하는 단백질은 하기를 포함하고, SWISS-PROT 수탁 번호는 괄호 내에 있다:

A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),
A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAISC (Q95241),
AMBP_PLEPL (P36992), APP2_HUMAN (Q06481), APP2_RAT (P15943),
AXP1_ANTAF (P81547), AXP2_ANTAF (P81548), BPT1_BOVIN (P00974),
BPT2_BOVIN (P04815), CA17_HUMAN (Q02388), CA36_CHICK (P15989),
CA36_HUMAN (P12111), CRPT_BOOMI (P81162), ELAC_MACEU (O62845),
ELAC_TRIVU (Q29143), EPPI_HUMAN (O95925), EPPI_MOUSE (Q9DA01),
HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
IMAP_DROFU (P11424), IP52_ANESU (P10280), ISC1_BOMMO (P10831),
ISC2_BOMMO (P10832), ISH1_STOHE (P31713), ISH2_STOHE (P81129),
ISIK_HELPO (P00994), ISP2_GALME (P81906), IVB1_BUNFA (P25660),
IVB1_BUNMU (P00987), IVB1_VIPAA (P00991), IVB2_BUNMU (P00989),
IVB2_DABRU (P00990), IVB2_HEMHA (P00985), IVB2_NAJNI (P00986),
IVB3_VIPAA (P00992), IVBB_DENPO (P00983), IVBC_NAJNA (P19859),
IVBC_OPHHA (P82966), IVBE_DENPO (P00984), IVBI_DENAN (P00980),
IVBI_DENPO (P00979), IVBK_DENAN (P00982), IVBK_DENPO (P00981),
IVBT_ERIMA (P24541), IVBT_NAJNA (P20229), MCPI_MELCP (P82968),
SBPI_SARBU (P26228), SPT3_HUMAN (P49223), TKD1_BOVIN (Q28201),
TKD1_SHEEP (Q29428), TXCA_DENAN (P81658), UPTI_PIG (Q29100),
AMBP_BOVIN (P00978), AMBP_HUMAN (P02760), AMBP_MERUN (Q62577),
AMBP_MESAU (Q60559), AMBP_MOUSE (Q07456), AMBP_PIG (P04366),
AMBP_RAT (Q64240), IATR_HORSE (P04365), IATR_SHEEP (P13371),
SPT1_HUMAN (O43278), SPT1_MOUSE (Q9R097), SPT2_HUMAN (O43291),
SPT2_MOUSE (Q9WU03), TFP2_HUMAN (P48307), TFP2_MOUSE (O35536),
TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),
TFPI_RABIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

[0200]

[0201]

서열 데이터베이스로부터 쿠니츠 도메인을 확인하기 위해 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 쿠니츠 도메인, 공통 서열 또는 모티프(예를 들어, 프로사이트(ProSite) 모티프)의 공지된 아미노산 서열이 예를 들어 BLAST를 사용한 젠뱅크(GenBank) 서열 데이터베이스(국립 바이오기술 정보 기관(National Center for Biotechnology Information), 국립 보건원(National Institutes of Health), 메사추세츠주 베데스다); 예를 들어 Pfam 조사에 대한 디폴트 매개변수를 사용한 HMM(히든 마코브(Hidden Markov) 모델)의 Pfam 데이터베이스; SMART 데이터베이스; 또는 ProDom 데이터베이스에 대해 조사될 수 있다. 예를 들어, Pfam 방출 9의 Pfam 수탁 번호 PF00014는 수많은 쿠니츠 도메인 및 쿠니츠 도메인을 확인하기 위한 HMM을 제공한다. Pfam 데이터베이스의

설명은 문헌[Sonhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28(3):405-420]에서 확인될 수 있고, HMM의 자세한 설명은 예를 들어 문헌[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; 및 Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.* 2:305-314]에서 확인될 수 있다. HMM의 SMART 데이터베이스(Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, 독일 하이델베르크)는 문헌[Schultz *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857 및 Schultz *et al.* (2000) *Nucl. Acids Res* 28:231]에 기재되어 있다. SMART 데이터베이스는 HMMer2 조사 프로그램의 히든 마코브 모델에 의한 프로파일링에 의해 확인된 도메인을 함유한다(R. Durbin *et al.* (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). 데이터베이스는 또한 설명되고 모니터링된다. ProDom 단백질 도메인 데이터베이스는 상동성 도메인의 자동 편집으로 이루어진다(Corpet *et al.* (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). 현재의 ProDom 버전은 SWISS-PROT 38 및 TREMBL 단백질 데이터베이스의 귀납적 PSI-BLAST 조사를 이용하여 축조되었다(Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Gouzy *et al.* (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340.). 데이터베이스는 각각의 도메인에 대한 공통 서열을 자동으로 생성한다. 프로사이트는 모티프로서 쿠니츠 도메인을 목록화하고 쿠니츠 도메인을 함유하는 단백질을 확인한다. 예를 들어, 문헌[Falquet *et al.* *Nucleic Acids Res.* 30:235-238(2002)]을 참조한다.

[0202] 쿠니츠 도메인은 2개의 루프 구역("결합 루프")에서 아미노산을 주로 사용하여 표적 프로테아제와 상호작용한다. 제1 루프 구역은 BPTI의 13번 내지 20번 아미노산에 상응하는 잔기 사이에 있다. 제2 루프 구역은 BPTI의 31번 내지 39번 아미노산에 상응하는 잔기 사이에 있다. 쿠니츠 도메인의 예시적인 라이브러리는 제1 및/또는 제2 루프 구역에서 하나 이상의 아미노산 위치가 변한다. 칼리크레인과 상호작용하는 쿠니츠 도메인을 스크리닝할 때 또는 개선된 친화도 변이체를 선택할 때, 특히 변하기 유용한 위치는 BPTI의 서열과 관련하여 13번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 31번, 32번, 34번 및 39번 위치를 포함한다. 이들 위치 중 적어도 몇몇은 표적 프로테아제와 가깝게 접촉하는 것으로 예상된다. 다른 위치, 예를 들어 3차원 구조에서 상기 언급된 위치에 인접한 위치를 변화시키는 것이 또한 유용하다.

[0203] 쿠니츠 도메인의 "프레임워크 구역"은 쿠니츠 도메인의 일부인 잔기로서 규정되지만, 구체적으로 제1 및 제2 결합 루프 구역에서의 잔기, 즉 BPTI의 13번 내지 20번 아미노산 및 BPTI의 31번 내지 39번 아미노산에 상응하는 잔기를 배제한다. 반대로, 결합 루프에 있지 않은 잔기는 더 넓은 범위의 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 및/또는 비보존적 치환)을 용인할 수 있다.

[0204] 일 실시형태에서, 이 쿠니츠 도메인은 인간 리포단백질 관련 응고 저해제(lipoprotein-associated coagulation inhibitor: LACI) 단백질의 쿠니츠 도메인 1을 포함하는 루프로 된 구조의 변이체 형태이다. LACI는 패러다임 쿠니츠 도메인인, 3개의 내부의, 잘 한정된, 펩타이드 루프 구조를 함유한다(Girard, T. *et al.*, 1989. *Nature*, 338:518-520). 본 명세서에 기재된 LACI의 쿠니츠 도메인 1의 변이체가 스크리닝되고 단리되고, 증가한 친화도 및 특이성으로 칼리크레인에 결합한다(예를 들어, 미국 특허 제5,795,865호 및 제6,057,287호 참조). 이 방법은 또한 칼리크레인, 예를 들어 혈장 칼리크레인과 상호작용하는 다른 쿠니츠 도메인을 얻기 위해 다른 쿠니츠 도메인 프레임워크에 적용될 수 있다. 칼리크레인 기능의 유용한 조절자는 통상적으로, 칼리크레인 결합 및 저해 검정을 이용하여 결정된 것처럼, 칼리크레인에 결합하고/하거나 이를 저해한다.

[0205] 몇몇 양상에서, 칼리크레인 결합체(예를 들어, 결합 단백질, 예를 들어 폴리펩타이드, 예를 들어 저해 폴리펩타이드, 예를 들어 항체, 예를 들어 저해 항체, 또는 다른 결합체, 예를 들어 소분자)는 혈장 칼리크레인의 활성 형태에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합체는 혈장 칼리크레인, 예를 들어 인간 혈장 칼리크레인 및/또는 췌장 칼리크레인에 결합하고 이를 저해한다.

[0206] 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 전장(예를 들어, IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA(예를 들어, IgA1, IgA2), IgD 및 IgE)일 수 있거나, 오직 항원 결합 단편(예를 들어, Fab, F(ab')₂ 또는 scFv 단편)을 포함할 수 있다. 결합 단백질은 2개의 중쇄 면역글로불린 및 2개의 경쇄 면역글로불린을 포함할 수 있거나, 단일 사슬 항체일 수 있다. 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 재조합 단백질, 예컨대 인간화된, CDR 그래프팅된, 키메라화된, 탈면역화된 또는 실험실내 생성된 항체일 수 있고, 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래한 불변 구역을 임의로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 단일클론 항체이다.

[0207] 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합 단백질은 혈장 칼리크레인, 예를 들어 인간 혈장 칼리크레인 및/또는 췌장 칼리크레인에 결합하고 이를 저해한다. 예시적인 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 미국 공보 제20120201756호(이의 전체 내용은 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합 단

백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(본 명세서에서 또한 DX-2922라 칭함), 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(본 명세서에서 또한 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 갖는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(본 명세서에서 또한 DX-2922라 칭함), 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(본 명세서에서 또한 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04와 동일한 에피토프와 경쟁하고 이에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 DX-2930이다.

[0208] DX-2930의 중쇄 및 경쇄 가변 구역 서열은 하기 제공된다.

[0209] DX-2930 중쇄 가변 구역:

EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWQGQTMVTVSS (서열 번호 6)

[0210]

[0211] DX-2930 경쇄 가변 구역:

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSG
TEFTLTITISLQPDFFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEI (서열 번호 7)

[0212]

[0213] 몇몇 양상에서, 칼리크레인 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 저해 폴리펩타이드)는 혈장 칼리크레인의 활성 형태에 결합한다. 예시적인 폴리펩타이드 혈장 칼리크레인 물질은 미국 특허 제5,795,865호, 미국 특허 제5,994,125호, 미국 특허 제6,057,287호, 미국 특허 제6,333,402호, 미국 특허 제7,628,983호 및 미국 특허 제8,283,321호, 미국 특허 제7,064,107호, 미국 특허 제7,276,480호, 미국 특허 제7,851,442호, 미국 특허 제8,124,586호, 미국 특허 제7,811,991호 및 미국 공보 제20110086801호(이들의 각각의 전체 내용은 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합 폴리펩타이드는 DX-88(비천연 발생 칼리크레인 저해제, KALBITOR(등록상표)(에칼란타이드)로도 공지됨, 서열 번호 8)이다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 서열 번호 8의 3번 내지 60번 아미노산의 약 58개의 아미노산 서열 또는 서열 번호 8의 60개의 아미노산 서열을 갖는 DX-88 폴리펩타이드를 포함하거나 이들로 이루어진다.

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 (서열 번호 8)

[0214]

[0215] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 EPIKAL-2(서열 번호 9)이고, 이것은 (서열 번호 8의 3-60번 잔기에 상응하는) 58개의 잔기 아미노산 서열을 갖고, 34번 잔기에서 Ser로의 Ile의 아미노산 치환 및 39번 잔기에서 Gly로의 Glu의 아미노산 치환을 갖는 비천연 발생 칼리크레인 저해제이다. EPIKAL-2의 서열은 이하에 기재되어 있다:

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 (서열 번호 9)

[0216]

[0217] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 HC 및/또는 LC 프레임워크 구역(예를 들어, HC 및/또는 LC FR 1, 2, 3 및/또는 4)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 HC 및/또는 LC CDR(예를 들어, HC 및/또는 LC CDR1, 2 및/또는 3)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%,

97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 불변 구역(예를 들어, CH1, CH2, CH3 및/또는 CL1)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0218] 몇몇 양상에서, 소분자는 혈장 칼리크레인의 활성 형태에 결합한다.

[0219] *브래디키닌 B2 수용체 길항제*

[0220] 몇몇 실시형태에서, 브래디키닌 B2 수용체 길항제는 대상체에게 투여된다. 예시적인 브래디키닌 B2 수용체 길항제는 브래디키닌 B2 수용체에 대한 네이티브 브래디키닌의 결합을 차단하는 10개의 아미노산을 함유하는 펩티도미메틱 약물인 인카티반트(Firazyr(등록상표))를 포함한다.

[0221] *C1-INH 대체 물질*

[0222] 몇몇 실시형태에서, 대체 C1-INH 물질은 대상체에게 투여된다. 예시적인 C1-INH 대체 물질은 공중에게 이용 가능하고, 예를 들어 베리너트(등록상표)를 포함하고, 이것은 정제된 인간 살균 나노여과 C1-INH 농축물이다.

[0223] **실시예**

[0224] **실시예 1: 개열된 키니노겐**

[0225] 접촉 시스템의 분석에 기초하여, 개열된 키니노겐은 접촉 시스템 활성화를 측정하기 위한 적합한 바이오마커이다. 개열된 키니노겐은 간경변에서 HAE 공격 동안 및 패혈증 동안 접촉 시스템 활성화의 결과로서 상승하는 것으로 이전에 나타났다. 항체 파지 디스플레이 라이브러리는 온전한 키니노겐에서의 결실과 조합되어 개열된 키니노겐에 대해 패닝된다. 동시에, 마우스를 하이브리도마 세포주로부터 얻은 단일클론 항체 및 개열된 키니노겐에 의해 면역화하였다. 양자의 노력은 개열된 키니노겐 및 온전한 키니노겐 둘 다에 결합한 다수의 상이한 단일클론 항체를 제공하지만, 개열된 키니노겐에만 결합하는 항체를 제공하지 않았다.

[0226] 다수의 항체는 웨스턴 블롯 검정에서 적합성에 대해 스크리닝되고, 도 2에 도시된 마우스 mAb(클론 11H05)를 포함하는 웰과 작업하는 몇몇이 확인되었다. 이 검정이 인간 혈장 샘플에서 개열된 키니노겐을 검출할 수 있다는 것이 명확하다. 더욱이, 도 2의 데이터는 유리에서의 혈장 수집이 접촉 활성화 및 키니노겐 개열을 방지하기에 충분하다는 것을 확인시켜준다.

[0227] 질량 분광법 기반 접근법을 또한 이용하여 환자 혈장에서의 개열된 키니노겐을 검출할 수 있다. 이 접근법에서, 하나의 면역은 환자 샘플로부터 키니노겐을 흡착하고, 용리된 키니노겐을 단백질 제거로 분해하고, LC-MC에 의해 펩타이드 단편을 분석한다.

[0228] **실시예 2: 온전한 키니노겐 및 개열된 키니노겐**

[0229] 웨스턴 블롯을 이용하여, 공격 동안 얻어지고 항프로테아제 카테일을 함유하는 시트르산화 혈장 관에서 수집된 환자로부터의 혈장은 온전한 키니노겐(즉, 1-사슬)의 양의 감소를 나타낸다는 것을 밝혔다(도 3). 개열된 키니노겐(즉, 2-사슬)의 증가가 관찰되었다.

[0230] **실시예 3: 개열된 키니노겐의 수치를 측정하기 위한 검정**

[0231] 리코 검출을 이용하여 온전한(1-사슬) 및 개열된(2-사슬) 고분자량 키니노겐(HMWK)의 검출을 위한 웨스턴 블롯 검정을 추가로 최적화하였다. 본 명세서에 기재된 이 검정은, 동물을 2-사슬 HMWK에 의해 면역화하고 ELISA에 의해 1-사슬 및 2-사슬 HMWK 둘 다에 대해 하이브리도마 융합을 스크리닝함으로써, 하이브리도마 기술에 의해 생성된 마우스 단일클론 항체(클론 11H05)를 이용한다. 11H05 mAb는 웨스턴 블롯 검정에서 이의 성능 및 HMWK의 경쇄에 특이적으로 결합하고 중쇄에 결합하지 않는 이의 능력에 기초하여 선택된다. 경쇄 결합제가 바람직한데, 왜냐하면 경쇄가 pKa1 기질이 아닌 다른 혈장 키니노겐(저분자량 키니노겐, LMWK)에 존재하지 않기 때문이다. 검정을 또한 이용하여, 유리 관에서의 수집이 접촉 시스템 활성화를 발생시키면서, 플라스틱 관에서 혈장을 수집하는 것의 중요성을 입증하였다(도 4).

[0232] 몇몇 예에서, 본 명세서에 기재된 웨스턴 블롯 검정에서 하기 재료 및 조건을 이용하였다:

[0233] **재료**

[0234] • XCell 슈어락(SureLock)(등록상표) 미니-셀(Mini-Cell), 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)(인비트로겐(Invitrogen)), 카탈로그 EI0001호

- [0235] • 젤 박스 전원(Gel Box Power Supply)
- [0236] • iBlot(등록상표) 웨스턴 블로팅 트랜스퍼 장치(Western Blotting Transfer Device), 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 IB1001호
- [0237] • iBlot(등록상표) 트랜스퍼 스택(Transfer Stack), 나이트로셀룰로스, 미니, 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 IB301001호
- [0238] • 매트릭스 래버러토리즈 임팩트 2 멀티채널 피펫터(Matrix Laboratories Impact 2 Multichannel Pipettor), 또는 등가물
- [0239] • 라인인 피펫만(Rainin Pipetman), 각종 용적 범위, 라인인(Rainin), 카탈로그 P-10호, P-20호, P-100호, P-200호 및 P-1000호, 또는 등가물
- [0240] • 차트 리코더(Chart Recorder)를 구비한 -80℃ 동결기
- [0241] • 차트 리코더를 구비한 -20℃ 동결기
- [0242] • 차트 리코더를 구비한 2-8℃ 냉동기
- [0243] • 0.22 μ m 폴리에테실론(PES) 여과 시스템, 코팅(Corning), 카탈로그 431096호, 또는 등가물
- [0244] • 탈이온수 및 정제수(DI 수), 리카 케미컬(Ricca Chemical), 카탈로그 9150-5호, 또는 등가물
- [0245] • NuPAGE 7% 트리스-아세테이트 젤, 15웰, 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 EA03555Box호
- [0246] • 트리스-아세테이트 SDS 실행 완충제(20X), 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 LA0041호
- [0247] • NuPAGE 샘플 환원제(10X), 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 NP0009호
- [0248] • NuPAGE 샘플 완충제(4X), 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 NP0007호
- [0249] • NuPAGE 4-12% 비스-트리스 젤, 15웰, 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 NP0336BOX호
- [0250] • MES SDS 실행 완충제(20X), 라이프 테크놀로지스(인비트로젠), 카탈로그 NP0002호
- [0251] • 오디세이 차단 완충제, 리코, 카탈로그 927-40000호
- [0252] • 트윈20, 시그마, 카탈로그 P1379호
- [0253] • 포스페이트 완충 식염수(pH 7.4), 시그마, 카탈로그 P-3813호, 또는 등가물
- [0254] • 트리스, 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific), 카탈로그 T393-5000호
- [0255] • 염화나트륨, JT Baker, 카탈로그 3624-19호
- [0256] • 6N 염산, EMD, 카탈로그 HX0603M-6호
- [0257] • 3M 아세트산나트륨 완충제(pH 5.2), 테크노바(Teknova), 카탈로그 S0296호
- [0258] • 소 혈청 알부민(BSA), IgG 및 프로테아제 프리(Protease Free), 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 카탈로그 001-000-162호
- [0259] • 마우스 단일클론 항-LC HMWK 항체 클론, 클론 11H05(16호), 1.4mg/ml, 다이엑스(Dyax)
- [0260] • 염소 항마우스 IRDye 680RD, 리코, 카탈로그 926-68070호

- [0261] • 오디세이 원-칼라 모레큘러 웨이트 마커즈(Odyssey One-Color Molecular Weight Markers), 리코, 카탈로그 928-40000호
- [0262] • 항프로테아제 저해제 콕테일(10X), 제공: 다이엑스
- [0263] • XIIa 인자, 1.47mg/ml (21.6 μM), 엔자임 리서치 랩스(Enzyme Research Labs), 제공: 다이엑스
- [0264] • 키니노젠 결핍 혈장, 하이펜-바이오메드(Hyphen-Biomed), 제공: 다이엑스
- [0265] • 단일-사슬 HMWK, 1.61mg/ml, 엔자임 리서치 랩스, 카탈로그 HK 2700호
- [0266] • 2-사슬 HMWK, 2.01mg/ml, 엔자임 리서치 랩스, 카탈로그 HK 2362호
- [0267] • 정상 인간 혈장 샘플, HAE 환자 샘플 및 바이오레클러메이션(Bioreclamation) 샘플, 제공: 다이엑스
- [0268] • DX2930, 다이엑스, 롯데 PURDX1-L01호, 32.1mg/ml
- [0269] • DX88, 다이엑스, 롯데 B2007-029호, 10.1mg/ml

[0270] **프로토콜 아웃라인:**

비환원 시험 샘플 제조	5μl의 4X 샘플 완충제를 15μl의 약 5% 시험 샘플에 첨가함으로써 비환원 시험 샘플을 제조하였다. 샘플을 5분 동안 95℃로 가열하였다. 샘플을 간단히 말하면 원심분리하여 시험 샘플 마이크로원심분리 관 뚜껑으로부터 임의의 응축물을 제거하였다.
겔 로딩 및 실행	4-12% 비스-트리스 겔을 사용하여 환원 샘플을 실행하고, 7% 트리스-아세테이트 겔을 사용하여 비환원 샘플을 실행하였다. 원-칼라 단백질 마커를 각각의 겔의 1 레인에 로딩하였다. QC 샘플을 각각의 겔의 2 레인에 로딩하였다. 환원 및 비환원 시험 샘플을 적절한 겔 유형의 3-15 레인에 로딩하였다. 125V에서 약 75분 동안 겔을 실행하였다.
겔 이동	iBlot 전달 스택, 미니 및 iBlot을 사용하여 각각의 겔을 나이트로셀룰로스 막으로 옮겼다. 겔 및 전달 스택을 iBlot에 첨가한 후, 프로그램 P0를 선택하고, 약 7분 동안 실행하였다. 이동을 완료한 후, 막을 20ml의 오디세이 차단 완충제를 함유하는 플라스틱 트레이로 옮겼다.
막 차단	막을 20ml의 오디세이 차단 완충제에 의해 차단하였다. 막을 플레이트 진탕기에서 1시간 동안 차단 완충제와 항온처리하였다.
마우스 항-HMWK LC mAb 제조 및 첨가	마우스 항-HMWK LC mAb를 0.2% 트윈-20을 함유하는 오디세이 차단 완충제 중에 1μg/ml로 희석하였다. 각각의 막으로부터 차단 완충제를 버렸다. 20ml의 용적의 1μg/ml의 1차 항체 용액을 각각의 막에 첨가하고, 막을 플레이트 진탕기에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다.
염소 항-마우스 IRDye680 제조 및 첨가	염소 항마우스 IRDye680을 1:15,000 희석으로 제조하였다. 염소 항마우스 IRDye680을 1:15,000의 최종 희석을 위해 1:10 희석, 이어서 1:1,500 희석으로 초기에 제조하였다. 염소 항마우스 IRDye680을 0.2% 트윈-20을 함유하는 오디세이 차단 완충제 중에 제조하였다. 2차 항체 용액을 각각의 막에 첨가하고, 막을 플레이트 진탕기에서 실온에서 1시간 동안 항온처리하였다.
막 관독	PBS에 의해 세정한 후, 막을 리코 오디세이에 위치시키고, 막을 관독하였다.
막 세척	1차 항체 항온처리 및 2차 항체 항온처리 후 전체 4회 세척을 위해 세척마다 5분 동안 0.1% 트윈-20을 함유하는 PBS에 의해 막을 세척하였다.

- [0271]
- [0272] 1-사슬 및 2-사슬 HMWK를 검출하는 mAb 11H05의 능력을 평가하기 위해, 정상 혈장에서 관찰된 수치를 포함하는 농도에서 HMWK 결핍 혈장으로 정제된 단백질을 스팅킹(spiking)하였다(도 5). 환원 조건 하에, 11H05가 2-사슬 HMWK보다 더 높은 감수성으로 1-사슬을 검출한다는 것이 명확하다. HMWK의 2개의 형태에 대한 mAb의 차등 감

수성을 설명함으로써, 환자 혈장에서 1-사슬 및 2-사슬 HMWK의 농도를 정확히 정량화하도록 이 검정을 이용할 수 있었다. 대안적으로, 2-사슬 신호의 백분율을 접촉 활성화를 포함하는 것으로 의심되는 혈장 샘플에서 결정하고, 정상 건강한 개체로부터의 혈장과 비교할 수 있었다. 이 후자의 접근법을 이용하여, 상이한 질환으로부터 샘플을 스크리닝하고, 접촉 시스템 활성화와 연관된 질환을 확인하기 위해 검정을 이용할 수 있었다.

[0273] 검정간 및 검정내 정확도 및 정확성 시험을 또한 수행하였다. 비환원 조건 및 환원 조건 둘 다 하에, 검정을 허용 가능하게 수행하여 시험된 모든 매개변수에 걸쳐 25% 이하의 CV 값의 백분율을 생성시켰다.

[0274] 정상 인간 혈장에서 동결-해동 안정성 시험을 또한 수행하였다. HMWK가 0회 내지 3회의 동결-해동 사이클에 분해되는 것으로 보이지 않는 것으로 결정되었다.

[0275] 과도한 접촉 시스템 활성화 및 pKa1 활성화에 의해 야기되는 것으로 공지된 질환인, 유전성 혈관 부종(HAE)을 갖는 환자로부터의 혈장 샘플을 이용하여 웨스턴 블롯 검정을 검정하였다. 도 6에 도시된 바대로, HAE 혈장에서의 개열된 HMWK의 백분율은 대략 20%이고, 이것은 정상 혈장보다 상당히 더 높았다. HAE 공격 동안, 이 검정을 이용하여 검출된 개열된 HMWK의 백분율은 추가로 상승하였다. 이 데이터는 휴지(quiescent)(기준) 질환 상태 동안 HAE 혈장에서의 개열된 HMWK의 증가를 명확히 나타냈다. 치료학적 pKa1 저해제가 개열된 키니노겐의 정상 수치로 회복하는 정도의 평가를 통해 이 저해제의 유효성을 모니터링하도록 검정을 따라서 사용할 수 있었다.

[0276] 음으로 하전된 표면 또는 입자, 예컨대 인지질 또는 폴리포스페이트가, 1-사슬 HMWK의 단백질 제거로부터 브래디키닌을 생성시키고 활성 pKa1을 형성시키는, 접촉 시스템의 효과적인 활성화인 것으로 공지되어 있다. HAE 공격에서 접촉 시스템 활성화를 발생시키는 생리학적 표면의 정체성이 공지되어 있지 않다. 그러나, HAE 공격은 FXIIa의 생성과 연관된다. 하전 물질, 예컨대 텍스트란 설페이트 또는 카올린보다는 접촉 시스템 개시제로서의 FXIIa의 사용은 더 재현 가능한 접촉 시스템 활성화 및 최적화 검정 성능이 가능하게 한다. FXIIa의 농도 및 반응 조건은 HAE 환자에서 관찰된 개열된 키니노겐의 백분율(약 20% 내지 50%)에 근접하는 것으로 결정되었다(도 7, 표 1).

표 1

FXIIa 처리된 인간 혈장 샘플에서의 리코 신호 강도*

FXIIa 농도 (nM)	XIIa 인자 활성화 조건의 환원된 비교							
	항온처리 온도	항온처리 시간(분)	단일 사슬	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)	전체 신호	레인 에서의 2-사슬(%)	비처리 신호로부터의 2-사슬(%)
0	해당 없음	해당 없음	29500	202	300	30002	1.7%	해당 없음
2.5	37 °C	10	21900	4010	2370	28280	22.6%	25.8%
2.5	37 °C	30	19500	4240	2370	26110	25.3%	33.9%
2.5	얼음	10	20900	447	1220	22567	7.4%	29.2%
2.5	얼음	30	8160	3380	3950	15490	47.3%	72.3%
5	37 °C	10	9020	4070	2950	16040	43.8%	69.4%
5	37 °C	30	8480	4070	3770	16320	48.0%	71.3%
5	얼음	10	13300	3270	2780	19350	31.3%	54.9%
5	얼음	30	2220	5220	9420	16860	86.8%	92.5%
7.5	37 °C	10	4200	5610	6920	16730	74.9%	85.8%
7.5	37 °C	30	4530	6310	7560	18400	75.4%	84.6%
7.5	얼음	10	12100	2510	2520	17130	29.4%	59.0%
7.5	얼음	30	260	4340	12300	16900	98.5%	99.1%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합

비처리 신호로부터의 2-사슬(%): 1-(처리 신호-변화 신호/비처리 신호-변화 신호)

*도 5에서의 웨스턴 블롯으로부터의 샘플의 신호 분석

[0277]

[0278] 2.5nM의 FXIIa 농도 및 최적화 반응 조건을 이용하여, 15명의 남성 및 15명의 여성으로부터의 정상 인간 혈장을 10μg/ml의 DX-2930(pKa1 활성화의 강력한 항체 저해제)의 존재 또는 부재 하에 조사하고, 2-사슬 HMWK의 백분율을 결정하였다(표 2). 검정이 혈장에서 HMWK 단백질 제거의 혈장 칼리크레인 저해를 검출할 수 있다는 것이 명확하

다. DX-2930은 이 검정에서, HAE 공격의 치료에 대해 승인된 pKa1 저해제인, 에칼란타이드에 거의 동등한 효력을 나타내는 것으로 밝혀졌다(도 8). 이 실험실내 검정에서의 에칼란타이드에 동등한 효력은 동등한 약물 수치가 HAE에서 동등하게 효과적일 수 있다는 것을 제시한다.

표 2

레인에서의 2-사슬의 평균 백분율, 환원 및 비환원 값 *

레인에서의 2-사슬의 평균 백분율				
샘플	XIIa (nM)	DX2930 (μg/mL)	환원	비환원
남성 평균	0	0	16.1%	32.0%
	2.5	0	42.0%	61.2%
	2.5	10	29.5%	43.6%
여성 평균	0	0	9.6%	21.5%
	2.5	0	43.8%	50.2%
	2.5	10	26.4%	30.3%

*15명의 남성 및 15명의 여성으로부터의 혈장의 평균

[0279]

[0280]

이 웨스턴 블롯 검정을 이용하여 궤양성 대장염(UC) 및 류마티스성 관절염(RA)을 갖는 환자로부터의 샘플을 또한 시험하였다. 환자 혈장 샘플을 바이오레클러메이션사로부터 얻고, 플라스틱 관에서 항응고제에서 수집하였다. 개열된 키니노겐의 백분율은 정상 대조군 환자와 비교하여 UC 및 RA 환자 둘 다에서 상승한 것으로 밝혀졌다(도 9, 표 3).

표 3

궤양성 대장염 및 류마티스성 관절염 샘플의 웨스턴 블롯 분석의 요약

레인	K2EDTA 및 시트르산 나트륨에서의 환원된 이환 상태 샘플, 궤양성 대장염 및 류마티스성 관절염							
	샘플	항응고제	질환	HMWK 신호				레인에서의 2-사슬(%)
				단일 사슬 (110 kDa)	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)	전체 신호	
1	분자량 표준품	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음
2	1-사슬 및 2-사슬 표준품	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음
3	A3005, N17	항프로테아제	정상	20500	775	366	21641	5.3%
4	BRH745075	시트르산나트륨	정상	18700	1340	802	20842	10.3%
5	BRH745056	시트르산나트륨	정상	24200	893	782	25875	6.5%
6	BRH715036	K2EDTA	궤양성 대장염	17400	3030	1340	21770	20.1%
7	BRH715037	시트르산나트륨	궤양성 대장염	17400	1220	694	19314	9.9%
8	BRH715038	시트르산나트륨	궤양성 대장염	해당 없음	2140	10300	12440	100.0%
9	BRH715039	시트르산나트륨	궤양성 대장염	14100	1700	596	16396	14.0%
10	BRH715040	시트르산나트륨	궤양성 대장염	13300	1170	2070	16540	19.6%
11	BRH715041	K2EDTA	류마티스성 관절염	해당 없음	해당 없음	4950	4950	100.0%
12	BRH715042	K2EDTA	류마티스성 관절염	88	해당 없음	9250	9338	99.1%
13	BRH715043	K2EDTA	류마티스성 관절염	해당 없음	해당 없음	6900	6900	100.0%
14	BRH715044	시트르산나트륨	류마티스성 관절염	해당 없음	해당 없음	2850	2850	100.0%
15	BRH715045	시트르산나트륨	류마티스성 관절염	6600	1860	1520	9980	33.9%

[0281]

[0282]

웨스턴 블롯 검정을 이용하여 크론병(CD)을 갖는 환자로부터의 샘플을 또한 시험하였다. 환자 혈장 샘플을 바이오레클러메이션사로부터 얻고, 플라스틱 관에서 항응고제에서 수집하였다. 개열된 키니노겐의 백분율은 정상 대조군 환자와 비교하여 CD 환자에서 상승한 것으로 밝혀졌다(도 10, 표 4).

표 4

크론병 샘플의 웨스턴 블롯 분석의 요약

레인	샘플	항응고제	질환	HMWK 신호					레인에서의 2-사슬(%)
				단일 사슬 (150 kDa)	단일 사슬 (110 kDa)	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)	전체 신호	
1	분자량 표준품	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음
2	1-사슬 및 2-사슬 표준품	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음	해당 없음
3	A2992, N14	시트르산나트륨	정상	704	12900	384	576	14564	6.6%
4	BRH745047	시트르산나트륨	정상	1560	5820		192	7572	2.5%
5	BRH745076	시트르산나트륨	정상	5720	12300	382	480	18882	4.6%
6	BRH715026	K2EDTA	크론병	해당 없음	12100	1230	1950	15280	20.8%
7	BRH715027	K2EDTA	크론병	해당 없음	16300	668	1550	18518	12.0%
8	BRH715028	K2EDTA	크론병	해당 없음	6650	504	2250	9404	29.3%
9	BRH715029	K2EDTA	크론병	1900	14100	해당 없음	680	16680	4.1%
10	BRH715030	K2EDTA	크론병	해당 없음	1320	3230	6020	10570	87.5%

[0283]

[0284] 실시예 4: 정상 인간 혈장(NHP) 샘플에서의 FXIIa 및 DX2930의 영향

[0285] 목적:

[0286] 이 실험의 목적은 FXIIa 접촉 시스템 활성화에서 DX-2930의 영향을 결정하는 것이다. DX2930은 혈장 칼리크레인을 저해하여, FXIIa에 의한 치료에 반응하여 측정된 2-사슬 내지 1-사슬 비율을 감소시킬 수 있다. FXIIa 활성화 후에, 및 샘플이 10 μ g/ml의 DX-2930으로 전처리될 때 FXIIa 활성화 후에, 5명의 남성 및 5명의 여성으로부터의 나트륨 시트르산화 NHP 샘플을 비처리한 채 시험하였다. 비환원 조건 및 환원 조건 하에 각각의 샘플 세트를 평가하였다.

[0287] 절차:

[0288] 샘플 제법

[0289] 1. NHP 샘플을 냉동된 저장으로부터 제거하고, 실온과 평형이 되게 하였다. 하기 남성 NHP 샘플을 시험하였다: BRH745050, BRH745051, BRH745052, BRH745053 및 BRH745054. 하기 여성 샘플을 시험하였다: BRH745065, BRH745066, BRH745067, BRH745068 및 BRH745069.

[0290] 2. 3.35 μ l의 DX2930 스톱(롯데 PURDX1-L01호, 32.1mg/ml)을 496.65 μ l의 1X TBS에 첨가함으로써 DX2930을 215 μ g/ml로 제조하였다.

[0291] 3. 5 μ l의 FXIIa 스톱 용액(25,300nM)을 45 μ l의 TBS에 첨가함으로써 FXIIa 용액의 1:10 중간체를 제조하였다. 4.45 μ l의 1:10 중간체를 195.55 μ l의 TBS에 첨가함으로써 56.25nM FXIIa 용액을 제조하였다.

[0292] 4. 2 μ l의 215 μ g/ml의 DX2930 용액을 41 μ l의 NHP에 첨가함으로써 각각의 NHP 샘플을 10 μ g/ml의 DX2930에 의해 제조하였다.

[0293] 5. 2 μ l의 56.25nM FXIIa 용액을 DX2930과 함께 및 이것 없이 43 μ l의 각각의 NHP 샘플에 첨가함으로써 각각의 NHP 샘플을 2.5nM FXIIa에 의해 제조하였다.

[0294] 6. 샘플을 37 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 FXIIa와 항온처리하였다. 5 μ l의 10X 항프로테아제 저해제를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다.

[0295] 7. 5 μ l의 샘플을 95 μ l의 TBS에 첨가함으로써 FXIIa를 갖는, DX2930 및 FXIIa를 갖는, 각각의 NHP 샘플 및 비처리 샘플을 5% 혈장으로 희석시켰다.

[0296] 8. 5 μ l의 4X 샘플 완충제를 15 μ l의 샘플에 첨가함으로써 비환원 샘플을 제조하였다.

[0297] 9. 5 μ l의 4X 샘플 완충제 및 2 μ l의 10X 환원제를 13 μ l의 샘플에 첨가함으로써 환원 샘플을 제조하였다.

[0298] 10. 열 블록(heat block)을 사용하여 모든 샘플을 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 가열하였다.

- [0299] 겔 로딩, 실행 및 이동
- [0300] 1. 50ml의 20X 트리스-아세테이트 SDS 실행 완충제를 950ml의 DI 수에 첨가함으로써 1ℓ의 용적의 1X 트리스-아세테이트 SDS 실행 완충제를 제조하였다.
- [0301] 2. 50ml의 20X MES SDS 실행 완충제를 950ml의 DI 수에 첨가함으로써 1ℓ의 용적의 1X MES 실행 완충제를 제조하였다.
- [0302] 3. 1ml의 트윈-20을 499ml의 오디세이 차단 완충제에 첨가함으로써 검정 완충제(0.2% 트윈을 갖는 오디세이 차단 완충제)를 제조하였다.
- [0303] 4. 1팩킷의 PBS 및 1ml의 트윈-20을 900ml의 DI 수에 첨가함으로써 세척 완충제(0.1% 트윈을 갖는 PBS)를 제조하였다. 용액을 잘 혼합하고, DI 수를 사용하여 1ℓ로 QS하였다. 0.22μM PES 여과 시스템을 통해 최종 용액을 여과시켰다.
- [0304] 5. 4μℓ의 용적의 원-칼라 단백질 마커를 2개의 겔의 1 레인에 첨가하였다.
- [0305] 6. 13μℓ의 용적의 비환원 샘플을 7% 트리스-아세테이트 겔의 적절한 레인에 첨가하였다.
- [0306] 7. 13μℓ의 용적의 환원 샘플을 4-12% 비스-트리스 겔의 적절한 레인에 첨가하였다.
- [0307] 8. 겔을 125볼트에서 약 75분 동안 실행하였다.
- [0308] 9. iBlot 이동 시스템의 iBlot 미니-이동 스택 및 프로그램 P0을 사용하여 각각의 겔을 막으로 개별적으로 옮겼다.
- [0309] 10. 각각의 막을 20ml의 오디세이 차단 완충제를 함유하는 플라스틱 트레이로 옮겼다. 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 오디세이 차단 완충제 중에 항온처리하였다.
- [0310] 11. 28.58μℓ의 마우스 항-HMWK mAb(클론 11H05호, 1.4mg/ml)를 29,971.42μℓ의 검정 완충제에 첨가함으로써 1μg/ml의 1차 항체 용액을 제조하였다.
- [0311] 12. 플라스틱 트레이로부터 차단 완충제를 제거하였다. 20ml의 용적의 1차 항체 용액을 각각의 트레이에 첨가하고, 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다.
- [0312] 13. 5μℓ의 염소 항마우스 IgG IRDye680을 45μℓ의 검정 완충제에 첨가함으로써 염소 항마우스 IgG IRDye680의 1:10 중간체를 제조하였다. 26.66μℓ의 1:10 염소 항마우스 IgG IRDye680 중간체를 39,973.34μℓ의 검정 완충제에 첨가함으로써 2차 항체 용액을 1:15,000 희석으로 제조하였다.
- [0313] 14. 트레이로부터 1차 항체 용액을 제거하였다.
- [0314] 15. 각각의 막을 20ml의 세척 완충제로 5분 동안 세척하고 이후 세척 용액을 버렸다. 전체 4회 동안 세척을 반복하였다.
- [0315] 16. 20ml의 용적의 2차 항체 용액을 각각의 트레이에 첨가하고, 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다.
- [0316] 17. 트레이로부터 2차 항체 용액을 제거하였다.
- [0317] 18. 각각의 막을 20ml의 세척 완충제로 5분 동안 세척하고 이후 세척 용액을 버렸다. 전체 4회 동안 세척을 반복하였다.
- [0318] 19. 각각의 막을 5분 동안 PBS로 세정하였다.
- [0319] 20. 리코 오디세이 CLx를 사용하여 막을 스캐닝하였다.
- [0320] 결과:
- [0321] 표 5 및 표 6은 비환원 샘플 데이터를 함유한다. 표 7 및 표 8은 환원 샘플 데이터를 함유한다. 2개의 방법을 이용하여 개열된 HMWK의 백분율을 계산하였다. 하기 식을 이용하여 레인에서의 2-사슬의 백분율을 결정하였다: 2-사슬 신호의 합/전체 신호의 합. 하기 식을 이용하여 비처리된 신호로부터의 2-사슬의 백분율을 결정하였다: 1-(처리된 단일-사슬 신호/비처리된 단일-사슬 신호). 샘플 제제에서 약간 더 높은 백분율의 혈장을 갖는 비처리된 샘플과 약간 다르게, 처리된 샘플 및 비처리된 샘플을 제조하였다. 따라서, 비처리된 샘플은 처리된 샘플

보다 약간 더 높은 전체 신호를 생성하였다. 처리된 샘플과 비처리된 샘플 사이의 약간 상이한 샘플 제제 때문에 개열된 HWMK의 백분율을 결정하기 위해 레인 값에서의 2-사슬의 백분율을 이용하였다.

[0322] 표 16은 활성화 및 저해 결과의 요약을 함유한다. 환원 조건 하에, 비처리된 남성 및 여성 NHP 샘플은 각각 평균 16.1% 및 9.6%의 개열된 HMWK를 함유하였다. FXIIa에 의해 처리된 남성 및 여성 NHP 샘플은 각각 평균 42.0% 및 43.8%의 개열된 HMWK를 함유하였다. DX-2930에 의해 전처리되고 FXIIa에 의해 처리된 남성 및 여성 NHP 샘플은 각각 평균 29.5% 및 26.4%의 개열된 HMWK를 함유하였다.

[0323] 비환원 조건 하에, 비처리된 남성 및 여성 NHP 샘플은 각각 평균 32.0% 및 21.5%의 개열된 HMWK를 함유하였다. FXIIa에 의해 처리된 남성 및 여성 NHP 샘플은 각각 평균 61.2% 및 50.2%의 개열된 HMWK를 함유하였다. DX-2930에 의해 전처리되고 FXIIa에 의해 처리된 남성 및 여성 NHP 샘플은 각각 평균 43.6% 및 30.3%의 개열된 HMWK를 함유하였다.

[0324] 결론:

[0325] FXIIa에 의한 NHP 샘플의 처리는 비처리된 샘플과 비교하여 개열된 HMWK의 백분율을 증가시켰다. DX-2930에 의해 전처리되고 FXIIa 활성화된 NHP 샘플은 오직 FXIIa에 의해 처리된 샘플보다 더 적은 개열된 HMWK를 생성시켰지만, 비처리된 샘플과 비교하여 개열된 HMWK의 약간 더 높은 백분율을 생성시켰다. 환원된 비처리된 NHP 샘플은 비환원 비처리된 NHP 샘플보다 더 적은 개열된 HMWK를 함유하였다. 비처리된, FXIIa에 의해 처리된, 및 DX2930에 의해 전처리되고 FXIIa에 의해 처리된 NHP 샘플이 재현 가능한 결과를 생성시킨다는 것이 또한 밝혀졌다.

표 5

FXIIa 활성화의 비환원된 DX2930 저해, 남성 샘플, 단일/2-사슬 HMWK 신호, 전체 신호, 2-사슬 HMWK의 백분율

남성 NHP 샘플	FXIIa (nM)	DX2930 ($\mu\text{g/mL}$)	HMWK 신호			전체 신호	레인 에서의 2-사슬(%)	비처리 신호로부터의 2-사슬(%)
			단일 사슬 (120kDa)	2-사슬 (100 kDa)	2-사슬 (90 kDa)			
BRH745050	0	0	17900	4670	0	22570	20.7%	해당 없음
BRH745050	2.5	0	8160	7750	1770	17680	53.8%	54.4%
BRH745050	2.5	10	12600	6620	812	20032	37.1%	29.6%
BRH745051	0	0	19600	3450	0	23050	15.0%	해당 없음
BRH745051	2.5	0	10000	9430	2140	21570	53.6%	49.0%
BRH745051	2.5	10	15300	6480	915	22695	32.6%	21.9%
BRH745052	0	0	22500	8570	1100	32170	30.1%	해당 없음
BRH745052	2.5	0	11000	10700	3050	24750	55.6%	51.1%
BRH745052	2.5	10	16500	8500	1500	26500	37.7%	26.7%
BRH745053	0	0	6370	13100	7390	26860	76.3%	해당 없음
BRH745053	2.5	0	1710	8310	10500	20520	91.7%	73.2%
BRH745053	2.5	10	4360	9310	6490	20160	78.4%	31.6%
BRH745054	0	0	27100	5900	0	33000	17.9%	해당 없음
BRH745054	2.5	0	11500	9880	2270	23650	51.4%	57.6%
BRH745054	2.5	10	15100	6280	814	22194	32.0%	44.3%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합
비처리 신호로부터의 2-사슬(%): 1-(처리 신호-변화 신호/비처리 신호-변화 신호)

[0326]

표 6

FXIIa 활성화의 비환원된 DX2930 저해, 여성 샘플, 단일/2-사슬 HMWK 신호, 전체 신호, 2-사슬 HMWK의 백분율

XIIa 인자에 의한 여성 NHP의 비환원된 활성화, DX2930 에 의한 XIIa 인자의 저해								
여성 NHP 샘플	FXIIa (nM)	DX2930 (μg/mL)	HMWK 신호			전체 신호	레인에서의 2-사슬(%)	비처리 신호로부터의 2-사슬(%)
			단일 사슬 (120kDa)	2-사슬 (100 kDa)	2-사슬 (90 kDa)			
BRH745065	0	0	14700	2500	161	17361	15.3%	해당 없음
BRH745065	2.5	0	4750	5550	3160	13460	64.7%	67.7%
BRH745065	2.5	10	10500	3270	453	14223	26.2%	28.6%
BRH745066	0	0	23200	4460	17.4	27677	16.2%	해당 없음
BRH745066	2.5	0	14200	10600	1780	26580	46.6%	38.8%
BRH745066	2.5	10	15100	5920	205	21225	28.9%	34.9%
BRH745067	0	0	26000	8610	300	34910	25.5%	해당 없음
BRH745067	2.5	0	13700	9470	1410	24580	44.3%	47.3%
BRH745067	2.5	10	19800	8880	795	29475	32.8%	23.8%
BRH745068	0	0	25400	9180	211	34791	27.0%	해당 없음
BRH745068	2.5	0	14200	12500	2610	29310	51.6%	44.1%
BRH745068	2.5	10	15800	7350	708	23858	33.8%	37.8%
BRH745069	0	0	20900	6470	0	27370	23.6%	해당 없음
BRH745069	2.5	0	17000	11500	1820	30320	43.9%	18.7%
BRH745069	2.5	10	21600	8960	198	30758	29.8%	-3.3%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합
비처리 신호로부터의 2-사슬(%): 1-(처리 신호-변화 신호/비처리 신호-변화 신호)

[0327]

표 7

FXIIa 활성화의 환원된 DX2930 저해, 남성 샘플, 단일/2-사슬 HMWK 신호, 전체 신호, 2-사슬 HMWK의 백분율

XIIa 인자에 의한 남성 NHP의 환원된 활성화, DX2930 에 의한 XIIa 인자의 저해								
남성 NHP 샘플	FXIIa (nM)	DX2930 (μg/mL)	HMWK 신호			전체 신호	레인에서의 2-사슬(%)	비처리 신호로부터의 2-사슬(%)
			단일 사슬	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)			
BRH745050	0	0	28300	0	0	28300	0.0%	해당 없음
BRH745050	2.5	0	14400	3360	2620	20380	29.3%	49.1%
BRH745050	2.5	10	19200	2560	1430	23190	17.2%	32.2%
BRH745051	0	0	26800	0	0	26800	0.0%	해당 없음
BRH745051	2.5	0	12800	2950	2580	18330	30.2%	52.2%
BRH745051	2.5	10	13900	2100	1210	17210	19.2%	48.1%
BRH745052	0	0	17800	853	1500	20153	11.7%	해당 없음
BRH745052	2.5	0	12100	2980	3250	18330	34.0%	32.0%
BRH745052	2.5	10	16900	2790	2190	21880	22.8%	5.1%
BRH745053	0	0	7280	4340	8430	20050	63.7%	해당 없음
BRH745053	2.5	0	3180	5620	9240	18040	82.4%	56.3%
BRH745053	2.5	10	6420	5470	6660	18550	65.4%	11.8%
BRH745054	0	0	22100	625	586	23311	5.2%	해당 없음
BRH745054	2.5	0	9610	2660	2020	14290	32.8%	56.5%
BRH745054	2.5	10	12500	2010	1300	15810	20.9%	43.4%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합
비처리 신호로부터의 2-사슬(%): 1-(처리 신호-변화 신호/비처리 신호-변화 신호)

[0328]

표 8

FXIIa 활성화의 환원된 DX2930 저해, 여성 샘플, 단일/2-사슬 HMWK 신호, 전체 신호, 2-사슬 HMWK의 백분율

XIIa 인자에 의한 여성 NHP의 환원된 활성화, DX2930 에 의한 XIIa 인자의 저해								
여성 NHP 샘플	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	HMWK 신호			전체 신호	레인 에서의 2-사슬(%)	비처리 신호로부터의 2-사슬(%)
			단일 사슬	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)			
BRH745065	0	0	17300	2080	1240	20620	16.1%	해당 없음
BRH745065	2.5	0	4100	4880	3450	12430	67.0%	76.3%
BRH745065	2.5	10	9770	3740	1960	15470	36.8%	43.5%
BRH745066	0	0	21300	1770	753	23823	10.6%	해당 없음
BRH745066	2.5	0	9710	4280	2760	16750	42.0%	54.4%
BRH745066	2.5	10	13600	3990	1780	19370	29.8%	36.2%
BRH745067	0	0	21900	375	1850	24125	9.2%	해당 없음
BRH745067	2.5	0	11900	5120	3430	20450	41.8%	45.7%
BRH745067	2.5	10	19000	3610	2440	25050	24.2%	13.2%
BRH745068	0	0	29400	525	966	30891	4.8%	해당 없음
BRH745068	2.5	0	19600	5660	5130	30390	35.5%	33.3%
BRH745068	2.5	10	25100	4050	3260	32410	22.6%	14.6%
BRH745069	0	0	19900	500	688	21088	5.6%	해당 없음
BRH745069	2.5	0	12000	2910	2560	17470	31.3%	39.7%
BRH745069	2.5	10	15000	1790	1350	18140	17.3%	24.6%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합
비처리 신호로부터의 2-사슬(%): 1-(처리 신호-변화 신호/비처리 신호-변화 신호)

[0329]

표 9

레인에서의 2-사슬의 평균 백분율, 환원 및 비환원 값

레인에서의 2-사슬의 평균 백분율				
샘플	XIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	환원	비환원
남성 평균	0	0	16.1%	32.0%
	2.5	0	42.0%	61.2%
	2.5	10	29.5%	43.6%
여성 평균	0	0	9.6%	21.5%
	2.5	0	43.8%	50.2%
	2.5	10	26.4%	30.3%

[0330]

[0331] 실시예 6. DX-2930 및 DX-88을 사용한 FXIIa 활성화의 저해

[0332] 목적:

[0333] 이 실험의 목적은 FXIIa 활성화를 저해하는 것에 대한 DX-2930 및 DX-88의 유효성을 결정하는 것이다. 5의 농도에서 DX-2930을 시험하였다: 200, 100, 30, 12 및 5µg/ml. 5의 농도에서 DX-88을 시험하였다: 9.4, 4.7, 1.4, 0.56 및 0.24µg/ml. DX-2930 및 DX-88에 의해 전처리된 샘플을 FXIIa에 의해 처리하였다. 전처리된 샘플 이외에, 1개의 비처리된 샘플 및 오직 FXIIa에 의해 처리된 2개의 샘플을 시험하였다. 환원 조건 하에 샘플을

시험하였다.

- [0334] 절차:
- [0335] 1. 250 μ l의 각각의 혈장 샘플, BRH745070, BRH745071 및 BRH745048을 1.5ml의 마이크로원심분리 관에 첨가하고 잘 혼합함으로써 NHP 풀(pool)을 제조하였다.
- [0336] 2. 4.21 μ l의 DX2930 스톡 용액(32.1mg/ml)을 25.79 μ l의 TBS에 첨가함으로써 4500 μ g/ml의 DX2930 용액을 제조하였다. 15 μ l의 4500 μ g/ml 용액을 15 μ l의 TBS에 첨가함으로써 2250 μ g/ml의 DX2930 용액을 제조하였다. 6 μ l의 2250 μ g/ml 용액을 14 μ l의 TBS에 첨가함으로써 675 μ g/ml의 DX2930 용액을 제조하였다. 8 μ l의 675 μ g/ml 용액을 12 μ l의 TBS에 첨가함으로써 270 μ g/ml의 DX2930 용액을 제조하였다. 10 μ l의 270 μ g/ml 용액을 14 μ l의 TBS에 첨가함으로써 112.5 μ g/ml의 DX2930 용액을 제조하였다.
- [0337] 3. 2 μ l의 각각의 DX2930 용액을 41 μ l의 NHP 풀에 첨가함으로써 DX-2930에 의해 전처리된 5개의 혈장 샘플을 제조하였다.
- [0338] 4. 6.28 μ l의 DX88 스톡 용액(10.1mg/ml)을 293.72 μ l의 TBS에 첨가함으로써 211.5 μ g/ml의 DX88 용액을 제조하였다. 15 μ l의 211.5 μ g/ml 용액을 15 μ l의 TBS에 첨가함으로써 105.75 μ g/ml의 DX88 용액을 제조하였다. 8.94 μ l의 105.75 μ g/ml 용액을 21.06 μ l의 TBS에 첨가함으로써 31.5 μ g/ml의 DX88 용액을 제조하였다. 12 μ l의 31.5 μ g/ml 용액을 18 μ l의 TBS에 첨가함으로써 12.6 μ g/ml의 DX88 용액을 제조하였다. 12.86 μ l의 12.6 μ g/ml 용액을 17.14 μ l의 TBS에 첨가함으로써 5.4 μ g/ml의 DX88 용액을 제조하였다.
- [0339] 5. 2 μ l의 각각의 DX-88 용액을 41 μ l의 NHP 풀에 첨가함으로써 DX-88에 의해 전처리된 5개의 혈장 샘플을 제조하였다.
- [0340] 6. 5 μ l의 스톡 용액(25,300nM)을 45 μ l의 TBS에 첨가함으로써 FXIIa의 1:10 중간체를 제조하였다. 4.45 μ l의 1:10 중간체를 195.55 μ l의 TBS에 첨가함으로써 56.25nM의 FXIIa 용액을 제조하였다.
- [0341] 7. 2 μ l의 56.25nM FXIIa 용액을 각각의 샘플에 첨가함으로써 DX2930 및 DX88에 의해 전처리된 각각의 혈장 샘플을 2.5nM FXIIa에 의해 처리하였다.
- [0342] 8. 2 μ l의 TBS 및 2 μ l의 56.25nM FXIIa 용액을 41 μ l의 NHP 풀에 첨가함으로써 오직 FXIIa를 함유하는 2개의 샘플을 제조하였다.
- [0343] 9. 4 μ l의 TBS를 41 μ l의 NHP 풀에 첨가함으로써 1개의 비처리된 샘플을 제조하였다.
- [0344] 10. FXIIa를 함유하는 모든 샘플을 37℃에서 10분 동안 항온처리하였다.
- [0345] 11. 비처리된 샘플을 함유하는 각각의 샘플에 5 μ l의 용적의 항프로테아제 저해제를 첨가하였다. 각각의 복제물에 대한 전체 샘플 용적은 50 μ l이었다.
- [0346] 12. 5 μ l의 샘플을 95 μ l의 TBS에 첨가함으로써 각각의 샘플을 약 5% 혈장으로 희석하였다.
- [0347] 13. 5 μ l의 4X 샘플 완충제 및 2 μ l의 10X 환원제를 13 μ l의 샘플에 첨가함으로써 샘플을 제조하였다.
- [0348] 14. 열 블록을 사용하여 모든 샘플을 95℃에서 5분 동안 가열하였다.
- [0349] 15. 50ml의 20X MES SDS 실행 완충제를 950ml의 DI 수에 첨가함으로써 1ℓ의 용적의 1X MES 실행 완충제를 제조하였다.
- [0350] 16. 1ml의 트윈-20을 499ml의 오디세이 차단 완충제에 첨가함으로써 검정 완충제(0.2% 트윈을 갖는 오디세이 차단 완충제)를 제조하였다.
- [0351] 17. 1패킷의 PBS 및 1ml의 트윈-20을 900ml의 DI 수에 첨가함으로써 세척 완충제(0.1% 트윈을 갖는 PBS)를 제조하였다. 용액을 잘 혼합하고, DI 수를 사용하여 1ℓ로 QS하였다. 0.22 μ M PES 여과 시스템을 통해 최종 용액을 여과시켰다.
- [0352] 18. 4 μ l의 용적의 원-칼라 단백질 마커를 2개의 겔의 1 레인에 첨가하였다.
- [0353] 19. 13 μ l의 용적의 비환원 샘플을 4-12% 비스-트리스 겔의 적절한 레인에 첨가하였다.
- [0354] 20. 겔을 125볼트에서 약 75분 동안 실행하였다.

- [0355] 21. iBlot 이동 시스템에서 iBlot 미니-이동 스택 및 프로그램 P0을 사용하여 겔을 막으로 개별적으로 옮겼다.
- [0356] 22. 막을 20ml의 오디세이 차단 완충제를 함유하는 플라스틱 트레이로 옮겼다. 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 오디세이 차단 완충제 중에 항온처리하였다.
- [0357] 23. 14.29 μ l의 마우스 항-HMWK mAb(클론 11H05호, 1.4mg/ml)를 19,985.7 μ l의 검정 완충제에 첨가함으로써 1 μ g/ml의 1차 항체 용액을 제조하였다.
- [0358] 24. 플라스틱 트레이로부터 차단 완충제를 제거하였다. 20ml의 용적의 1차 항체 용액을 막에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다.
- [0359] 25. 5 μ l의 염소 항마우스 IgG IRDye680을 45 μ l의 검정 완충제에 첨가함으로써 염소 항마우스 IgG IRDye680의 1:10 중간체를 제조하였다. 13.33 μ l의 1:10 염소 항마우스 IgG IRDye680 중간체를 19,986.7 μ l의 검정 완충제에 첨가함으로써 2차 항체 용액을 1:15,000 희석으로 제조하였다.
- [0360] 26. 트레이로부터 1차 항체 용액을 제거하였다.
- [0361] 27. 막을 20ml의 세척 완충제로 5분 동안 세척하고 이후 세척 용액을 버렸다. 전체 4회 동안 세척을 반복하였다.
- [0362] 28. 20ml의 용적의 2차 항체 용액을 막에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다.
- [0363] 29. 트레이로부터 2차 항체 용액을 제거하였다.
- [0364] 30. 막을 20ml의 세척 완충제로 5분 동안 세척하고 이후 세척 용액을 버렸다. 전체 4회 동안 세척을 반복하였다.
- [0365] 31. 막을 5분 동안 PBS로 세정하였다.
- [0366] 32. 리코 오디세이 CLx를 사용하여 막을 스캐닝하였다.
- [0367] **결과:**
- [0368] 표 10은 DX-2930 및 DX-88 저해 실험에 대한 결과를 함유한다. 2-사슬의 백분율을 각각의 레인 내에 계산하고, 처리된 신호를 비처리된 신호와 비교함으로써 계산하였다. 이 비교를 위해, 레인에서의 2-사슬의 백분율을 사용하였다. 비처리된 NHP 풀은 3.8%의 2-사슬 값의 백분율을 생성하였다. NHP 풀이 오직 FXIIa에 의해 처리될 때, 2개의 복제물 샘플은 24.4%의 2-사슬 값의 백분율을 생성하였다. DX-2930에 의해 전처리된 샘플은 DX-88에 의해 제조된 샘플과 비교하여 약간 더 낮은 2-사슬 값의 백분율을 생성하였다. 5 μ g/ml의 DX-2930 및 0.24 μ g/ml의 DX-88에 의해 전처리된 샘플은 각각 22.3% 및 23.9%의 2-사슬 값의 백분율을 생성하였다. 이들 값은 오직 FXIIa에 의해 처리된 샘플에서 2-사슬 값의 백분율에 매우 가깝다.
- [0369] **결론:**
- [0370] DX-2930에 의해 전처리된 샘플은 DX-88에 의해 전처리된 샘플보다 2-사슬 값의 약간 더 낮은 백분율을 생성하였다.

표 10

DX-2930 및 DX-88을 사용한 FXIIa의 저해, HMWK 신호, 2-사슬 HMWK의 백분율

DX-88 및 DX-2930을 이용한 FXIIa 접촉 활성화의 저해								
FXIIa (nM)	DX2930 (μ g/mL)	DX88 (μ g/mL)	HMWK 신호			전체 신호	레인 에서의 2-사슬(%)	비처리 신호로부터의 2-사슬(%)
			단일 사슬 (110 kDa)	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)			
0.00	0.00	0.00	26600	413	643	27656	3.8%	해당 없음
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%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합

비처리 신호로부터의 2-사슬(%): 1-(처리 신호-변화 신호/비처리 신호-변화 신호)

실시예 7. HAE, RA, UC 및 CD 환자 샘플에서의 개열된 키니노겐의 수치의 결정

목적:

본 실험의 목적은 유전성 혈관 부종(HAE)을 갖는 환자로부터의 항프로테아제 처리된 혈장 샘플을 평가하는 것이다. 각각의 환자로부터, 1개의 기준 샘플 및 1개의 공격 샘플의 2개의 HAE 샘플을 시험하였다. 샘플을 환원 조건 및 비환원 조건 하에 시험하였다. 또한, 크론병, 류마티스성 관절염 및 궤양성 대장염으로 진단된 환자로부터의 샘플을 시험하였다. 정상 인간 혈장 샘플을 또한 시험하였다. 오직 환원 조건 하에 추가의 샘플을 시험하였다.

절차:

1. 6세트의 HAE 환자 샘플을 시험하였다. 5 μ L의 샘플을 95 μ L의 TBS에 첨가함으로써 각각의 혈장 샘플을 제조하였다.
2. 5개의 크론병 혈장 샘플, 5개의 류마티스성 관절염 혈장 샘플 및 5개의 궤양성 대장염 샘플을 시험하였다. 5 μ L의 샘플을 95 μ L의 TBS에 첨가함으로써 각각의 혈장 샘플을 제조하였다.
3. 5 μ L의 샘플을 95 μ L의 TBS에 첨가함으로써 대조군에 대한 사용으로 7개의 정상 인간 혈장 샘플을 제조하였다.
4. 5 μ L의 4X 샘플 완충제를 15 μ L의 샘플에 첨가함으로써 비환원 샘플을 제조하였다.
5. 5 μ L의 4X 샘플 완충제 및 2 μ L의 10X 환원제를 13 μ L의 샘플에 첨가함으로써 환원 샘플을 제조하였다.
6. 열 블록을 사용하여 95°C에서 5분 동안 모든 샘플을 가열하였다.
7. 50mL의 20X 트리스-아세테이트 SDS 실행 완충제를 950mL의 DI 수에 첨가함으로써 1L의 용적의 1X 트리스-아세테이트 SDS 실행 완충제를 제조하였다.
8. 100mL의 20X MES SDS 실행 완충제를 1900mL의 DI 수에 첨가함으로써 2L의 용적의 1X MES 실행 완충제를 제조하였다.
9. 2mL의 트윈-20을 998mL의 오디세이 차단 완충제에 첨가함으로써 검정 완충제(0.2% 트윈을 갖는 오디세이 차단 완충제)를 제조하였다.

- [0385] 10. 1 패킷의 PBS 및 1ml의 트윈-20을 900ml의 DI 수에 첨가함으로써 세척 완충제(0.1% 트윈을 갖는 PBS)를 제조하였다. 용액을 잘 혼합하고, DI 수를 사용하여 1ℓ로 QS하였다. 0.22 μM PES 여과 시스템을 통해 최종 용액을 여과시켰다.
- [0386] 11. 4 μl의 용적의 원-컬러 단백질 마커를 4개의 겔의 1 레인에 첨가하였다.
- [0387] 12. 13 μl의 용적의 비환원 샘플을 7% 트리스-아세테이트 겔의 적절한 레인에 첨가하였다.
- [0388] 13. 13 μl의 용적의 환원 샘플을 4-12% 비스-트리스 겔의 적절한 레인에 첨가하였다.
- [0389] 14. 겔을 약 75분 동안 125볼트에서 실행하였다.
- [0390] 15. iBlot 이동 시스템에서 iBlot 미니-이동 스택 및 프로그램 P0을 사용하여 각각의 겔을 막으로 개별적으로 옮겼다.
- [0391] 16. 각각의 막을 20ml의 오디세이 차단 완충제를 함유하는 플라스틱 트레이로 옮겼다. 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 오디세이 차단 완충제 중에 항온처리하였다.
- [0392] 17. 57.14 μl의 마우스 항-HMWK mAb(클론 11H05호, 1.4mg/ml)를 79,942.86 μl의 검정 완충제에 첨가함으로써 1 μg/ml의 1차 항체 용액을 제조하였다.
- [0393] 18. 플라스틱 트레이로부터 차단 완충제를 제거하였다. 20ml의 용적의 1차 항체 용액을 각각의 트레이에 첨가하고, 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다.
- [0394] 19. 10 μl의 염소 항마우스 IgG IRDye680을 90 μl의 검정 완충제에 첨가함으로써 염소 항마우스 IgG IRDye680의 1:10 중간체를 제조하였다. 53.33 μl의 1:10 염소 항마우스 IgG IRDye680 중간체를 79,946.67 μl의 검정 완충제에 첨가함으로써 2차 항체 용액을 1:15,000 희석으로 제조하였다.
- [0395] 20. 트레이로부터 1차 항체 용액을 제거하였다.
- [0396] 21. 각각의 막을 20ml의 세척 완충제로 5분 동안 세척하고 이후 세척 용액을 버렸다. 전체 4회 동안 세척을 반복하였다.
- [0397] 22. 20ml의 용적의 2차 항체 용액을 각각의 트레이에 첨가하고, 막을 실온에서 1시간 동안 플레이트 진탕기에서 항온처리하였다.
- [0398] 23. 트레이로부터 2차 항체 용액을 제거하였다.
- [0399] 24. 각각의 막을 20ml의 세척 완충제로 5분 동안 세척하고 이후 세척 용액을 버렸다. 전체 4회 동안 세척을 반복하였다.
- [0400] 25. 각각의 막을 5분 동안 PBS로 세정하였다.
- [0401] 26. 리코 오디세이 CLx를 사용하여 막을 스캐닝하였다.
- [0402] **결과:**
- [0403] 예상된 바대로, 대부분의 환자 샘플은 기준 샘플과 비교하여 공격 샘플에서 상승한 수치의 2-사슬 HMWK를 나타냈다. 표 11 및 표 12는 이 실험에 대한 HAE 데이터를 함유한다. 표 13은 궤양성 대장염 및 류마티스성 관절염 환자 샘플에 대한 데이터 세트를 함유한다. 표 14는 크론병 환자 샘플에 대한 데이터를 함유한다.

표 11

비환원된 HAE 환자 샘플, 기준 및 공격, HMWK 신호,
레인에서의 2-사슬의 백분율

환자 번호	환자 이니셜	HAE	비환원된 항프로테아제 HAE 환자 샘플, 기준 및 공격 HMWK 신호			전체 신호	레인 에서의 2-사슬(%)
			120 kDa	100 kDa	90 kDa		
A3009	N18	정상	15500	3750	해당 없음	19250	19.5%
A4970	AC	기준	13000	4300	240	17540	25.9%
A4908	AC	공격	9450	5910	1740	17100	44.7%
A5564	BB	기준	15900	5650	585	22135	28.2%
A5353	BB	공격	11600	10500	2340	24440	52.5%
A4607	FF	기준	11400	4850	해당 없음	16250	29.8%
A4619	FF	공격	6770	6750	2090	15610	56.6%
A5346	DG	기준	10800	3850	102	14752	26.8%
A5422	DG	공격	5650	2080	133	7863	28.1%
A4183	PC	기준	9530	1190	해당 없음	10720	11.1%
A4671	PC	공격	8840	1570	해당 없음	10410	15.1%
A5248	GR	기준	14300	4270	44.1	18614.1	23.2%
A2315	GR	공격	11600	4610	490	16700	30.5%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합

[0404]

표 12

환원된 HAE 환자 샘플, 기준 및 공격, HMWK 신호,
레인에서의 2-사슬의 백분율

환원된 항프로테아제 HAE 환자 샘플, 기준 및 공격							
환자 번호	환자 이니셜	HAE	HMWK 신호			전체 신호	레인 에서의 2-사슬(%)
			110 kDa	56 kDa	46 kDa		
A3009	N18	정상	18700	802	926	20428	8.5%
A4970	AC	기준	14500	2980	1480	18960	23.5%
A4908	AC	공격	8500	3540	2670	14710	42.2%
A5564	BB	기준	12400	3160	1380	16940	26.8%
A5353	BB	공격	8980	3980	2620	15580	42.4%
A4607	FF	기준	10900	2490	1620	15010	27.4%
A4619	FF	공격	6130	3930	2520	12580	51.3%
A5346	DG	기준	11200	2400	709	14309	21.7%
A5422	DG	공격	7900	2640	749	11289	30.0%
A4183	PC	기준	13900	1850	572	16322	14.8%
A4671	PC	공격	13500	2120	572	16192	16.6%
A5248	GR	기준	19000	2120	1160	22280	14.7%
A2315	GR	공격	16400	3660	1580	21640	24.2%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합

[0405]

표 13

퀘양성 대장염 및 류마티스성 관절염을 갖는 개인으로부터의 혈장 샘플,
HMWK 신호, 레인에서의 2-사슬의 백분율

K2EDTA 및 시트르산 나트륨에서의 환원된 이환 상태 샘플, 퀘양성 대장염 및 류마티스성 관절염							
샘플	항응고제	질환	HMWK 신호			전체 신호	레인에서의 2-사슬(%)
			단일 사슬 (110 kDa)	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)		
A3005, N17	항프로테아제	정상	20500	775	366	21641	5.3%
BRH745075		정상	18700	1340	802	20842	10.3%
BRH745056		정상	24200	893	782	25875	6.5%
BRH715036	K2EDTA	퀘양성 대장염	17400	3030	1340	21770	20.1%
BRH715037	시트르산나트륨	퀘양성 대장염	17400	1220	694	19314	9.9%
BRH715038	시트르산나트륨	퀘양성 대장염	해당 없음	2140	10300	12440	100.0%
BRH715039	시트르산나트륨	퀘양성 대장염	14100	1700	596	16396	14.0%
BRH715040	시트르산나트륨	퀘양성 대장염	13300	1170	2070	16540	19.6%
BRH715041	K2EDTA	류마티스성 관절염	해당 없음	해당 없음	4950	4950	100.0%
BRH715042	K2EDTA	류마티스성 관절염	88	해당 없음	9250	9338	99.1%
BRH715043	K2EDTA	류마티스성 관절염	해당 없음	해당 없음	6900	6900	100.0%
BRH715044	시트르산나트륨	류마티스성 관절염	해당 없음	해당 없음	2850	2850	100.0%
BRH715045	시트르산나트륨	류마티스성 관절염	6600	1860	1520	9980	33.9%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합

[0406]

표 14

크론병을 갖는 개인으로부터의 혈장 샘플,
HMWK 신호, 레인에서의 2-사슬의 백분율

K2EDTA 및 시트르산 나트륨에서의 환원된 이환 상태 샘플, 크론병 및 건선								
샘플	항응고제	질환	HMWK 신호					레인 에서의 2-사슬(%)
			단일 사슬 (150 kDa)	단일 사슬 (110 kDa)	2-사슬 (56 kDa)	2-사슬 (46 kDa)	전체 신호	
A2992, N14	시트르산나트륨	정상	704	12900	384	576	14564	6.6%
BRH745047	시트르산나트륨	정상	1560	5820	해당 없음	192	7572	2.5%
BRH745076	시트르산나트륨	정상	5720	12300	382	480	18882	4.6%
BRH715026	K2EDTA	크론병	해당 없음	12100	1230	1950	15280	20.8%
BRH715027	K2EDTA	크론병	해당 없음	16300	668	1550	18518	12.0%
BRH715028	K2EDTA	크론병	해당 없음	6650	504	2250	9404	29.3%
BRH715029	K2EDTA	크론병	1900	14100	해당 없음	680	16680	4.1%
BRH715030	K2EDTA	크론병	해당 없음	1320	3230	6020	10570	87.5%

레인에서의 2-사슬(%): 2-사슬 신호의 합/전체 레인 신호의 합

[0407]

[0408]

다른 실시형태

[0409]

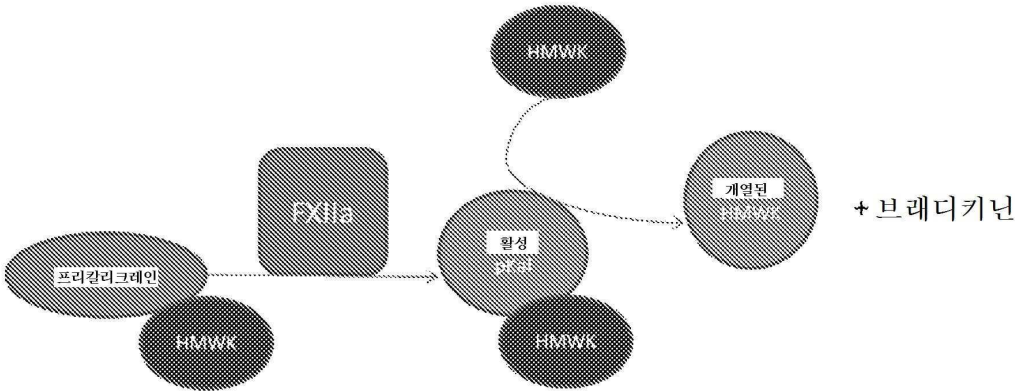
본 명세서에 개시된 모든 특징은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각각의 특징은 대안적인 특징에 의해 대체되어 동일한, 동등한 또는 유사한 목적을 제공할 수 있다. 따라서, 달리 명확히 기재되지 않은 한, 개시된 각각의 특징은 오직 동등한 또는 유사한 특징의 총체적 시리즈의 예이다.

[0410]

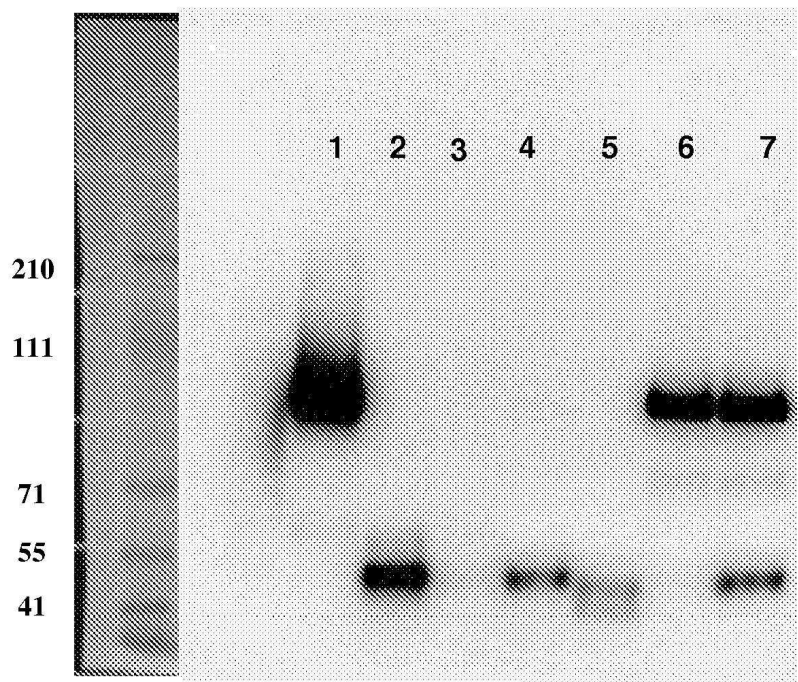
상기 설명으로부터, 당해 분야의 당업자는 본 발명의 필수적인 특징을 쉽게 확신할 수 있고, 이의 정신 및 범위를 벗어남이 없이, 본 발명의 다양한 변화 및 변형을 다양한 용법 및 조건에 적용하도록 이것을 만들 수 있다. 따라서, 다른 실시형태가 또한 청구범위 내에 있다.

도면

도면1

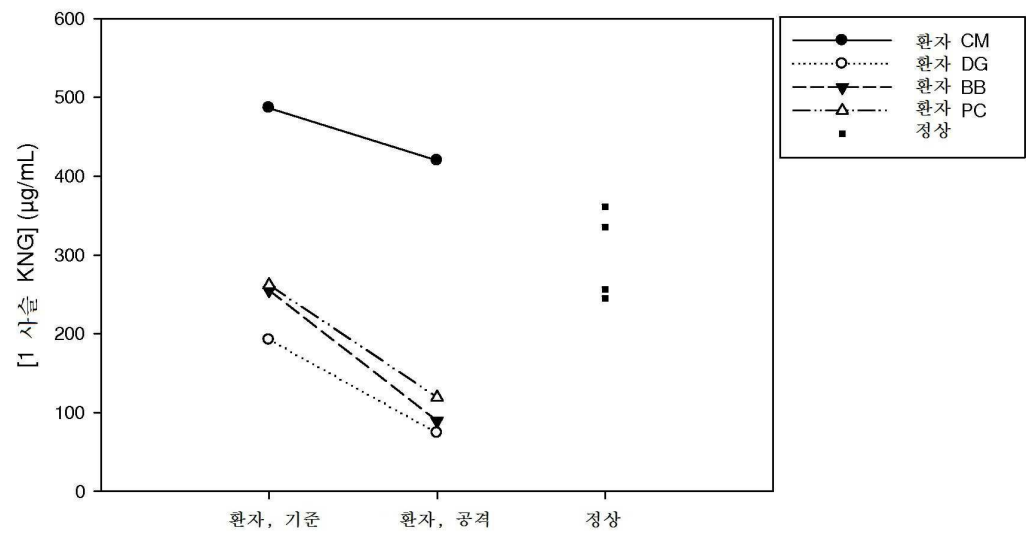


도면2

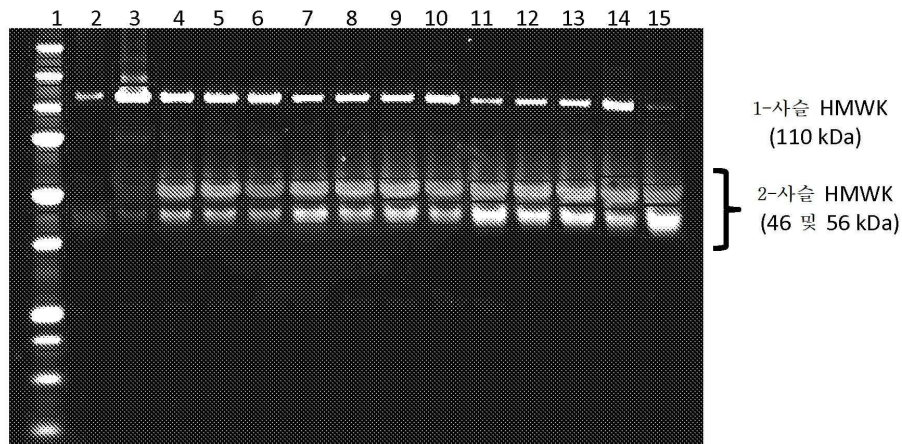


도면3

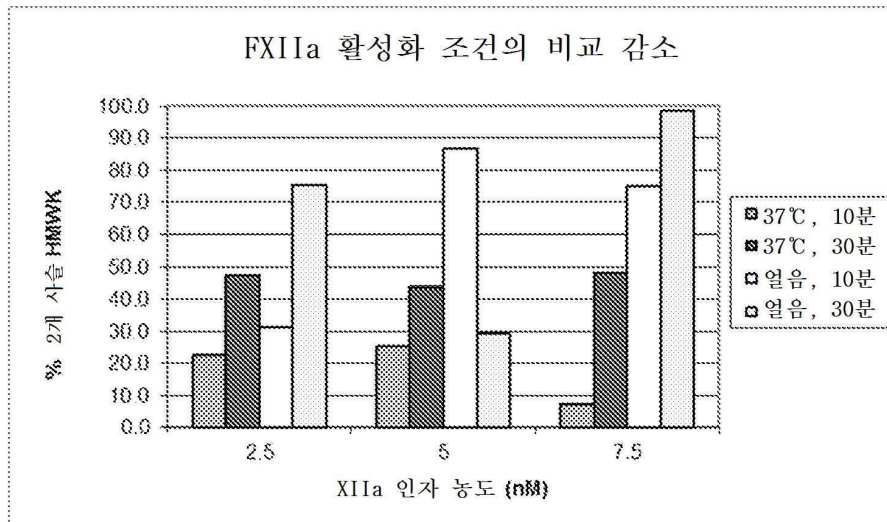
HAE 환자 항프로테아제 혈장에서의 웨스턴 블롯에 의한 온전한 1 사슬 키니노겐의 정량화



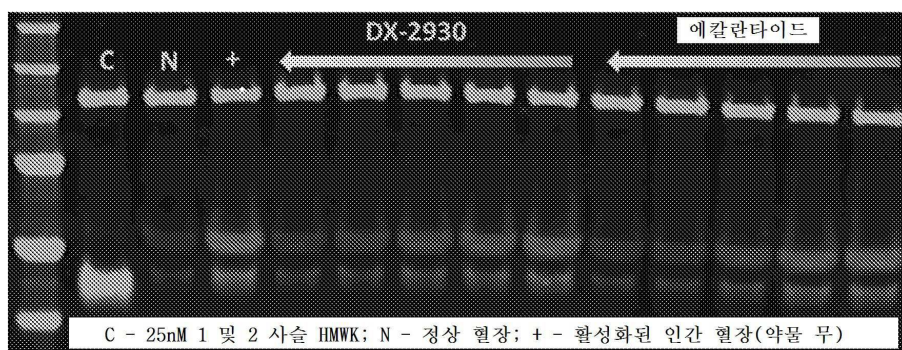
도면7a



도면7b

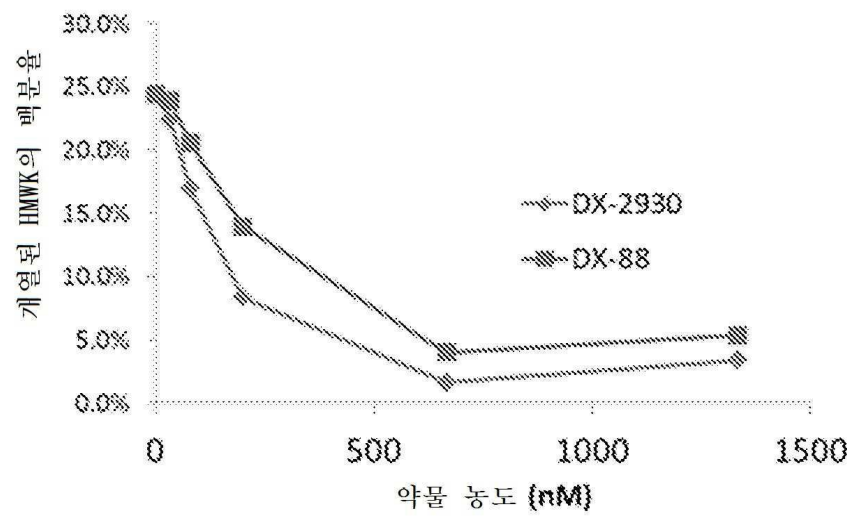


도면8a

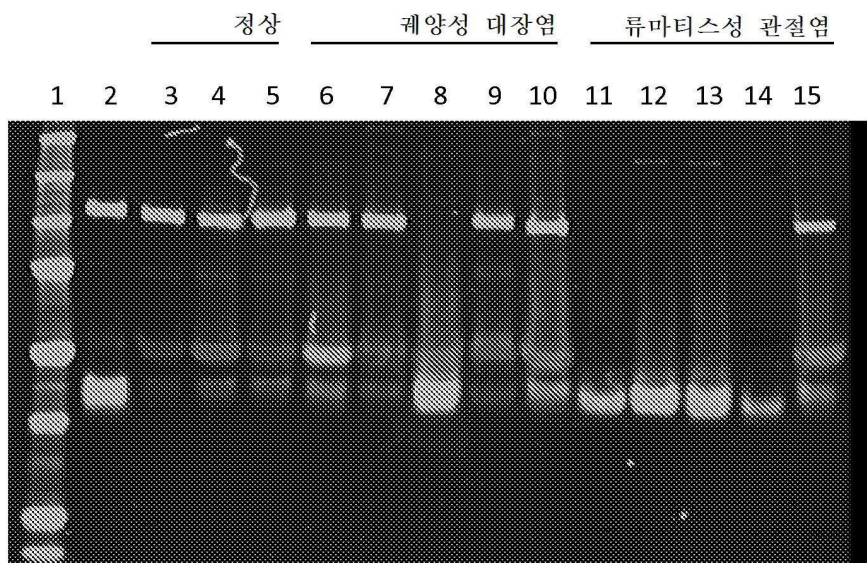


도면8b

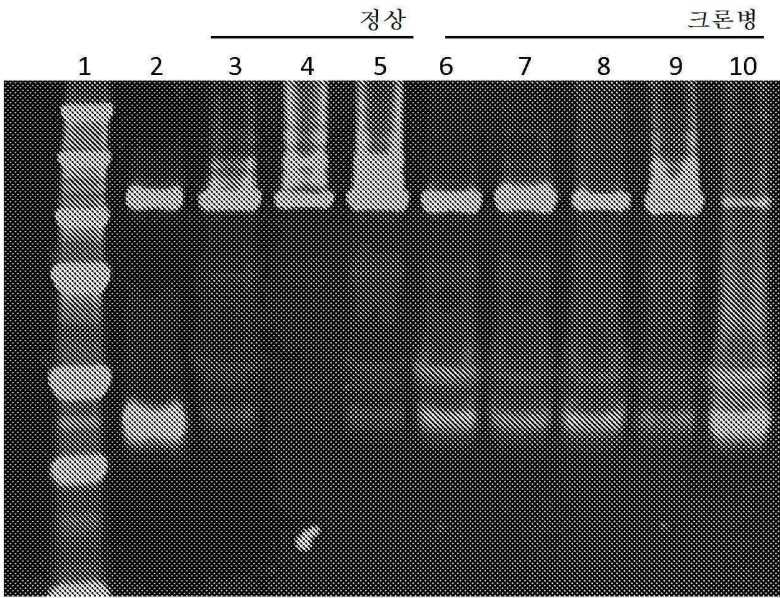
인간 혈장에서의 FXIIa 활성화에 의한 개열된 HMWK



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dyax Corp.

<120> EVALUATION AND TREATMENT OF BRADYKININ-MEDIATED DISORDERS

<130> WO2014/113712

<140> PCT/US2014/012107

<141> 2014-01-17

<150> US 61/754,607

<151> 2013-01-20

<160> 9

<170> PatentIn version 2.0

<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
 370 375 380
 Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr
 385 390 395 400
 Thr Val Ser Pro Pro His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu

 405 410 415
 Arg Asp Ser Gly Lys Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly
 420 425 430
 His Glu Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu
 435 440 445
 Arg Asp Gln Gly His Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly
 450 455 460
 His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp

 465 470 475 480
 Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys
 485 490 495
 His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys
 500 505 510
 Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser
 515 520 525

Glu Asp Ser Thr Thr Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly

530

535

540

Pro Thr Pro Ile Pro Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe

545

550

555

560

Ser Asp Phe Gln Asp Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile

565

570

575

Ser Pro Ala Pro Ile Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln

580

585

590

Ile Asp Pro Asn Gly Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp

595

600

605

Thr Thr Ser Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu

610

615

620

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 His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His
 50 55 60
 Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His
 65 70 75 80
 Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His
 85 90 95

 Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His
 100 105 110
 Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn
 115 120 125
 Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr
 130 135 140
 Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly Pro Thr Pro Ile Pro
 145 150 155 160

 Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe Ser Asp Phe Gln Asp

165 170 175
 Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile Ser Pro Ala Pro Ile
 180 185 190
 Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly
 195 200 205
 Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys
 210 215 220

Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu Ile Asn Pro Thr Thr
 225 230 235 240
 Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser
 245 250 255

<210> 4

<211> 304

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu

20 25 30
 Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
 35 40 45
 Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
 50 55 60
 Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
 65 70 75 80
 Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser

85 90 95
 Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
 100 105 110
 Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu

115 120 125
 Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
 130 135 140
 Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly

 145 150 155 160
 Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
 165 170 175
 Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
 180 185 190
 Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
 195 200 205
 Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly

 210 215 220
 Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly
 225 230 235 240
 Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn
 245 250 255
 Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile
 260 265 270
 Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys

 275 280 285
 Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met
 290 295 300
 <210> 5
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<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> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<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