



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111044725 B

(45) 授权公告日 2024.03.29

(21) 申请号 201911415224.8

(22) 申请日 2014.01.17

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111044725 A

(43) 申请公布日 2020.04.21

(30) 优先权数据
61/754,607 2013.01.20 US

(62) 分案原申请数据
201480005158.6 2014.01.17

(73) 专利权人 武田药品工业株式会社
地址 日本国大阪市中央区修道町四丁目1
番1号

(72) 发明人 D·J·塞克斯顿 R·福塞特
J·A·肯尼斯顿 G·康利
A·尼克森 C·汤乎尔
B·阿德尔曼 Y·群

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

专利代理师 郗名悦 刘文娜

(51) Int.Cl.
G01N 33/573 (2006.01)

(56) 对比文件
AU 2013205086 A1, 2013.05.16
WO 2004005934 A2, 2004.01.15
唐法娣等. 大鼠后肢热诱导的缓激肽和P物
质的释放. 中国药理学报. 1994, (第03期), 全文.
Joanna A. Phipps et al.. Plasma
Kallikrein Mediates Angiotensin II Type 1
Receptor-Stimulated Retinal Vascular
Permeability. 《Hypertension》. 2009, 第53卷
卷(第53卷期), 第175-181页.

审查员 陈慧慧

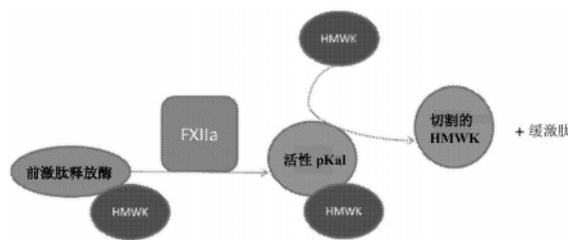
权利要求书1页 说明书48页
序列表9页 附图5页

(54) 发明名称

缓激肽介导的病症的评估和治疗

(57) 摘要

本发明涉及缓激肽介导的病症的评估和治
疗。本公开提供了评估受试者, 例如, 有pKa1介
导的或缓激肽介导的病症的风险或患有pKa1介
导的或缓激肽介导的病症的受试者的方法, 其基于
受试者的样品中完整的和/或切割的激肽原的值
(例如, 百分数)。提供了在评估和治疗中有用的、
允许分析患血浆激肽释放酶介导的血管性水肿
(KMA) 或pKa1介导的其他疾病的患者的方法。这
样的方法可包括使用优选结合切割的激肽原或
完整的激肽原的检测剂。



1. 测定样品中切割的激肽原的值、完整的激肽原的值或二者的体外方法,所述方法包括:

在允许检测剂和完整的HMWK和切割的HMWK之间相互作用的条件下,使包含完整的HMWK和切割的HMWK的样品接触检测剂,其中与完整的激肽原相比,所述检测剂特异性结合切割的HMWK,或与切割的HMWK相比,所述检测剂特异性结合完整的HMWK,其中所述检测剂不结合LMWK;其中HMWK是高分子量激肽原,LMWK是低分子量激肽原;

基于切割的HMWK和完整的HMWK与所述检测剂的相互作用,测量所述样品中所述切割的HMWK的水平和所述完整的HMWK的水平;

基于所述切割的HMWK的量和所述完整的HMWK的量,确定所述样品中所述切割的HMWK的值、所述完整的HMWK的值、或二者;

其中检测剂是在包含C-末端残基的表位处结合切割的HMWK的轻链的抗体。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述切割的HMWK的值或所述完整的HMWK的值是所述切割的HMWK的百分数或所述完整的HMWK的百分数。

3. 权利要求2所述的方法,其中确定所述切割的HMWK的百分数。

4. 权利要求1-3中任一项所述的方法,其中与完整的HMWK相比,所述抗体特异性结合所述切割的HMWK。

5. 权利要求1-3中任一项所述的方法,其中通过蛋白质印迹试验测量所述完整的HMWK的水平和所述切割的HMWK的水平。

6. 权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述样品是受试者的血液样品或血浆样品。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述受试者具有pKa1介导的病症的症状。

8. 权利要求6所述的方法,其中所述受试者在收集所述样品时没有pKa1介导的病症的症状、没有pKa1介导的病症症状的病史或没有pKa1介导的病症的病史。

缓激肽介导的病症的评估和治疗

[0001] 本申请是申请日为2014年1月17日、申请号为2014800051586 (PCT/US2014/012107)、发明名称为“缓激肽介导的病症的评估和治疗”的中国发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2013年1月20日提交的美国临时申请号61/754,607的申请日的益处。该参考申请的全部内容通过参考并入本文。

[0004] 背景

[0005] 血浆激肽释放酶 (pKa1) 是循环中主要的产生缓激肽的酶。经接触系统发生pKa1的激活,这已经与遗传性血管性水肿 (HAE) 相关的疾病病理学联系起来。缓激肽是疼痛、炎症、水肿和血管生成的关键介体。

[0006] 激肽原是激肽,比如缓激肽和激肽释放酶的前体。存在两种类型的人激肽原——高分子量激肽原 (HMWK) 和低分子量激肽原 (LMWK),其是剪接变体。HMWK主要用作凝聚和炎症的辅因子并且是pKa1介导的缓激肽产生的优选底物。HMWK和LMWK二者都是半胱氨酸蛋白酶抑制剂。

发明内容

[0007] 血浆激肽释放酶 (pKa1) 是接触系统的丝氨酸蛋白酶组分并且是循环中主要的产生缓激肽的酶。当通过脯氨酰羧肽酶暴露于外源或带负电荷的表面或在内皮细胞表面上时,通过因子XIIa激活接触系统 (Sainz I.M.等,Thromb Haemost 98,77-83,2007)。血浆激肽释放酶的激活经其对因子XII的反馈激活增强了内在凝聚并且经产生促炎性九肽缓激肽而加重炎症。作为循环中的主要激肽原酶,pKa1主要负责产生脉管系统中的缓激肽。血浆激肽释放酶的主要天然抑制剂——C1-抑制剂蛋白 (C1-INH) 的遗传缺陷导致遗传性血管性水肿 (HAE)。患HAE的患者遭受通常由未知的触发剂促发的疼痛水肿的急性发作 (Zuraw B.L.等,N Engl J Med 359,1027-1036,2008)。通过动物模型中药理学试剂的使用或遗传研究,血浆激肽释放酶-激肽系统 (血浆KKS) 已经牵涉到各种疾病。

[0008] 如本文所描述,开发了蛋白质印记试验用于检测完整的 (1-链) 和切割的 (2-链) 高分子量激肽原 (HMWK),其使用特异性 (例如,优选) 结合完整的激肽原或切割的激肽原,和任选地,不结合LMWK的检测剂 (例如,抗体)。这样的检测剂可用于监测患者血浆中1-链和2-链HMWK的相对量。通过应用该方法,发现在已知由过多的pKa1激活介导的疾病状态,比如水肿HAE发作的疾病状态下,患者样品中切割的激肽原的水平 (例如,百分数) 升高。可随后检测患其他疾病的患者的血浆中切割的激肽原的百分数,以确定活性pKa1是否与该疾病相关。已经检测并且相对于健康的血浆显示具有切割的激肽原升高的其他疾病包括类风湿性关节炎 (RA)、溃疡性结肠炎 (UC) 和克罗恩病 (Crohn's disease)。

[0009] 因此,本公开的一个方面涉及鉴定有pKa1介导的病症的风险或具有pKa1介导的病症的受试者的方法,方法包括: (a) 经,例如,蛋白质印迹试验测量受试者的样品 (例如,血液样品或血浆样品) 中切割的激肽原 (例如, HMWK) 的水平 and 完整的激肽原 (例如, HMWK) 的水平; (b) 确定样品中切割的激肽原的值 (例如,百分数)、完整的激肽原的值 (例如,百分数) 或

二者;和(c)如果切割的激肽原的值、完整的激肽原的值或二者偏离参考值,鉴定受试者有pKa1介导的病症的风险或具有pKa1介导的病症。在一些例子中,测定切割的激肽原的百分数并且如果样品中切割的激肽原的百分数处于参考值或高于参考值,则鉴定受试者有目标疾病的风险具有目标疾病。

[0010] 在一些实施方式中,通过检测剂(例如,抗体)测量切割的激肽原和完整的激肽原的水平,所述检测剂特异性(例如,优选)结合切割的或完整的激肽原。这样的检测剂(例如,抗体)可结合完整的和切割的激肽原二者,但是不结合LMWK。在其他实施方式中,通过检测剂(例如,抗体)测量切割的激肽原和完整的激肽原的水平,所述检测剂与完整的激肽原相比,特异性结合切割的激肽原或与切割的激肽原相比,特异性结合完整的激肽原。在一个例子中,检测剂是与完整的激肽原相比特异性结合切割的激肽原的抗体。在另一例子中,检测剂是结合LMWK中不存在的切割的激肽原的轻链C-末端的抗体。

[0011] pKa1介导的病症可以是遗传性血管性水肿(HAE)、类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎或克罗恩病。如果受试者被鉴定有pKa1介导的病症风险或具有pKa1介导的病症,如本文所描述的方法可进一步包括施用有效量的pKa1抑制剂至受试者。在一些例子中,pKa1抑制剂是DX-88、EPIKAL-2或DX-2930。

[0012] 在一些实施方式中,样品来自具有pKa1介导的病症症状的受试者,所述症状包括但不限于水肿、肿胀的复发性发作、肿胀——其中所述肿胀完全或主要是外周的、荨麻疹、发红、疼痛和没有感染的迹象的肿胀;或非组胺介导的水肿。在其他实施方式中,样品来自在收集样品时没有pKa1介导的病症的症状、没有pKa1介导的病症症状的病史或没有pKa1介导的病症的病史的受试者。可选地或另外,受试者抵抗抗组胺疗法、皮质类固醇疗法或二者。

[0013] 在另一方面中,本公开提供了测定病症是否易于用pKa1抑制剂治疗的方法,所述方法包括:(a)测量具有病症的受试者的样品(例如,血液样品或血浆样品)中切割的激肽原(例如,HMWK)的水平和完整的激肽原(例如,HMWK)的水平;(b)确定样品中切割的激肽原的值(例如,百分数)、完整的激肽原的值(例如,百分数)或二者;和(c)如果切割的激肽原的值、完整的激肽原的值或二者偏离参考值,则鉴定病症易于用pKa1抑制剂治疗。在一个例子中,测定切割的激肽原的百分数和切割的激肽原的百分数处于参考值或高于参考值时疾病鉴定为易于治疗。

[0014] 在一些实施方式中,通过检测剂(例如,抗体)测量切割的激肽原和完整的激肽原的水平,所述检测剂与完整的激肽原相比特异性结合切割的激肽原或与切割的激肽原相比特异性结合完整的激肽原。在一些例子中,检测剂是与完整的激肽原相比特异性结合切割的激肽原的抗体。在其他例子中,检测剂是结合切割的激肽原的轻链C-末端的抗体。在本文所述的任何方法中,可通过蛋白质印迹试验测量完整的激肽原和切割的激肽原的水平。

[0015] 如果病症被鉴定为易于用pKa1抑制剂进行治疗,方法可进一步包括向受试者施用有效量的pKa1抑制剂,其包括但不限于DX-88、EPIKAL-2或DX-2930。

[0016] 在又另一方面中,本公开提供了评估受试者中pKa1介导的病症的治疗方法,所述方法包括:(a)测量在治疗之前和之后或治疗过程期间从受试者收集的样品(例如,血液样品或血浆样品)中切割的激肽原(例如,HMWK)的水平和完整的激肽原(例如,HMWK)的水平;(b)基于相同样品中切割的和完整的激肽原的水平,确定每个样品中切割的激肽原的值

(例如,百分数)、完整的激肽原的值(例如,百分数)或二者;和(c)基于治疗之前和之后或在治疗过程中切割的和/或完整的激肽原值的改变,评估治疗效力。例如,治疗之后或在治疗过程中切割的激肽原百分数的下降指示治疗对于受试者是有效的。在一些实施方式中,治疗包括向受试者施用有效量的pKa1抑制剂,例如,DX-88、EPIKAL-2或DX-2930。

[0017] 在本文所述的任何评估方法中,可通过检测剂(例如,抗体)测量切割的激肽原和完整的激肽原的水平,所述检测剂与完整的激肽原相比特异性结合切割的激肽原或与切割的激肽原相比特异性结合完整的激肽原。在一些例子中,检测剂是与完整的激肽原相比特异性结合切割的激肽原的抗体。在其他例子中,检测剂是结合切割的激肽原的轻链C-末端的抗体。在本文所述的任何方法中,可通过蛋白质印迹试验测量完整的激肽原和切割的激肽原的水平。

[0018] 在一些实施方式中,pKa1介导的病症是遗传性血管性水肿(HAE)、类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎或克罗恩病。

[0019] 此外,本公开提供了测定样品中切割的激肽原的值、完整的激肽原的值或二者的方法,所述方法包括(a)在允许检测剂和完整的和切割的激肽原之间相互作用的条件下,使包含完整的和切割的激肽原的样品(例如,血液样品或血浆样品)接触检测剂,其中检测剂与完整的激肽原相比特异性结合切割的激肽原或与切割的激肽原相比特异性结合完整的激肽原; (b)基于它们与检测剂的相互作用,测量样品中切割的激肽原和/或完整的激肽原的水平;和(c)基于切割的激肽原和完整的激肽原的水平,确定样品中切割的激肽原的值(例如,百分数)、完整的激肽原的值(例如,百分数)或二者。在一些实施方式中,检测剂是抗体,比如与完整的激肽原相比特异性结合切割的激肽原的抗体或结合切割的激肽原的轻链C-末端的抗体。在一些实施方式中,通过蛋白质印迹试验测量完整的激肽原和切割的激肽原的量。

[0020] 也在本公开范围内的是(i)治疗pKa1介导的疾病的方法,包括向需要其的受试者施用有效量的如本文所描述的pKa1抑制剂,其中受试者的切割的激肽原的值(例如,百分数)、完整的激肽原的值(例如,百分数)或二者偏离参考值,(ii)用于治疗受试者的pKa1介导的疾病的药学组合物,其中组合物包括pKa1抑制剂和药学上可接受的载体,并且其中受试者具有与参考值相比偏离的切割的激肽原和/或完整的激肽原的值,和(iii)药学组合物用于制造用于治疗pKa1介导的疾病,例如,HAE的药物中的用途。在一些实施方式中,切割的和/或完整的激肽原的值是样品中切割的和/或完整的激肽原的百分数。

[0021] 下述实施方式也在本公开的范围内:

[0022] 本文提供了评估受试者的方法,例如,有pKa1介导的或缓激肽介导的病症的风险或遭受pKa1介导的或缓激肽介导的病症的受试者。提供的方法允许分析患血浆激肽释放酶介导的血管性水肿(KMA)或由用于评估和治疗的pKa1介导的其他疾病的患者。

[0023] 本公开的实施方式提供了生物标记物及其在鉴定和治疗患者,例如,患有由血浆激肽释放酶产生的缓激肽造成的水肿的患者中的用途。本文公开的方法、组合物和设备以许多方式有用。例如,pKa1标记物的水平可用于鉴定与升高的接触系统激活相关的病症。初始筛选之后可用血浆激肽释放酶抑制剂(例如DX-88、EPIKAL2或DX-2930)进行体外或体内测试,例如,在疾病的临床前模型中。本文公开的标记物可也用作药效生物标记物或以其他方式监测受试者对激肽释放酶抑制剂的响应。本文公开的标记物可用于伴随

(companion) 诊断,以能够治疗由血浆激肽释放酶介导的疾病、pKa1介导的或缓激肽介导的病症的预防性疗法期间的控制剂量,所述病症例如HAE、非组胺-依赖性特发性血管性水肿、类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、狼疮、阿尔茨海默氏疾病、败血症性休克、烧伤、脑缺血性/再灌注损伤、脑水肿、糖尿病性视网膜病、糖尿病性肾病变、黄斑性水肿、血管炎、动脉或静脉血栓形成、与心室辅助设备或支架相关的血栓形成、具有血栓形成的肝素-诱导的血小板减少、血栓栓塞病、和伴随不稳定的心绞痛的冠心病、水肿、眼病、痛风、肠疾病、口腔粘膜炎、神经病痛、炎性疼痛、椎管狭窄退行性脊柱病、术后肠梗阻 (post operative ileus)、大动脉动脉瘤、骨性关节炎、遗传性血管性水肿、肺栓塞、中风、头部创伤或瘤周脑水肿 (peri-tumor brain edema)、脓毒症、急性脑中动脉 (MCA) 缺血性事件 (中风)、再狭窄 (例如,血管成形术之后)、系统性红斑狼疮肾炎、自身免疫疾病、炎性疾病、心血管疾病、神经疾病、与蛋白质错折叠相关的疾病、与血管生成相关的疾病、高血压肾病变和糖尿病性肾病变、变应性疾病和呼吸疾病 (例如过敏症、哮喘、慢性阻塞性肺部疾病、急性呼吸窘迫综合征、囊性纤维化、持续性鼻炎) 和组织损伤 (例如烧伤或化学损伤)。本公开提供了评估或治疗受试者的方法,例如,区分pKa1介导的病症例如缓激肽介导的血管性水肿与组胺介导的病症的方法,或预测pKa1介导的病症的将来发作的方法,所述方法包括获取,例如,测定本文公开的与pKa1激活相关联的一个或多个标记物 (pKa1标记物),例如,完整的激肽原和切割的激肽原的水平,从而评估或治疗所述受试者。在一些实施方式中,方法包括获取,例如检测,与组胺介导的炎症反应相关联的一个或多个标记物 (H-标记物) 例如,类胰蛋白酶的水平。

[0024] 在一些实施方式中,所述pKa1介导的病症是HAE、IAE、IBD或IBS。在一些实施方式中,所述pKa1介导的病症选自非组胺-依赖性特发性血管性水肿、类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、狼疮、阿尔茨海默氏疾病、败血症性休克、烧伤、脑缺血性/再灌注损伤、脑水肿、糖尿病性视网膜病、糖尿病性肾病变、黄斑性水肿、血管炎、动脉或静脉血栓形成、与心室辅助设备或支架相关的血栓形成、具有血栓形成的肝素-诱导的血小板减少、血栓栓塞病、和伴随不稳定的心绞痛的冠心病、水肿、眼病、痛风、肠疾病、口腔粘膜炎、神经病痛、炎性疼痛、椎管狭窄退行性脊柱病、术后肠梗阻、大动脉动脉瘤、骨性关节炎、遗传性血管性水肿、肺栓塞、中风、头部创伤或瘤周脑水肿、脓毒症、急性脑中动脉 (MCA) 缺血性事件 (中风)、再狭窄 (例如,血管成形术之后)、系统性红斑狼疮肾炎、自身免疫疾病、炎性疾病、心血管疾病、神经疾病、与蛋白质错折叠相关的疾病、与血管生成相关的疾病、高血压肾病变和糖尿病性肾病变、变应性疾病和呼吸疾病 (例如过敏症、哮喘、慢性阻塞性肺部疾病、急性呼吸窘迫综合征、囊性纤维化、持续性鼻炎) 和组织损伤 (例如烧伤或化学损伤)。

[0025] 本公开也提供了评估或治疗受试者的方法,所述受试者具有与pKa1介导的病症,例如,缓激肽介导的血管性水肿,和组胺相关的病症二者一致的症状,所述方法包括a) 任选地,确定所述受试者具有与pKa1介导的病症和组胺相关的病症之一或二者一致的症状,例如,水肿或腹部不适;b) 如果所述受试者还未用针对所述症状的抗组胺疗法进行治疗,那么用抗组胺疗法治疗所述受试者;c) 获取,例如检测与pKa1激活相关联的一个或多个标记物 (pKa1标记物),例如,完整的激肽原和切割的激肽原的水平;d) 如果所述水平符合预定的标准,例如,如果其为参考水平或高于参考水平:选择受试者用于激肽释放酶抑制剂疗法;或施用激肽释放酶抑制剂至所述受试者,从而评估或治疗所述受试者。在一些实施方式中,方

法包括选择受试者用于激肽释放酶抑制剂疗法。在某些实施方式中,方法包括施用激肽释放酶抑制剂至所述受试者。在具体的实施方式中,对用于激肽释放酶抑制剂疗法的受试者的选择;或施用激肽释放酶抑制剂至所述受试者发生在测定受试者对所述抗组胺疗法无响应之前,例如,发生在用抗组胺疗法进行的所述治疗的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个小时之内。在一些实施方式中,测定所述受试者具有与pKa1介导的病症和组胺相关的病症二者一致的症状和从所述患者采集样品用于测定pKa1标记物的水平发生在:彼此的30分钟、1、2或3个小时之内;或在护理提供者的相同访问时。

[0026] 在一些实施方式中,所述pKa1抑制剂选自DX-88、DX-2930或EpiKa1-2。

[0027] 在一些实施方式中,方法包括获取,例如测定与组胺介导的炎症反应相关联的一个或多个标记物(H-标记物)的水平。在某些实施方式中,评估所述受试者是否易发pKa1介导的病症。在某些实施方式中,所述受试者具有,例如与pKa1介导的病症一致的症状,例如水肿,例如,HAE。在某些实施方式中,所述受试者具有特征在于有害pKa1激活的病症的症状和所述受试者已经被施用抗组胺疗法。在具体的实施方式中,在本文公开的测定步骤之前或之后的1、2、3、4、5、6、7、8、8或10个小时之内施用所述抗组胺疗法。在具体的实施方式中,方法进一步包括施用抗组胺疗法至所述受试者,例如,在本文公开的评估或测定之前、之后或期间。

[0028] 在一些实施方式中,响应所述测定或评估,施用激肽释放酶抑制剂至所述受试者。在某些实施方式中,所述受试者具有下述症状或特性中的一个或多个或所有:肿胀的复发性发作;肿胀,其中所述肿胀完全或主要是外周的,例如,受试者没有明显的腹部或呼吸道肿胀;荨麻疹;发红、疼痛和没有感染的迹象的肿胀;对抗组胺剂或皮质类固醇疗法无响应;或具有非组胺介导的水肿。在某些实施方式中,所述受试者具有持续的或复发水肿并且对抗组胺和类固醇疗法之一或二者无响应。在某些实施方式中,受试者没有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史;受试者具有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,受试者没有HAE的病史;受试者具有HAE的病史;受试者没有IAE的病史;受试者具有IAE的病史;受试者没有IBD或IBS的病史;受试者具有IBD或IBS的病史;受试者没有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史;受试者具有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史;受试者没有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和没有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史;或受试者没有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和具有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史;受试者具有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和没有组胺介导的病症,食物过敏的病史;或受试者具有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和具有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史。

[0029] 在一些实施方式中,例如在预防性疗法中,例如针对HAE,受试者已经用激肽释放酶抑制剂进行治疗,,并且受试者对激肽释放酶抑制剂的响应被评估或监测,和任选地,响应所述监测,选择或施用疗法,例如,响应测定,调整激肽释放酶抑制剂的剂量。在一些实施方式中,在伴随诊断的背景下进行pKa1标记物的测定,和任选地,基于测定,提供或阻止治疗剂的施用。在某些实施方式中,依赖于响应所述治疗来鉴定即将发生的急性发作,例如HAE或IEA发作。在具体的实施方式中,针对易发特发性血管性水肿评估所述受试者。在具体的实施方式中,所述评估包括测定所述受试者是否患有pKa1介导的病症,例如,缓激肽介导的病症,例如,pKa1介导的血管性水肿,或患有组胺介导的病症,例如,过敏食物反应。

[0030] 在一些实施方式中,受试者没有pKa1介导的病症,例如,HAE或IAE的病史。在一些实施方式中,受试者具有pKa1介导的病症,例如,HAE或IAE的病史。在一些实施方式中,受试者没有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史;受试者具有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,受试者没有HAE的病史;受试者具有HAE的病史;受试者没有IAE的病史;受试者具有IAE的病史;受试者没有IBD或IBS的病史;受试者具有IBD或IBS的病史;受试者没有组胺介导病症,例如,食物过敏的病史;受试者具有组胺介导病症,例如,食物过敏的病史;受试者没有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和没有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史;或受试者没有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和具有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史:受试者具有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和没有组胺介导的病症,食物过敏的病史;或受试者具有pKa1介导的病症,例如,HAE、IAE、IBD或IBS的病史,和具有组胺介导的病症,例如,食物过敏的病史。

[0031] 在一些实施方式中,用基于抗体的试剂检测pka标记物,例如,本文公开的pKa1标记物。在某些实施方式中,用夹心免疫试验检测pKa1标记物。在某些实施方式中,方法包括例如通过电泳分离试验例如蛋白质印迹获取例如检测激肽原例如完整的或切割的激肽原之一或二者的水平。在一些实施方式中,在依赖于分离例如电泳分离例如通过蛋白质印迹分离分析物与其他产物的试验中,检测pKa1标记物,例如,激肽原。

[0032] 在一些实施方式中,用夹心免疫试验检测pKa1标记物并且在依赖于分离例如电泳分离例如通过蛋白质印迹分离分析物与其他产物的试验中,检测第二pKa1标记物,例如,激肽原。在某些实施方式中,pKa1标记物的检测是定性的。在某些实施方式中,pKa1标记物的检测是定量的。在具体的实施方式中,完整的激肽原和切割的激肽原的水平均被检测。

[0033] 在一些实施方式中,方法包括比较pKa1标记物,例如,完整的激肽原或切割的激肽原的水平与参考值。在某些实施方式中,所述参考值是例如一个或多个HAE受试者中HAE中所述pKa1标记物水平的函数。在某些实施方式中,所述参考值是例如一个或多个急性发作期间的HAE受试者中发作期间的HAE中所述pKa1标记物的水平的函数。在某些实施方式中,所述参考值是例如一个或多个IAE受试者中IAE中的pKa1标记物的水平的函数。在某些实施方式中,所述参考值是例如一个或多个急性发作中的IAE受试者中的急性发作的IAE中的pKa1标记物的水平的函数。在某些实施方式中,所述参考值是例如在没有HAE或IAE病史的一个或多个受试者中在没有HAE或IAE的情况下pKa1标记物的水平的函数。

[0034] 在具体的实施方式中,方法包括例如,响应比较,对受试者分类,例如,针对pKa1介导的病症的风险对受试者分类,或对受试者施用疗法或阻止对受试者施用疗法。在某些实施方式中,方法包括,例如,响应比较,选择用于所述受试者的治疗。在一些实施方式中,方法包括,例如,响应比较,对受试者施用疗法或阻止对受试者施用疗法,例如,激肽释放酶结合剂;缓激肽B2受体拮抗剂;或C1-INH取代剂(replacemen agent)。在具体的实施方式中,所述治疗是施用pKa1抑制剂,例如,选自DX-88;EpiKa1-2,和DX-2930的pKa1抑制剂。

[0035] 在一些实施方式中,来自所述受试者的样品接触包含针对两个或更多个标记物的捕获剂的底物,例如,所述标记物来自:pKa1标记物或H标记物,例如,抗H标记物抗体;任选地,其中至少一种捕获剂是针对pKa1标记物的捕获剂。

[0036] 在一些实施方式中,方法包括获取样品,例如,来自所述受试者的血液或血浆样

品。

[0037] 在一些实施方式中,第一捕获剂(针对第一标记物)和第二捕获剂(针对第二标记物)放置在底物上,以便针对第一标记物的存在的信号可与针对第二标记物的存在的信号区分开。在某些实施方式中,所述第一捕获剂(针对第一标记物)位于第一位置或地址和所述第二捕获剂(针对第二标记物)位于第二位置或地址。在具体的实施方式中,所述第一位置或地址和所述第二位置或地址在所述底物上不重叠。在某些实施方式中,所述第一捕获剂针对第一pKa1标记物。在某些实施方式中,所述第一捕获剂针对第一pKa1标记物和所述第二捕获剂针对第二pKa1标记物。在某些实施方式中,所述第一捕获剂针对pKa1标记物和所述第二捕获剂针对H-标记物。

[0038] 在某些实施方式中,方法包括使底物接触例如可检测的抗体,以测定pKa1标记物的存在和量。在某些实施方式中,用下述部分标记所述抗体,所述部分产生有颜色的产物,发射光子,吸收光子,改变底物或改变底物的传导性。在某些实施方式中,用使用电化学发光的部分标记所述抗体。在某些实施方式中,用resinium标记所述抗体。在具体的实施方式中,所述底物提供在中尺度发现(meso scale discovery)设备中。在具体的实施方式中,所述底物提供为浸量尺(dip-stick)设备,适于与血液和血浆之一或二者一起使用。在具体的实施方式中,所述第一捕获剂和所述第二捕获剂布置在多室设备例如多孔板中的共同的或流体连接的室中,例如室,例如,孔或凹陷中。在具体的实施方式中,所述第一捕获剂和所述第二捕获剂被印记在底物上。

[0039] 在一些实施方式中,针对第一pKa1标记物的所述捕获剂在所述底物的第一位置上和针对第二pKa1标记物的所述捕获剂在所述底物的第二位置上,和所述第一和第二位置布置在所述底物上,使得针对第一pKa1标记物的存在的信号可与第二pKa1标记物的信号区分开。在某些实施方式中,所述底物在第三位置包括针对第三标记物的捕获剂,并且第三位置布置在所述底物上,使得针对第三标记物的存在的信号可与所述第一和第二标记物的信号区分开。

[0040] 在一些实施方式中,可在底物接触所述样品的1、2、3、4或5个小时之内测定样品中pKa1标记物的水平。在某些实施方式中,可在底物接触所述样品的1、2、3、4或5个小时之内测定样品中两种pKa1标记物的水平。在某些实施方式中,在同时进行的试验中,例如彼此重叠的测试的孵育或其他间隔中,进行两种pKa1标记物的水平的测定。

[0041] 在另一方面中,本发明提供了包括针对例如如本文所描述的多个pKa1标记物的捕获剂的底物。

[0042] 在进一步的方面中,本发明提供了确定病症是否易于用pKa1抑制剂治疗的方法,其包括:在例如遭受所述病症的受试者或所述病症的动物模型中,评估例如如本文所描述的一个或多个pKa1标记物的水平;比较测定的水平与参考,其中符合预定的标准的水平,例如,如果其为参考水平或高于参考水平,指示病症易于用pKa1抑制剂治疗。在某些实施方式中,方法包括评估激肽释放酶抑制剂在体外或体内或在所述病症的动物模型中的作用。

[0043] 在另一方面中,本发明提供了治疗具有pKa1介导的病症例如缓激肽介导病症的受试者的方法,包括例如通过本文所述的方法评估本文所述的pKa1标记物的水平、测定和响应所述评估选择治疗,例如,选择激肽释放酶抑制剂的剂量或给药频率之一或二者。在某些实施方式中,方法包括施用激肽释放酶抑制剂至所述受试者。在某些实施方式中,所述患

者在所述评估之前已经被施用激肽释放酶抑制剂。在某些实施方式中,方法包括以所述选择的剂量或频率施用激肽释放酶抑制剂。

[0044] 在进一步的方面中,本发明提供了确定病症是否易于用pKa1抑制剂治疗的方法,其包括:在例如遭受所述病症的受试者或所述病症的动物模型中,评估例如如本文所描述的一个或多个pKa1标记物的水平;比较测定的水平与参考,其中符合预定的标准的水平,例如,如果其为参考水平或高于参考水平,指示病症易于用pKa1抑制剂治疗。在一些实施方式中,方法包括评估激肽释放酶抑制剂在体外或体内或在所述病症的动物模型中的作用。

[0045] 在另一方面中,本发明特征在于方法和设备,其用于以最小的接触激活收集样品,例如,血液。在一种实施方式中,本发明特征在于容器,其中放置有本文所述的捕获剂,例如,激肽释放酶抑制剂,例如,序列与DX-88类似的多肽,例如,与DX-88差异不超过1、2或5个氨基酸残基的多肽,例如,EPIKAL-2。容器配备有例如,孔、开口、隔膜等,以便允许从受试者收集样品,例如,血液,并且在相同容器中使样品中的pKa1相关的标记物例如pKa1,与捕获剂结合。结合种类例如pKa1的测量可在相同容器中进行,或者在底物从测量的之前的容器中去掉的实施方式中进行,例如测量可在另一设备中或其上进行。在实施方式中,容器的容积(volume)是0.5-100、0.5-50、.5-10、1-100、1-50,是1-25ml。在实施方式中,捕获剂例如pKa1捕获剂放置在容器的内表面上。捕获剂可用结合表面的第一特异性结合伴侣(partner)和偶联至捕获剂的第二特异性结合伴侣而偶联至表面。特异性结合伴侣的例子是生物素和抗生物素蛋白。在实施方式中,生物素化的捕获剂例如pKa1捕获剂,例如激肽释放酶抑制剂,例如序列与DX-88类的多肽,例如与DX-88差异不超过1、2或5个氨基酸残基的多肽,例如Epikal-2放置在涂布抗生物素蛋白的容器的表面上。

[0046] 本公开提供了能够鉴定患血浆激肽释放酶介导的血管性水肿(KMA)或用于评估和治疗的pKa1介导的其他疾病的患者的生物标记物。

[0047] 经生物标记物显示展示pKa1激活的患者是用pKa1抑制剂,比如DX-88进行治疗的候选人,DX-88是批准用于治疗急性水肿发作相关的HAE的pKa1的小蛋白质抑制剂。其他pKa1抑制剂包括DX-2930,其是全人抗体抑制剂。在一些实施方式中,经生物标记物显示展示pKa1激活的患者是用缓激肽B2受体拮抗剂例如Incatibant(**Firazyr®**)进行治疗的候选人。在一些实施方式中,经生物标记物显示展示pKa1激活的患者是用C1-INH取代剂例如纯化的人巴氏消毒的、纳米过滤的C1-INH浓缩物(**Beriner®**)进行治疗的候选人。

[0048] 本发明的实施方式提供了生物标记物和其在鉴定和治疗患者例如遭受由血浆激肽释放酶产生的缓激肽造成的水肿患者中的用途。本文公开的方法、组合物和设备在许多方式中都有用。例如,pKa1标记物的水平可用于鉴定与升高的接触系统激活相关的病症。初始筛选之后可以用血浆激肽释放酶抑制剂(例如DX-88、EPIKAL-2或DX-2930)进行体外或体内测试,例如在疾病的临床前模型中。本文公开标记物的可也用作药效生物标记物或以其他方式监测受试者对激肽释放酶抑制剂的响应。本文公开的标记物可用于伴随诊断,以能够治疗由血浆激肽释放酶介导的疾病,在HAE的预防性疗法期间控制剂量或鉴定即将发生的急性HAE发作。

[0049] 所有引用的参考文献的内容——包括遍及本申请引用的文献参考,出版的专利,公开的或非公开的专利申请以及下面列举的那些的内容在这里通过参考以它们的全部明

确并入本文,用于本文的目的或本文引用的主题。

附图说明

[0050] 图1是对参与血浆激肽释放酶的接触系统激活的描绘。

[0051] 图2显示通过蛋白质印迹分析进行的切割的激肽原检测。使用SDS-PAGE (3-8% Tris (三羟甲基氨基甲烷)-乙酸盐) 在还原条件下分析样品,随后转移至PVDF膜和进行免疫印迹。泳道1-50nM完整的激肽原;泳道2-50nM切割的激肽原;泳道3-50nM低分子量激肽原;泳道4-1:20柠檬酸钠人血浆(玻璃收集管);泳道5-1:20柠檬酸钠人血浆(塑料) 激肽释放酶处理的;泳道6-1:20柠檬酸钠人血浆(塑料);泳道7-1:20柠檬酸钠人血浆(塑料),添加20nM 2链激肽原。

[0052] 图3显示发作期间获得的患者样品中完整的激肽原(即,1-链)的检测。在包含抗蛋白酶混合物的柠檬酸盐(citrated)血浆管中收集患者血浆样品。

[0053] 图4显示通过pKa1切割之后1-链HMWK和2-链HMWK的结构域结构和使用结合切割的激肽原的轻链的抗体检测HMWK的链-1和链-2的蛋白质印迹。C1=1-链HMWK,C2=2-链HMWK,G=玻璃,P=塑料。

[0054] 图5显示作为半定量的试验的纯化的HMWK的LICOR检测。在HMWK缺陷人血浆中从90 μ g/mL至5.6 μ g/mL滴定纯化的人HMWK和切割的HMWK。将样品1:20稀释至TBS和上样缓冲液(具有DTT)中。稀释的样品在4-12%bis-tris(二(2-羟乙基)亚胺基三(羟甲基)甲烷)凝胶上跑胶,并且电泳之后,转移至硝化纤维素膜。封闭之后,使用小鼠抗人HMWK抗体(克隆#11H05)——对HMWK的轻链是特异性的——和山羊抗小鼠IR染料680使印记可视化。使用LICOR Odyssey IR扫描仪扫描凝胶,所述扫描仪能够检测IR染料680的激发信号。

[0055] 图6显示HAE患者样品的蛋白质印迹和LICOR分析并且显示HAE患者样品展示更高内源水平的切割的HMWK。通过Licor分析,当与非疾病状态血浆比较时,基础和发作HAE患者血浆具有更高百分数的切割的HMWK。在抗蛋白酶溶液中收集分析的血浆样品,其当与在相同收集时间来自相同患者的柠檬酸钠血浆样品比较时,保护HAE患者血浆避免进一步接触激活。图中的误差棒表示标准偏差。

[0056] 图7显示蛋白质印迹和描绘FXIIa激活条件的评估的图。图7A:用不同浓度的FXIIa在不同温度(冰对比37 $^{\circ}$ C)和孵育时间(10对比30分钟)下激活的正常人血浆的蛋白质印迹与Licor检测。泳道1:分子量标记物;泳道2:纯化的1-链和2-链HMWK;泳道3:正常人血浆;泳道4:正常人血浆+2.5nM FXIIa,37C下10分钟;泳道5:正常人血浆+2.5nM FXIIa,37C下30分钟;泳道6:正常人血浆+2.5nM FXIIa,冰上10分钟;泳道7:正常人血浆+2.5nM FXIIa,冰上30分钟;泳道8:正常人血浆+5nM FXIIa,37C下10分钟;泳道9:正常人血浆+5nM FXIIa,37C下30分钟;泳道10:正常人血浆+5nM FXIIa,冰上10分钟;泳道11:正常人血浆+5nM FXIIa,冰上30分钟;泳道12:正常人血浆+7.5nM FXIIa,37C下10分钟;泳道13:正常人血浆+7.5nM FXIIa,37C下30分钟;泳道14:正常人血浆+7.5nM FXIIa,冰上10分钟;泳道15:正常人血浆+7.5nM FXIIa,冰上30分钟。图7B:每个泳道中使用Licor信号强度测定的双链HMWK的百分数[%2-链HMWK=(46kDa信号+56kDa信号)/(46kDa信号+56kDa信号+110kDa信号)]。

[0057] 图8显示蛋白质印迹和描绘DX-88和DX-2930对pKa1活性的FXIIa激活的抑制作用的图。图8A:蛋白质印迹分析,其描绘当添加至离体人血浆时,艾卡拉肽(Ecallantide)和

DX-2930抑制HMWK被pKAL切割。图8B:图,显示DX-88和DX-2930在存在FXIIa的情况下对切割的HMWK的产生的作用。用DX-2930或艾卡拉肽以1370至34.3nM的浓度范围预处理汇集的柠檬酸钠人血浆。通过添加2.5nM FXIIa激活所有的样品(包括未处理的样品)。然后通过添加蛋白酶抑制剂混合物抑制酶。当与未处理的血浆样品比较时,等摩尔浓度的艾卡拉肽和DX-2930相等地减少汇集的人血浆中切割的HMWK的量。C=25nM 1和2链HMWK;N=正常血浆;+=激活的人血浆(无药物)。

[0058] 图9显示患溃疡性结肠炎(UC)和类风湿性关节炎(RA)的患者中接触系统激活的蛋白质印迹分析。泳道1:分子量标记物;泳道2:纯化的1-链和2-链HMWK;泳道3至5:正常人血浆;泳道6至10:来自UC患者的血浆;泳道11至15:来自RA患者的血浆。有关每个泳道中样品的进一步的细节提供在表3中。

[0059] 图10显示患克罗恩病(CD)的患者中接触系统激活的蛋白质印迹分析。泳道1:分子量标记物;泳道2:纯化的1-链和2-链HMWK;泳道3至5:正常人血浆;泳道6至10:来自CD患者的血浆。有关每个泳道中样品的进一步的细节提供在表4中。

[0060] 发明详述

[0061] 定义

[0062] 为了方便,在进一步描述本发明之前,这里定义说明书、实施例和所附的权利要求中采用的某些术语。其他术语在说明书中出现时被定义。

[0063] 单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“所述(the)”包括复数参考物,除非上下文另外明确指出。

[0064] 如本文所使用,“获取(acquire)”或“获取(acquiring)”指通过“直接获取”或“间接获取”物理实体或值获得对物理实体或值例如数值的占有。“直接获取”意思是执行程序(例如,对样品或本文定义的术语“分析样品”进行试验或测试),以获得物理实体或值。“间接获取”指接收来自另一方或来源(例如,直接获取物理实体或值的第三方实验室)的物理实体或值。直接获取物理实体包括执行程序例如分析样品,其包括物理物质例如起始材料的物理变化。示例性变化包括由两种或更多种起始材料制造物理实体、剪切或破碎物质、分离或纯化物质、将两个或更多个分开的实体组合成混合物、进行化学反应——包括断裂或形成共价或非共价键。直接获取值包括执行包括样品或另一物质中的物理变化的程序,例如执行包括物质例如样品、分析物或试剂的物理变化的分析程序(有时本文称为“物理分析”)、执行分析方法,例如包括下述一个或多个步骤的方法:从另一物质分离或纯化物质例如分析物或其片段或其他衍生物;将分析物或其片段或其他衍生物与另一物质例如缓冲液、溶剂或反应物组合;或改变分析物或其片段或其他衍生物的结构,例如通过在分析物的第一和第二原子之间断裂或形成共价或非共价键;或通过改变试剂或其片段或其他衍生物的结构,例如通过在试剂的第一和第二原子之间断裂或形成共价或非共价键。

[0065] 如本文所使用,“分析”样品包括执行程序,其涉及样品或另一物质例如起始材料的物理变化。示例性变化包括由两种或更多种起始材料制造物理实体、剪切或破碎物质、分离或纯化物质、将两个或更多个分开的实体组合成混合物、进行化学反应——包括断裂或形成共价或非共价键。分析样品可包括执行分析程序——包括物质例如样品、分析物或试剂的物理变化(有时本文称为“物理分析”)、执行分析方法,例如其包括下述一个或多个步骤的方法:从另一物质分离或纯化物质例如分析物或其片段或其他衍生物;将分析物或其

片段或其他衍生物与另一物质例如缓冲液、溶剂或反应物组合；或改变分析物或其片段或其他衍生物的结构，例如通过在分析物的第一和第二原子之间断裂或形成共价或非共价键；或通过改变试剂或其片段或其他衍生物的结构，例如通过在试剂的第一和第二原子之间断裂或形成共价或非共价键。

[0066] 如本文所使用，术语“激动剂”意思是指模拟或上调（例如，加强或补充）蛋白质生物活性的试剂。激动剂可以是野生型蛋白质或其具有野生型蛋白质的至少一种生物活性的衍生物。激动剂可也是增加蛋白质的至少一种生物活性的化合物。激动剂可也以增加多肽与另外的分子例如靶肽或核酸的相互作用的化合物。

[0067] 如本文所使用，术语“拮抗剂”意思是指下调（例如，阻抑或抑制）蛋白质的至少一种生物活性的试剂。拮抗剂可以是抑制或降低蛋白质和另外的分子例如靶肽或酶底物之间的相互作用的化合物。拮抗剂可也是降低或抑制存在的表达蛋白质的量的化合物。典型地，抑制蛋白或基因指降低蛋白质或基因的表达或相关活性至少10%或更多例如20%、30%、40%或50%、60%、70%、80%、90%或更多，或降低表达或相关的活性大于1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍或更多，如通过本文所述的或本领域知道的一种或多种方法测量的。

[0068] 如本文所使用，“结合亲和力”指表观缔合常数（apparent association constant）或 K_a 。 K_a 是解离常数（ K_d ）的倒数。结合蛋白对于具体的靶分子可例如具有至少 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 和 $10^{11}M^{-1}$ 的结合亲和力。结合蛋白相对于第二靶标对第一靶标更高的亲和性结合可由比结合第二靶标的 K_a （或数值 K_d ）更高的结合第一靶标的 K_a （或更小数值 K_d ）指示。在这样的情况下，结合蛋白相对于第二靶标（例如，处于第二构象的相同蛋白质或其模拟物；或第二蛋白质）具有对于第一靶标（例如，处于第一构象的蛋白质或其模拟物）的特异性。结合亲和力的差异（例如，对于特异性或其他比较）可以是至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000或 10^5 倍。

[0069] 可通过各种方法包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子共振或光谱学（例如，使用荧光试验）测定结合亲和力。用于评估结合亲和力的示例性条件是在TRIS-缓冲液（50mM TRIS、150mM NaCl、5mM $CaCl_2$ ，pH7.5）中。这些技术可用于测量结合的和游离的结合蛋白的浓度，其作为结合蛋白（或靶标）浓度的函数。结合的结合蛋白（[结合]）的浓度与游离的结合蛋白（[游离]）的浓度和靶标上结合蛋白的结合位点的浓度相关，其中（N）是每个靶分子的结合位点的数量，如下述方程式：

[0070] $[结合] = N \cdot [游离] / ((1/K_a) + [游离])$ 。

[0071] 尽管没有必要总是精确测定 K_a ，因为有时足以获得对例如使用比如ELISA或FACS分析的方法测定的亲和性的定量测量，其与 K_a 成比例，并且因此可用于比较，比如确定更高的亲和性是否是例如高2倍，以获得对亲和性的定性测量或获得对亲和性的推导——例如通过功能试验例如体外或体内试验的活性。

[0072] 术语“结合蛋白”指可与靶分子相互作用的蛋白质。该术语与“配体”互换使用。“血浆激肽释放酶结合蛋白”指可与血浆激肽释放酶相互作用（例如，结合）的蛋白质，并且包括——尤其包括——优选或特异性与血浆激肽释放酶相互作用和/或抑制血浆激肽释放酶的蛋白质。如果蛋白质使得血浆激肽释放酶的活性与在没有该蛋白质并且在相同条件下血浆激肽释放酶的活性相比下降，则蛋白质抑制血浆激肽释放酶。在一些实施方式中，血浆激

肽释放酶结合蛋白是抗体。

[0073] 术语“捕获剂”指特异性结合其配体的部分。

[0074] 如本文所使用,术语“复合物”或“复合物形成”指彼此之间具有特异性亲和性的成员之间的复合物。

[0075] “保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换的替换。本领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸),具有不带电的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有 β -分支的侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳族侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。

[0076] 生物聚合物的基序序列可包括可以是改变的氨基酸的位置。例如,在该背景下,除非另外指出,符号“X”一般指任何氨基酸(例如,二十种天然氨基酸的任意氨基酸),例如指任何非半胱氨酸氨基酸。可也例如,使用括弧和斜线指示其他允许的氨基酸。例如,“(A/W/F/N/Q)”意思是丙氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺在该具体位置是被允许的。

[0077] 如本文所使用,“检测剂”指结合待检测部分的部分。通常其产生信号例如荧光或产生可测量的化合物。

[0078] “表位(表位)”指靶化合物上被结合蛋白(例如,抗体比如Fab或全长抗体)结合的位点。在靶化合物是蛋白质的情况下,位点可完全由氨基酸组分组成、完全由蛋白质的氨基酸的化学修饰(例如,糖基部分)组成或由其组合组成。重叠表位包括至少一种常见的氨基酸残基、糖基基团、磷酸盐基团,硫酸盐基团或其他分子特征。

[0079] 表位,如果第一结合蛋白结合靶化合物上第二结合蛋白结合的相同位点或结合与第二结合蛋白结合的位点重叠(例如,50%、60%、70%、80%、90%、或100%重叠,例如就氨基酸序列或其他分子特征(例如,糖基基团,磷酸盐基团或硫酸盐基团)而言)的位点,则第一结合蛋白(例如,抗体)与第二结合蛋白(例如,抗体)一样“结合相同的表位”。

[0080] 如果第一结合蛋白与其表位的结合降低(例如,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多)结合其表位的第二结合蛋白的量,那么第一结合蛋白(例如,抗体)与第二结合蛋白(例如,抗体)“竞争结合”。竞争可以是直接的(例如,第一结合蛋白结合与第二结合蛋白结合的表位相同的或重叠的表位)或间接的(例如,第一结合蛋白与其表位的结合造成靶化合物的空间改变,其降低了第二结合蛋白结合其表位的能力)。

[0081] 如本文所使用,“功能性”生物分子是处于其展示表征其的性质和/或活性的形式的生物分子。

[0082] 如下进行计算两条序列之间的“同源性”或“序列同一性”(该术语在本文可交换使用)。为了最佳比较目的比对序列(例如,空隙可引入第一和第二氨基酸或核酸序列之一或二者中,以进行最佳比对,并且为了比较目的可忽略非同源序列)。使用GCG软件包中的GAP程序用Blossum 62评分矩阵将最佳比对确定为最佳分数,其中空隙罚分为12、空隙延伸罚分为4,和移框空隙罚分为5。然后比较在相应的氨基酸位置或核苷酸位置的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的相应位置的氨基酸残基或核苷酸相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则分子在该位置是一致的(如本文所使用,氨基酸或核酸“同

一性”与氨基酸或核酸“同源性”等同)。两条序列之间的同一性百分数是由序列共享的一致位置数目的函数。

[0083] 在优选的实施方式中,为了比较目的而对齐的参考序列的长度是参考序列长度的至少30%,优选地至少40%,更优选地至少50%,甚至更优选地至少60%,和甚至更优选地至少70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%或100%。例如,参考序列可以是免疫球蛋白可变结构域序列的长度。

[0084] 如本文所使用,术语“在低严格性、中严格性、高严格性或非常高严格性条件下杂交”描述杂交和洗涤的条件。进行杂交反应的指导可见于Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6中。水性和非水性方法描述在该参考文献中,并且都可被使用。本文提及的具体的杂交条件如下:(1)在6X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中约45°C下的低严格性杂交条件,随后在0.2X SSC、0.1% SDS至少50°C洗涤两次(对于低严格性条件,洗涤的温度可增加至55°C);(2)在6X SSC中约45°C下的中严格性杂交条件,随后在0.2X SSC、0.1% SDS中在60°C洗涤一次或多次;(3)6X SSC中约45°C下的高严格性杂交条件,随后在0.2X SSC、0.1% SDS中65°C洗涤一次或多次;和(4)非常高的严格性杂交条件是0.5M磷酸钠、7% SDS在65°C下,随后在0.2X SSC、1% SDS中,65°C洗涤一次或多次。非常高的严格性条件(4)是优选的条件并且是应使用的条件,除非另外指出。本公开包括以低、中、高或非常高的严格性与本文所述的核酸或与其补体例如编码本文所述的结合蛋白的核酸杂交的核酸。核酸长度可以与参考核酸长度相同或在参考核酸长度的30、20或10%之内。核酸可对应编码本文所述的免疫球蛋白可变区序列的区域。

[0085] “分离的组合物”指从天然样品的至少一种组分的至少90%中去除的组合物,从所述天然样品中可获得分离的组合物。如果感兴趣的种类或种类群体以重量-重量计是至少5、10、25、50、75、80、90、92、95、98或99%纯的,则人工或天然产生的组合物可以是“具有至少一定程度的纯度的组合物”。

[0086] 如本文所使用,术语“体外”指在人工环境中例如在试管或反应容器中、细胞培养中等发生的事件,而不是在多细胞生物体内发生的事件。

[0087] 如本文所使用,术语“体内”指在多细胞生物体比如人或非人动物中发生的事件。

[0088] “分离的组合物”指从可获得分离组合物的天然样品的至少一种组分的至少90%中去除的组合物。如果感兴趣的种类或种类群体以重量-重量计是至少5、10、25、50、75、80、90、92、95、98或99%纯的,则人工或天然产生的组合物可以是“具有至少一定程度的纯度的组合物”。

[0089] “分离的”蛋白质指从可获得分离蛋白质的天然样品的至少一种组分的至少90%中去除的蛋白质。如果感兴趣的种类或种类群体以重量-重量计是至少5、10、25、50、75、80、90、92、95、98或99%纯的,则蛋白质可以具有“至少”一定程度的纯度。

[0090] 术语“激肽释放酶”(例如,血浆激肽释放酶)指肽酶(切割蛋白质中肽键的酶),其是丝氨酸蛋白酶家族的亚类。血浆激肽释放酶切割激肽原产生激肽,其是一种有效的促炎性肽。

[0091] 术语“激肽释放酶抑制剂”指抑制激肽释放酶的任何试剂或分子。例如,DX-88(本文也称为“PEP-1”)是血浆激肽释放酶的有效(Ki<1nM)和特异性抑制剂(NP_000883)。(也见例如WO 95/21601或WO 2003/103475)。

[0092] 如本文所使用术语“DX-2922”与术语“X101-A01”可交换使用。下面描述该抗体的其他变体。

	抗体鉴定	描述
	X63-G06	使用 ROLIC 发现的非种系化的 Fab, 与 M160-G12 相同的 HC 但是不同的 LC
[0093]	X81-B01	HEK 293T 细胞中产生的种系化的 IgG
	X101-A01	CHO 细胞中产生的种系化的 IgG, 与 X81-B01 相同的 HC 和 LC 序列
	DX-2922	X101-A01 的可选命名

[0094] 如本文所使用术语“DX-2930”与术语“X124-G01”可互换使用。下面描述该抗体的其他变体。

	抗体鉴定	描述
[0095]	M162-A04	使用噬菌体展示发现的非种系化的 Fab
	M199-A08	源自 M162-A04 亲和力成熟的重链 CDR3 变化的 Fab
[0096]	X115-F02	293T 细胞中产生的种系化的 Fab, 与 X124-G01 相同的可变重链
	X124-G01 或 DX-2930	CHO 细胞中产生的种系化的 IgG, LC 和 HC 序列如 X115-F02, 不同之处是 HC 的 C-末端 Lys 在 X124-G01 (也称为 DX-2930)中被去除。

[0097] 术语“调谐剂”指可能导致调整的多肽、核酸、大分子、复合物、分子、小分子、化合物、种类等(天然存在的或非天然存在的),或由生物材料比如细菌、植物、真菌或动物细胞或组织制备的提取物。可通过包括在试验中评估调谐剂作为具有功能性质、生物活性或过程或它们组合的抑制剂或活化剂(直接或间接)的潜在活性(例如,激动剂、部分拮抗剂、部分激动剂、反向激动剂、拮抗剂、抗微生物剂、微生物感染或增殖的抑制剂等)。在这样的实验中,可一次筛选许多调谐剂。调谐剂的活性可以是已知的、未知的或部分已知的。

[0098] “非必需”氨基酸残基是可以与结合剂例如抗体的野生型序列不同但是不消除或更优选基本上不改变生物活性的残基,而改变“必需”氨基酸残基使得活性大大丧失。

[0099] 待通过本发明方法治疗的“患者”、“受试者”或“宿主”(这些术语可交换使用)可指人或非人动物。在一些实施方式中,受试者被怀疑具有激肽释放酶介导的病症或有激肽释放酶介导的病症的风险或遭受激肽释放酶介导的病症,例如缓激肽介导的病症,例如遗传性血管性水肿(HAE)。在一些实施方式中,受试者有下述病症的风险或遭受下述病症:非组胺-依赖性特发性血管性水肿、类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、狼疮、阿尔茨海默氏疾病、败血症性休克、烧伤、脑缺血性/再灌注损伤、脑水肿、糖尿病性视网膜病、糖尿病性肾病、黄斑性水肿、血管炎、动脉或静脉血栓形成、与心室辅助设备或支架相关的血栓形成、具有血栓形成的肝素-诱导的血小板减少、血栓栓塞病,和伴随不稳定的心绞痛的冠心病、水肿、眼病、痛风、肠疾病、口腔粘膜病、神经病痛、炎性疼痛、椎管狭窄退行性脊柱病、术后肠梗阻、大动脉动脉瘤、骨性关节炎、遗传性血管性水肿、肺栓塞、中风、头部创伤或瘤

周脑水肿、脓毒、急性脑中动脉 (MCA) 缺血性事件 (中风)、再狭窄 (例如, 血管成形术之后)、系统性红斑狼疮肾炎、自身免疫疾病、炎症疾病、心血管疾病、神经疾病、与蛋白质错折叠相关的疾病、与血管生成相关的疾病、高血压肾病变和糖尿病性肾病变、变应性疾病和呼吸疾病 (例如过敏症、哮喘、慢性阻塞性肺部疾病、急性呼吸窘迫综合症、囊性纤维化、持续性鼻炎) 和组织损伤 (例如烧伤或化学损伤)。

[0100] 术语“前激肽释放酶”和“前血浆激肽释放酶 (preplasma kallikrein)”在本文中可互换使用并且指酶原形式的活性血浆激肽释放酶, 其也称为前激肽释放酶。

[0101] 术语“预防 (preventing)”或“待预防”受试者中的疾病指使受试者进行药学治疗例如施用药物, 使得疾病的至少一种症状被预防, 即, 在有害的病况 (例如, 宿主动物的疾病或其他有害状态) 的临床表现之前施用, 从而其保护宿主抵抗有害病况的发展。“预防”疾病也可称为“预防 (prophylaxis)”或“预防性治疗”。

[0102] 如本文所使用, 本文使用术语“基本上一致的” (或“基本上同源的”) 来指这样的第一氨基酸或核酸序列, 其包含足够数量的与第二氨基酸或核酸序列一致或等同的 (例如, 具有类似的侧链例如保守的氨基酸替换) 氨基酸残基或核苷酸, 使得第一和第二氨基酸或核酸序列具有 (或编码具有类似活性的蛋白质) 类似的活性, 例如结合活性, 结合偏好或生物活性。在抗体的情况下, 相对于相同抗原, 第二抗体具有相同的特异性并且具有至少 50%、至少 25% 或至少 10% 的亲合性。

[0103] 与本文公开的序列类似或同源的 (例如, 至少约 85% 序列同一性) 序列也是本申请的一部分。在一些实施方式中, 序列同一性可以是约 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高。

[0104] 另外, 当核酸区段在选择性杂交条件 (例如, 高度严格杂交条件) 下与链的补体杂交时, 存在本质上的同一性。核酸可存在于整个细胞中、细胞溶解产物中或部分纯化或基本上纯的形式中。

[0105] 生物聚合物的基序序列可包括这样的位置, 其可以是变化的氨基酸。例如, 在该背景下, 除非另外指出, 符号“X”一般指任何氨基酸 (例如, 二十种天然氨基酸中的任意氨基酸), 例如指任何非半胱氨酸氨基酸。可也例如, 使用括弧和斜线指示其他允许的氨基酸。例如,“(A/W/F/N/Q)”意思是丙氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺在该具体位置是被允许的。

[0106] 可通过任何现有技术已知的方法测定统计显著性。示例性统计检验包括: 学生 T 检验、Mann Whitney U 非参数检验和 Wilcoxon 非参数统计检验。一些统计学上显著的关系的 P 值小于 0.05 或 0.02。术语例如“诱导”、“抑制”、“加强”、“升高”、“增加”、“降低”等——指示两个状态之间可区分的定性或定量的区别——可指两个状态之间的差异例如统计学上显著的差异。

[0107] 如本文所使用, “样品”指包括来自受试者的组织例如血液、血浆或蛋白质的组合物。样品包括从受试者采取的初始未处理的样品以及随后处理的例如部分纯化或保藏形式。示例性样品包括血液、血浆、眼泪或粘液。在一些实施方式中, 样品是血液或血浆样品。

[0108] 相对于未处理的受试者, “治疗有效的剂量”以统计学上显著的程度或至少约 20%, 更优选至少约 40%, 甚至更优选至少约 60%, 和仍更优选至少约 80% 优选地调节可测量的参数例如血浆激肽释放酶活性。可在预测人病症和病况效力的动物模型系统中评估化

合物调节可测量参数例如疾病相关的参数的能力。可选地,可通过检查化合物体外调节参数的能力评估组合物的该性质。

[0109] “治疗”受试者中的疾病(或病况)或“治疗”具有疾病的受试者指使受试者进行药理学治疗例如施用药物,使得治愈、缓解或减轻疾病的至少一种症状。

[0110] 术语“预防”受试者中的疾病指使受试者进行药理学治疗例如施用药物,使得疾病的至少一种症状被预防,即,在有害的病况(例如,宿主动物的疾病或其他有害的状态)的临床表现之前施用,从而其保护宿主抵抗发展有害病况。“预防”疾病也可称为“预防”或“预防性治疗”。

[0111] “预防性有效量”指以剂量和在必要的时间周期内实现期望的预防性结果的有效量。典型地,因为预防性剂量在疾病之前或早期阶段用于受试者,所以预防性有效量将小于治疗有效量。

[0112] 标题,包括字母或数字标题仅仅为了易于理解和阅读,并且在没有相反指示的表达下,不强调优选的时间顺序或等级。

[0113] 检测切割的和完整的HMWK

[0114] 血浆激肽释放酶作为无活性酶原循环,所述无活性酶原被称为前激肽释放酶,其大部分与其底物——高分子量激肽原(HMWK)——结合。响应刺激,FXII被活化成FXIIa。FXIIa切割前激肽释放酶形成活性血浆激肽释放酶(图1)。约75-90%的循环前激肽释放酶通过与HMWK的结构域6的非活性位点相互作用而结合HMWK。游离的和结合HMWK的活性pKa1产生切割的HMWK和缓激肽。血浆激肽释放酶激活的生物标记物显示在表2中。生物标记物的适合性可通过追踪其在存在或没有HAE急性发作情况下的水平来表明。这些生物标记物的水平可也在缓激肽介导的水肿或pKa1活性介导的其他疾病发作期间改变。见表2。

[0115] 表2. 与KMA相关的生物标记物

[0116] 表2提供了标记物,以评估受试者pKa1或缓激肽介导的病症,所述标记物可通过表2和本文其他地方描述的方法来评估。表2指示与pKa1或缓激肽介导的病症相关的标记物水平的改变方向。

[0117]

生物标记物	试验	HAE 患者中相对于正常的基础水平	Δ由于接触激活	评论
完整的HMWK	ELISA、蛋白质印迹	未改变	降低	测试可用于测量完整的激肽原,其使用 APTT 用激肽原缺陷血浆或免疫试验:

				www.diapharma.com/download/s/68201025811.pdf
[0118]	切割 HMWK ELISA、蛋白质印迹	增加	增加	在 HAE 发作期间，切割的激肽原可增加至~47%的总激肽原。在脓毒症、肝硬化期间切割的激肽原也升高。 试验可使用 a) 与完整的激肽原不同，对切割的激肽原特异的抗体；或 b)能够分离和量化切割的和完整的激肽原的试验形式(例如蛋白质印迹)。该试验对循环抗 pKal 抗体不灵敏并且不取决于细胞表面结合的活性 pKal 是否是局部化缓激肽介导的血管性水肿中的主要元凶。

[0119] 本公开至少部分基于这样的发现：即，患者样品中特定形式的NMWK的值(例如，切割的HMWK的百分数)与某些pKal介导的疾病(例如，HAE)和自身免疫性疾病(例如，RA、UC和克罗恩病)相关联。因此，切割的HMWK的值、完整的HMWK值(例如，百分数)或二者，可用作生物标记，用于鉴定具有这样的疾病或具有这样的疾病风险的受试者、用于鉴定可能易于用pKal抑制剂治疗的病症和用于评估涉及一种或多种pKal抑制剂的疾病治疗的效力。

[0120] 检测剂

[0121] 在一些实施方式中，相比一种形式的HMWK，特异性(优选)结合另一形式的HMWK的检测剂(例如，抗体)可用于本文所述的试验方法，用于测定样品中切割的HMWK的水平，所述样品可以是来自候选患者的生物样品(例如，血液样品或血浆样品)。在一个例子中，检测剂是相比完整的HMWK，特异性结合切割的HMWK的抗体。在另一例子中，检测剂是相比切割的形式特异性结合完整的HMWK的抗体。可选地或另外，抗体特异性结合切割的HMWK的轻链的C-末端。这样的抗体可用于区分HMWK与LMWK，因为由于可选的剪接，LMWK不包含切割的HMWK的轻链的C-末端片段。

[0122] “特异性结合”抗原或表位的检测剂是本领域熟知的术语，并且测定这样的特异性结合的方法也是本领域熟知的。如果检测剂与具体的靶抗原比与可选的靶标更经常、更快速、更持久和/或以更大的亲和力反应或结合，则认为检测剂比如抗体展示“特异性结合”。如果相比于其结合其他物质(例如，完整的HMWK)，检测剂以更大的亲和性力、抗体亲抗原性、更容易和/或以更长的持久性结合，则检测剂“特异性结合”靶抗原(例如，切割的HMWK)或其表位。例如，特异性(或优选)结合抗原(例如，切割的HMWK或切割的HMWK的轻链的C-末端)或其中的抗原表位的抗体是这样的抗体：相比于其结合其他抗原(例如，完整的HMWK)或相同抗原的其他表位，其以更大的亲和力、抗体亲抗原性、更容易和/或以更长的持久性结合该靶抗原。通过阅读该定义也理解例如特异性结合第一靶抗原的抗体可以或不特异性或优选结合第二靶抗原。这样，“特异性结合”或“优先结合”不一定要求(尽管其可包括)

排他性结合。一般而言,但是不是必要的,提及结合意思是优先结合。在一些例子中,“特异性结合”靶抗原或其表位的抗体可能不结合其他抗原或相同抗原中的其他表位。

[0123] 在一些实施方式中,用于本文所述的试验方法的抗体对于靶抗原或抗原表位(例如,切割的激肽原、完整的HMWK或切割的激肽原的轻链的C-末端)具有适当的结合亲和力。如本文所使用,“结合亲和力”指表观缔合常数或 K_A 。 K_A 是解离常数(K_D)的倒数。本文所述的抗体可具有至少 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M或更低的结合亲和力(K_D)。增加的结合亲和力对应降低的 K_D 。抗体相对于第二抗原对第一抗原更高的亲和性结合可由比对于结合第二抗原 K_A (或数值 K_D)更高的结合第一抗原的 K_A (或更小数值 K_D)指示。在这样的情况下,抗体相对于第二抗原,具有对于第一抗原的特异性。结合亲和力的差异(例如,对于特异性或其他比较)可以是至少1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、10,000或 10^5 倍。

[0124] 如本文所使用,术语“抗体”指包括至少一种免疫球蛋白可变结构域或免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质。例如,抗体可包括重(H)链可变区(本文简称为VH),和轻(L)链可变区(本文简称为VL)。在另一例子中,抗体包括两个重(H)链可变区和两个轻(L)链可变区。术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段(结合抗原的片段)(例如,单链抗体、Fab和sFab片段、 $F(ab')_2$ 、Fd片段、Fv片段、scFv和结构域抗体(dAb)片段(de Wildt等, Eur J Immunol. 1996; 26(3): 629-39.))以及完整的抗体。抗体可具有IgA、IgG、IgE、IgD、IgM(以及其亚型)的结构特征。抗体可来自任何来源,但是灵长类(人和非人灵长类)和灵长类源化(primatized)是优选的。

[0125] VH和VL区域可进一步划分成高变性的区域,称为“互补决定区”(“CDR”),其散布有更加保守的区域,称为“框架区”(“FR”)。已经精确定义了框架区和CDR的范围(见, Kabat, E.A.,等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美国卫生和人类服务部(U.S. Department of Health and Human Services), NIH出版号91-3242, 和 Chothia, C.等(1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917, 也见www.hgmp.mrc.ac.uk)。本文使用Kabat定义。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR组成,其从氨基端至羧基端以下述顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0126] 抗体的VH或VL链可进一步包括所有或部分重链或轻链恒定区,从而分别形成免疫球蛋白重链和轻链。在一种实施方式中,抗体是具有两条免疫球蛋白重链和两条免疫球蛋白轻链的四聚体,其中免疫球蛋白重链和轻链通过例如二硫键相互连接。在IgG中,重链恒定区包括三个免疫球蛋白结构域CH1、CH2和CH3。轻链恒定区包括CL结构域。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。免疫球蛋白的轻链可以是 κ 或 λ 类型的。在一种实施方式中,抗体被糖基化。抗体对于抗体-依赖性细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性可以是有功能的。

[0127] 抗体的一个或多个区域可以是人的或实际上是人的。例如,一个或多个可变区可以是人的或实际上是人的。例如,一个或多个CDR可以是人的,例如HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。每个轻链CDR均可以是人的。HC CDR3可以是人的。一个或多个框架区可以是人的,例如HC或LC的FR1、FR2、FR3和FR4。例如,Fc区域可以是人的。在一种实施方式中,所有的框架区是人的,例如具有人体细胞例如产生免疫球蛋白的造血细

胞或非造血细胞产生的抗体的框架的序列。在一种实施方式中,人序列是生殖系序列,例如由生殖系核酸编码的生殖系序列。在一种实施方式中,选择的Fab的框架(FR)残基可转化成最类似灵长类生殖系基因,尤其是人生殖系基因中的相应残基的氨基酸类型。恒定区中的一个或多个可以是人的或实际上是人的。例如,至少70、75、80、85、90、92、95、98或100%的免疫球蛋白可变区、恒定区、恒定结构域(CH1、CH2、CH3、CL1)或整个抗体可以是人的或实际上是人的。

[0128] 所有或部分抗体可由免疫球蛋白基因或其区段编码。示例性人免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α (IgA1和IgA2)、 γ (IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及许多免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白“轻链”(约25KDa或约214个氨基酸)由在NH₂-末端(约110个氨基酸)的可变区基因和在COOH-末端的 κ 或 λ 恒定区基因编码。全长免疫球蛋白“重链”(约50KDa或约446个氨基酸)类似地由可变区基因(约116个氨基酸)和其他上述恒定区基因之一例如 γ (编码约330个氨基酸)编码。人HC的长度变化很大,因为HC CDR3从约3个氨基酸残基变化至超过35个氨基酸残基。

[0129] 术语全长抗体的“抗原结合片段”指保持特异性结合感兴趣靶标的能力的全长抗体的一个或多个片段。术语全长抗体的“抗原结合片段”包括的结合片段的例子包括(i) Fab片段,其是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,其是包括通过在铰链区的二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等,(1989) Nature 341: 544-546),其由VH结构域组成;和(vi) 保持功能的分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但是它们可使用重组方法通过合成连接体连接,所述连接体使它们能够形成为单个蛋白质链,其中VL和VH区域配对以形成称为单链Fv(scFv)的单价分子。见例如,美国专利5,260,203、4,946,778和4,881,175;Bird等(1988) Science 242:423-426;和Huston等(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。

[0130] 可使用任何适当的技术获得抗体片段,所述技术包括本领域技术人员已知的常规技术。术语“单特异性抗体”指对于具体的靶标例如表位显示单一结合特异性和亲和性的抗体。该术语包括“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”,其如本文所使用指单一分子组合物的抗体或其片段的制剂,而不考虑抗体如何产生。

[0131] 如本文所使用,“人源化的”免疫球蛋白可变区指这样的免疫球蛋白可变区:其被修饰以包括足够数量的人框架氨基酸位置,使得免疫球蛋白可变区不在正常人中引起免疫原性应答。“人源化的”免疫球蛋白的描述包括例如U.S. 6,407,213和U.S. 5,693,762。

[0132] 抑制常数(K_i)提供对抑制剂效力的测量;其是使酶活性减半所需要的抑制剂的浓度并且不取决于酶或底物浓度。以不同的底物浓度通过测量不同浓度的抑制剂(例如,抑制结合蛋白)对反应程度的抑制作用(例如,酶活性)获得表观K_i(K_{i,app});将作为抑制剂浓度的函数的准一级速率常数的变化拟合至Morrison方程式(方程式1),产生对表观K_i值的评估。从K_{i,app}对底物浓度的图的线性回归分析提取的y-截距获得K_i。

$$[0133] \quad v = v_o - v_o \left(\frac{(K_{i,app} + I + E) - \sqrt{(K_{i,app} + I + E)^2 - 4 \cdot I \cdot E}}{2 \cdot E} \right)$$

[0134] 方程式1

[0135] 其中 v =测量速率; v_0 =没有抑制剂的情况下的速率; $K_{i,app}$ =表观抑制常数; I =总抑制剂浓度;和 E =总酶浓度。

[0136] 在一些实施方式中,如本文所描述的检测剂可结合可检测的标签,并且可基于从可检测的标签释放的信号强度测定检测剂与感兴趣抗原(例如,切割的HMWK和完整的HMWK)的结合。可选地,可使用对检测剂特异性的二次抗体。一个或多个抗体可结合可检测的标签。本领域已知的任何适当的标签可用于本文所述的试验方法。在一些实施方式中,可检测的标签包括荧光团。如本文所使用,术语“荧光团”(也称为“荧光标签”或“荧光染料”)指以限定激发波长吸收光能并且以不同的波长发射光能的部分。在一些实施方式中,检测部分是酶或包括酶。在一些实施方式中,酶是从无色底物产生有颜色的产物的酶(例如, β -牛乳糖苷酶)。

[0137] 高分子量激肽原

[0138] 高分子量激肽原(HMWK)作为单一多肽(1-链)多结构域(结构域1-6)蛋白质存在于血浆中,分子量为约110kDa(图4)。通过结构域4中的pKa1切割HMWK,释放9氨基酸促炎性肽缓激肽和2-链形式的HMWK(切割的激肽原)。HMWK的2个链是包含HMWK的结构域1-3的重链和包含HMWK的结构域5和6的轻链。重链和轻链的分子量分别为约56和46千道尔顿。图4。

[0139] 完整的HMWK

[0140] 完整的高分子量激肽原(HMWK),本文也称为“完整的激肽原”,其可例如使用促凝剂或免疫方法例如放射免疫分析来分析(见例如Kerbirou-Nabias,D.M.,Br J Haematol, 1984, 56(2):2734-86)。人HMWK的轻链的单克隆抗体是已知的。见例如Reddigari,S.R.& Kaplan,A.P.,Blood,1999,74:695-702。也可使用依赖于发色底物的HMWK的试验。见例如Scott,C.F.等Thromb Res,1987,48(6):685-700;Gallimore,M.J.等Thromb Res,2004,114(2):91-96。

[0141] 编码HMWK的人基因是激肽原1(KNG1)。KNG1被转录并且可选地剪接形成编码HMWK或低分子量激肽原(LMWK)的mRNA。下面提供HMWK的示例性蛋白质序列:

[0142] >gi|156231037|ref|NP_001095886.1|激肽原-1同种型1前体[智人]

[0143] MKLITILFLCSRLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVIDAALKKYNSQNSNNQFVLYRITEATKTVGS
DTFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLG
CVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRTYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKS
LWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLHTITKLNAENAT
FYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVVVPWEKKIYPTVNCQP
LGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEETTVSPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHE
RDQGHGHRGHGLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDLEHQGGHVLDHGKHKHGHGKHKNGKNGKHNGWKTEHL
ASSSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLIATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSF
NPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQMKESYYFDLTDGLS (SEQ IDNO:1)

[0144] 切割的HMWK

[0145] 可例如,使用实施例1和3至7描述的方法例如蛋白质印迹评估切割的高分子量激肽原(HMWK),本文也称为“切割的激肽原”。在一些实施方式中,可评估切割的HMWK的轻链。可使用结合切割的HMWK的抗体,比如结合切割的HMWK的轻链(例如,包括C-末端残基的表

位)的抗体。一个例子是小鼠mAb克隆11H05。另外,可使用质谱评估切割的HMWK。评估切割的HMWK水平的免疫印迹技术是本领域已知的。见例如Buhler R.等Blood Coagul Fibrinolysis,1995,6(3):223-232。

[0146] 切割的激肽原的重链和轻链的示例性序列提供在下面。

[0147] >切割的激肽原-1重链

[0148] QESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNSQNSQNSNNQFVLYRITEATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDPCPVQ
SGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRH
GIQYFNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVAGLNFRITYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQ
LRIASFSQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTNSPELEETLHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAG
KKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMK (SEQ ID NO:
2)

[0149] >切割的激肽原-1轻链

[0150] SSRIGEIKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHWDWGHEKQRKHNLGHGKHERDQGHGHR
GHGLGHGHEQQHGLGHGKFKLDDLEHQQGHVLDHGHKHKHGHGKHKNGKKNKGKNGKHNWKTEHLASSEDSTT
PSAQTQEKTGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLIATMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDT
TSPKCPGRPWSVSEINPTTQMKESYYFDLTDGLS (SEQ ID NO:3)

[0151] 试验形式 (Assay Format)

[0152] 可使用本文所述的试验和/或本领域已知的试验评估本文公开的生物标记物的值(例如,绝对量或水平或相对量或水平,比如百分数)或本文公开的生物标记物的值的改变。在一些实施方式中,在本文所述的任何方法中使用来自受试者的样品中切割的激肽原的百分数。

[0153] 可用于评估生物标记物的水平的试验包括例如免疫试验例如蛋白质印迹、酶联免疫吸附试验(ELISA)(例如,夹心ELISA)、放射免疫分析、基于电化学发光的检测试验和相关的技术。可也使用基于质谱的方法。可也采用依赖于发色底物的试验。试验例如蛋白质印迹试验,可进一步涉及使用定量成像系统例如LICOR成像技术,其是商业上可得的(见例如来自LI-COR Biosciences的Odyssey® CLx红外成像系统)。在一些实施方式中,使用电化学发光检测试验或依赖电化学发光和图案阵列技术(patterned array technology)的组合的试验(例如,来自Meso Scale Discovery (MSD)的ECL或MULTI-ARRAY技术试验ARRAY technology assay from)。

[0154] 如本文所使用,术语“测量(measuring)”或“测量(measurement)”或可选地“检测(detected)”或“检测(detection)”意思是评估样品中物质的存在、缺少、质量或数量(其可以是有效量),包括这样的物质的定性或定量的浓度水平的推导,或以其他方式评估受试者的值或分类。

[0155] 在一些实施方式中,提供的试验可在高通量平台上进行。在一些实施方式中,多孔板例如24-,48-,96-,384-或更多孔的板可用于高通量试验。个体试验可在每个孔中平行进行。所以,一般期望使用板阅读器,以平行测量多孔,以增加试验通量。在一些实施方式中,能够平行对多孔(例如,4、16、24、48、96、384或更多孔)成像的板阅读器可用于该平台。例如,可使用商业上可获得的板阅读器(例如,可获得自Perkin Elmer,Waltham,MA的板::视觉系统(plate::vision system))。该板阅读器能够进行基于动力学的荧光分析。板::视觉

系统具有高的收集效率光学性质并且具有针对平行分析96孔的专用光学设计。另外适当的平行板阅读器包括但不限于SAFIRE (Tecan, San Jose, CA)、FLIPRTETRA® (Molecular Devices (分子设备), Union City, CA)、FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) 和CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA)。

[0156] 在一些实施方式中,本发明的高通量筛选试验是自动化的(例如,适于自动试验)。

[0157] 试剂盒

[0158] 本公开也提供了用于评估样品中切割的和/或完整的激肽原的试剂盒,所述样品包含例如来自人患者的这样的生物样品。这样的试剂盒可包括相比另一形式,特异性结合切割的激肽原或完整的激肽原的检测剂,和任选地,切割的激肽原和/或完整的激肽原作为对照。在一些实施方式中,试剂盒进一步包括用于检测检测剂与切割的和/或完整的激肽原结合的二次抗体和/或试剂。

[0159] 在一些实施方式中,试剂盒可包括根据本文所述的任何方法进行使用的说明书。包括的说明书可包括对如何使用试剂盒中包含的组分测量样品中切割的和/或完整的激肽原水平的描述,所述样品可以是收集自人患者的生物样品。

[0160] 与试剂盒使用相关的说明书一般包括关于每种组分的量和用于进行本文所述的试验方法适当的条件的信息。试剂盒中的组分可为单位剂量,散装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。本发明的试剂盒中提供的说明书通常是标签或包装插入物(例如,试剂盒中包括的纸片)上的书面说明书,但是也可接受机器可读的说明书(例如,在磁盘或光盘上携带的说明书)。

[0161] 标签或包装插入物指示试剂盒用于评估切割的和/或完整的激肽原的水平。可提供说明书用于实施本文所述的任何方法。

[0162] 本发明的试剂盒在适当的包装中。适当的包装包括但不限于管形瓶、瓶子、广口瓶、柔性包装(例如,密封聚酯薄膜(Mylar)或塑料包)等。也考虑与具体的设备一起使用的包装,比如吸入器、鼻施用设备(例如,雾化器)或注入设备比如微型泵。试剂盒可具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液包或管形瓶,其具有皮下注射针可刺破的塞子)。容器也可具有无菌入口(例如容器可以是静脉内溶液包或管形瓶,其具有皮下注射针可刺破的塞子)。

[0163] 试剂盒可任选地提供另外的组分比如缓冲液和解释信息。通常,试剂盒包括容器和在容器上或与其结合的标签或包装插入物(一个或多个)。在一些实施方式中,本公开提供了制造包括上述试剂盒内容物的制品。

[0164] 试验方法在疾病诊断和预后中的应用

[0165] 本文所述的试验方法和试剂盒可用于评估疾病,例如进行疾病的诊断或预后。评估可包括鉴定受试者具有本文所描述疾病的风险或具有本文所描述疾病,例如pKa1介导的病症,比如HAE,和自身免疫疾病比如RA、UC和克罗恩病。评估也可包括监测疾病的治疗,比如评估治疗pKa1介导的病症比如HAE的效力。此外,评估可包括鉴定可通过pKa1抑制剂治疗的疾病。

[0166] A. 诊断

[0167] 在一些实施方式中,进行试验方法和试剂盒,以测定收集自候选受试者(例如,怀疑具有pKa1介导的病症比如HAE或自身免疫疾病比如RA、UC和克罗恩病的人患者)的生物样

品(例如,血液样品或血浆样品)中的切割的激肽原和/或完整的激肽原的水平。切割的激肽原的水平可然后与样品中完整的激肽原或激肽原的总量比较,以测定样品中切割的激肽原的值(例如,百分数)、完整的激肽原的值或二者。切割的激肽原和/或完整的激肽原的值可与参考值比较,以确定受试者是否具有pKa1介导的病症例如HAE或自身免疫疾病,比如RA、UC和克罗恩病或处在上述疾病的风险中。例如,如果切割的激肽原的百分数为或高于参考数,则受试者可被鉴定为具有pKa1介导的病症比如HAE、RA、UC和克罗恩病或处于上述疾病的风险中。可选地,如果完整的激肽原的百分数为或小于参考数,则受试者可被鉴定为具有pKa1介导的病症比如HAE、RA、UC和克罗恩病或处在上述疾病的风险中。

[0168] 参考值可以是对照水平的切割的激肽原百分数。在一些实施方式中,对照水平是对照样品,比如获得自优选地与候选受试者属于相同物种的健康受试者或健康受试者群体的样品(例如,血液或血浆样品),中切割的激肽原的百分数。如本文所使用,健康的受试者是在测量切割的和/或完整的激肽原的水平时显然没有目标疾病(例如,pKa1介导的病症比如HAE或自身免疫性疾病比如RA、US和克罗恩病)或没有所述疾病的病史的受试者。

[0169] 对照水平可也是预定的水平。这样预定的水平可表示没有目标疾病或没有目标疾病风险的受试者群体中切割的激肽原的百分数。其可也表示具有目标疾病的受试者群体中切割的激肽原的百分数。

[0170] 预定的水平可为各种形式。例如,其可以是单个临界(cut-off)值,比如中值或平均值。在一些实施方式中,可基于比较组确定这样的预定水平,比如其中一个定义的组已知具有目标疾病和另一定义的组已知没有该目标疾病。可选地,预定的水平可以是一个范围例如表示在预定的百分数以内对照群体中切割的激肽原的百分数的范围。

[0171] 可通过常规技术测定如本文所描述的对照水平。在一些例子中,可通过对如本文所述的对照样品进行常规方法(例如,为获得如本文所描述的测试样品中切割的和/或完整的激肽原水平的相同试验)获得对照水平。在其他实施例中,切割的和/或完整的激肽原的水平可获得自对照群体的成员并且可通过例如计算程序分析结果,以获得代表对照群体中切割的和/或完整的激肽原的水平的对照水平(预定的水平)。

[0172] 通过比较获得自候选受试者的样品中切割的激肽原的百分数与如本文所描述的参考值,可确定候选受试者是否具有pKa1介导的疾病(例如,HAE或自身免疫疾病比如RA、UC和克罗恩病)或处在上述疾病的风险中。例如,如果候选受试者的样品中切割的激肽原的百分数偏离参考值(例如,与参考值相比增加),那么候选受试者可能被鉴定为具有疾病或处在所述疾病的风险中。当参考值表示具有目标疾病的受试者群体中切割的激肽原的百分数范围时,那么落在该范围内的候选者样品中切割的激肽原的百分数指示候该选受试者具有目标疾病或处在目标疾病的风险中。

[0173] 如本文所使用,“升高水平或高于参考值的水平”意思是切割的激肽原的水平/百分数高于参考值,比如对照样品中切割的激肽原的水平/百分数的预定阈值。本文详细描述了对照水平。切割的激肽原升高的百分数包括,例如比参考值高1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的切割的激肽原百分数。切割的激肽原升高的百分数也包括从零状态(例如,样品中没有或不可检测的结合捕获剂的切割的激肽原和/或完整的激肽原)至非零状态(例如,一些或可检测的切割的激肽原和/或完整的激肽原)增加症候(phenomenon)。

[0174] 如本文所使用,“降低的百分数/水平,或低于参考值的百分数/水平”意思是切割的百分数/水平小于参考值,比如对照样品中切割的激肽原的预定阈值。本文详细描述了对照水平。切割的激肽原的降低的水平包括例如比参考值低1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%或更多的切割的激肽原。结合捕获剂的切割的激肽原降低的水平也包括从非零状态(例如,样品中一些或可检测的切割的激肽原)至零状态(例如,样品中没有或不可检测的切割的激肽原)减少症候。

[0175] 在一些实施方式中,候选受试者是具有pKa1介导的病症例如比如HAE或自身免疫疾病比如RA、UC和克罗恩病的症状的人患者。例如,受试者患有水肿、肿胀,其中所述肿胀完全或主要是外周的;荨麻疹;发红、疼痛和没有感染迹象的肿胀;非组胺介导的水肿,肿胀的复发性发作或其组合。在其他实施方式中,受试者在收集样品时没有pKa1介导的病症的症状、没有pKa1介导的病症症状的历史或没有pKa1介导的病症比如HAE的病史。在仍其他实施方式中,受试者抵抗抗组胺疗法、皮质类固醇疗法或二者。

[0176] (i) HAE

[0177] 在一些实施方式中,涉及血浆激肽释放酶活性的疾病或病况是遗传性血管性水肿(HAE)。遗传性血管性水肿(HAE)也称为“Quincke水肿”、C1酯酶抑制剂缺陷、C1抑制剂缺陷和遗传性血管神经性水肿(HANE)。HAE的特征在于严重肿胀(血管性水肿)的复发发作,其可影响例如四肢、面部、生殖器、胃肠道和气道。HAE的症状包括例如臂、腿、嘴唇、眼睛、舌和/或喉咙的肿胀;可涉及喉咙肿胀和突然声嘶的气道阻塞;没有明显原因的腹部痉挛的重复发作;和/或肠的肿胀,其可以是严重的并且可导致腹部痉挛、呕吐、脱水、腹泻、疼痛和/或休克。患该HAE的约三分之一的个体在发作期间发展称为边缘性红斑的非痒皮疹。

[0178] 气道的肿胀可威胁生命并且造成一些患者的死亡。死亡率评估为15-33%。HAE每年导致约15,000-30,000例急诊室访问。

[0179] 创伤或压力例如牙科操作、疾病(例如,病毒疾病比如感冒和流感),月经和外科手术可触发血管性水肿的发作。为了预防HAE的急性发作,患者可尝试避免先前造成发作的具体的刺激。但是,在许多情况下,在没有已知触发物的情况下出现发作。典型地,HAE症状首先出现在幼年期并且在青春期恶化。平均,未治疗的个体每1至2周发作,并且大部分发作持续约3至4天(ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)。发作的频率和持续时间在具有遗传性血管性水肿的人之间,甚至在同一家族的人之间变化非常大。

[0180] 有三种类型的HAE,称为I、II和III型。估计HAE影响每50,000人中的1个人,I型占病例的约85%,II型占病例的约15%,而III型非常少见。III型是最新描述的形式,并且初始认为仅发生在女性中,但是已经鉴定了具有受影响的男性的家族。

[0181] HAE以常染色体显性模式遗传,使得受影响的人可从一个受影响的亲本遗传突变。可也发生基因的新突变,并且因此HAE可也出现在其家族没有该病症历史的人中。估计20-25%的病例源自新的自发突变。

[0182] SERPING1基因的突变造成I型和II型遗传性血管性水肿。SERPING1基因提供制备对于控制炎症重要的C1抑制剂蛋白质的指令。C1抑制剂阻止促进炎症的某些蛋白质的活性。造成I型遗传性血管性水肿的突变导致血液中C1抑制剂水平下降。相反,造成II型的突变导致产生功能异常的C1抑制剂。在没有适当水平的功能性C1抑制剂的情况下,产生过量的缓激肽。缓激肽通过增加流体穿过血管壁向身体组织的渗漏而促进炎症。身体组织中过

量积聚的流体造成患有I型和II型遗传性血管性水肿的个体中可见的肿胀的发作。

[0183] F12基因的突变与III型遗传性血管性水肿的一些病例相关。F12基因提供制备凝固因子XII的指令。除了在血液凝固(凝结)中发挥关键的作用之外,因子XII也是炎症的重要的刺激剂并且参与产生缓激肽。F12基因中的某些突变导致产生具有增加活性的因子XII。结果,产生更多的缓激肽并且血管壁变得更渗漏,这导致肿胀的发作。III型遗传性血管性水肿的其他病例的原因仍是未知的。一个或多个仍未鉴定的基因中的突变可能是造成这些病例中的病症的原因。

[0184] HAE可与源自变态反应或其他医学病况的其他形式的血管性水肿类似地存在,但是其病因和治疗明显不同。当遗传性血管性水肿被误诊为变态反应时,其最常用用抗组胺药、类固醇类和/或肾上腺素治疗,其通常对HAE无效,尽管肾上腺素可用于威胁生命的反应。对具有腹部肿胀的患者,误诊也导致不必要的试探性外科手术,并且在一些HAE患者中,腹部疼痛错误地诊断为身心性的。

[0185] 可例如,使用问卷例如由患者、临床医生或家族成员完成的问卷评估HAE的症状。这样的问卷是本领域已知的并且包括例如视觉类比评估表(visual analog scale)。见例如McMillan,C.V.等Patent.2012;5(2):113-26。

[0186] (ii) 类风湿性关节炎

[0187] 类风湿性关节炎(RA)是自身免疫性慢性炎性疾病,其造成关节肿胀和疼痛并且通常导致关节损坏。RA一般跟随复发/缓解过程,其中疾病活动的“爆发(flare)”穿插着疾病症状的缓解。RA与许多另外的炎症病症相关,包括斯耶格伦氏综合征(泪腺和唾液腺炎症造成的干眼和口),胸膜炎(在深呼吸和咳嗽时造成疼痛的胸膜的炎症),类风湿性结节(肺中发展的炎症的结节位点),心包炎(当躺下或前倾时,造成疼痛的心包膜的炎症),费耳提综合症(结合RA观察的脾肿大和白细胞减少,使得受试者易于感染)和血管炎(可阻塞血流的血管的炎症)。血浆激肽释放酶与类风湿性关节炎有关联。活性RA的症状包括疲劳、没有食欲、低热、肌肉和关节疼和僵硬。肌肉和关节僵硬通常在早上和不活动一段时间之后最明显。在爆发期间,关节频繁发红、肿胀、疼痛和脆弱,一般是由于滑膜炎的结果。

[0188] 类风湿性关节炎的治疗涉及药物治疗、休息、关节强化训练和关节保护的组合。两种类型的药物治疗被用于治疗类风湿性关节炎:抗炎性“一线药物”和“修饰疾病的抗风湿药物”(DMARD)。一线药物包括NSAIDs(例如,阿司匹林、萘普生、异丁苯丙酸和依托度酸)和可的松(cortisone)(皮质类固醇)。DMARD,比如金(例如,金盐、硫化葡萄糖金(gold thioglucose)、硫代苹果酸金(gold thiomalate)、口服金)、氨甲喋呤、柳氮磺胺吡啶、D-青霉胺、硫唑嘌呤、环磷酰胺、苯丁酸氮芥和环孢菌素、来氟米特、依那西普、英夫利昔单抗(infliximab)、阿那白滞素(anakinra)和阿达木单抗(adalimumab)和羟化氯喹,促进疾病缓解和预防进行性关节损伤,但是它们不是抗炎剂。用于评估RA和RA症状的评估表包括例如类风湿性关节炎严重程度评估表(RASS;Bardwell等,(2002)Rheumatology 41(1):38-45),SF-36关节炎具体健康指数(ASHI;Ware等,(1999)Med.Care.37(5Suppl):MS40-50)、关节炎影响测量评估表或关节炎影响测量评估表2(AIMS或AIMS2;Meenan等(1992)Arthritis Rheum.35(1):1-10);斯坦福健康评估问卷(HAQ)、HAQII或修饰的HAQ(见例如Pincus等(1983)Arthritis Rheum.26(11):1346-53)。

[0189] (iii) 肠疾病(IBD)-克罗恩病和溃疡性结肠炎

[0190] 炎性肠炎 (IBD) 是大肠和——在一些情况下——小肠的一组炎症病况。IBD 的主要形式是克罗恩病和溃疡性结肠炎 (UC)。占很少病例的是其他形式的 IBD: 胶原结肠炎、淋巴细胞结肠炎、缺血性结肠炎、改道性结肠炎、贝赛特氏综合症, 传染性结肠炎和未定型结肠炎。克罗恩病和 UC 之间的主要区别是炎症改变的位置和性质。克罗恩可影响胃肠道的任何部分, 从口至肛门 (跳跃性病变), 但是大部分病例开始于末端回肠。相反, 溃疡性结肠炎限于结肠和直肠。通过显微镜, 溃疡性结肠炎限于粘膜 (肠的上皮内层), 而克罗恩病影响整个肠壁。最后, 克罗恩病和溃疡性结肠炎以不同比例出现额外的肠表现 (比如肝问题、关节炎、皮肤表现和眼睛问题)。IBD 的症状包括腹部疼痛、呕吐、腹泻、便血、体重减轻, 增重和各种相关的症状或疾病 (关节炎、坏疽性脓皮病, 原发性硬化性胆管炎)。诊断一般通过结肠镜检查以及病理学损害的活组织检查进行。

[0191] 取决于严重程度水平, IBD 的治疗可能需要免疫抑制以控制症状。可使用免疫抑制剂, 比如硫唑嘌呤、氨甲喋呤或 6-巯基嘌呤。更常见地, IBD 的治疗需要氨水杨酸 (mesalamine) 的形式。通常, 类固醇类用于控制疾病爆发并且曾经作为维持药物 (maintenance drug) 是可接受的。生物制剂, 比如英夫利昔单抗, 已经用于治疗患克罗恩病或溃疡性结肠炎的患者。严重的病例可能需要外科手术, 比如肠切除、狭窄成形术 (strictureplasty) 或临时或永久性结肠造口术或回肠造口术。针对 IBD 的可选的医学治疗存在各种形式, 但是这样的方法侧重控制潜在的病理学, 以便避免延长的盲体暴露或外科手术切除。通常治疗开始于施用具有高抗炎作用的药物, 比如强的松。一旦成功控制炎症, 患者通常转向较轻的药物, 比如安萨科 (asacol) - 氨水杨酸 - 以保持疾病缓解。如果未成功, 可施用或不施用上述的免疫抑制剂药物与氨水杨酸 (其也可具有抗炎作用) 的组合, 这取决于患者。

[0192] (iv) 其他 pKa1 介导的或缓激肽介导的病况

[0193] 与血浆激肽释放酶活性相关的其他示例性疾病或病况包括非组胺-依赖性特发性血管性水肿、类风湿性关节炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、狼疮、阿尔茨海默氏疾病、败血症性休克、烧伤、脑缺血性/再灌注损伤、脑水肿、糖尿病性视网膜病、糖尿病性肾病变、黄斑性水肿、血管炎、动脉或静脉血栓形成、与心室辅助设备或支架相关的血栓形成、具有血栓形成的肝素-诱导的血小板减少、血栓栓塞病, 和伴随不稳定的心绞痛的冠心病、水肿、眼病、痛风、肠疾病、口腔粘膜炎、神经病痛、炎性疼痛、椎管狭窄退行性脊柱病、术后肠梗阻、大动脉动脉瘤、骨关节炎、遗传性血管性水肿、肺栓塞、中风、头部创伤或瘤周脑水肿、脓毒症、急性脑中动脉 (MCA) 缺血性事件 (中风)、再狭窄 (例如, 血管成形术之后)、系统性红斑狼疮肾炎、自身免疫疾病、炎性疾病、心血管疾病、神经疾病、与蛋白质错折叠相关的疾病、与血管生成相关的疾病、高血压肾病变和糖尿病性肾病变、变应性疾病和呼吸疾病 (例如过敏症、哮喘、慢性阻塞性肺部疾病、急性呼吸窘迫综合症、囊性纤维化、持续性鼻炎) 和组织损伤 (例如烧伤或化学损伤)。

[0194] 鉴定为具有如本文所描述的 pKa1 介导的病况或处在所述疾病风险中的受试者可进行适当的治疗, 比如本文所述的那些。

[0195] B. 评估治疗效力

[0196] 可也施用本文所述的试验方法, 以评估治疗 pKa1 介导的病况 (例如, HAE) 的效力。例如, 在治疗之前和之后或治疗过程期间, 可从进行治疗的受试者收集多个生物样品 (例

如,血液或血浆样品)。可通过如本文所描述的任何试验方法测量切割的和/或完整的激肽原的水平,并且因此可确定切割的和/或完整的激肽原的值(例如,百分数)。如果在治疗之后或在治疗过程中切割的激肽原的百分数下降(相比稍早收集的样品,稍后收集的样品中的切割的激肽原百分数)或在治疗之后或在治疗过程中完整的激肽原的百分数增加,则指示治疗是有效的。在一些例子中,治疗涉及治疗剂,比如如本文所描述的激肽释放酶结合剂,如本文所描述的缓激肽B2受体拮抗剂或如本文所描述的C1-INH取代剂。治疗剂的例子包括但不限于DX-2930或DX88。

[0197] 如果受试者被鉴定为不响应治疗,则更高剂量和/或更高的治疗剂给药频率被施用至经鉴定的受试者。在一些实施方式中,在被鉴定为响应治疗或不需要进一步治疗的受试者中保持、降低或终止治疗剂的剂量或给药频率。可选地,不同的治疗可施用至被发现不响应第一治疗的受试者。

[0198] 鉴定易于用pKa1抑制剂治疗的病症

[0199] 也可依赖于切割的激肽原和/或完整的激肽原的值,以鉴定可通过pKa1抑制剂治疗的病症。为了实施该方法,可通过适当的试验例如本文所述的那些比如蛋白质印迹试验,测量从具有目标疾病的受试者收集的样品(例如,血液样品或血浆样品)中切割的激肽原的水平和/或完整的激肽原的水平。可如本文所描述测定切割的和/或完整的激肽原的值比如百分数。切割的激肽原和/或完整的激肽原的值可与如本文所描述的参考值比较。如果切割的激肽原/完整的激肽原的值偏离参考值(例如,升高或降低),其指示pKa1抑制剂可有效治疗疾病。例如,如果治疗之后或在治疗过程中切割的激肽原的百分数下降,则治疗可被鉴定为有效的。可选地,如果治疗之后或在治疗过程中完整的激肽原的百分数增加,则治疗被鉴定为有效的。

[0200] 在一些实施方式中,可使用检测剂(例如,抗体)测量切割的和/或完整的激肽原的水平,所述检测剂相比其他形式的激肽原,特异性结合切割的激肽原或完整的激肽原。在一些例子中,与完整的激肽原相比,抗体特异性结合切割的激肽原。在其他例子中,抗体特异性结合切割的激肽原的轻链的C-末端。

[0201] 如果疾病被鉴定为对(可用pKa1抑制剂治疗)pKa1抑制剂敏感,则方法可进一步包括向具有疾病的受试者施用有效量的pKa1抑制剂例如DX-88、EPIKAL-2或DX-2930。

[0202] 治疗

[0203] 处在pKa1介导的或缓激肽介导的病症风险或遭受(例如,具有)所述病症的受试者,如通过本文所述的任何方法鉴定的受试者,可用任何适当的治疗剂治疗。在一些实施方式中,提供的方法包括基于提供的试验例如生物标记物检测的输出,选择用于受试者的治疗。

[0204] 在一些实施方式中,方法包括以下两个步骤之一或二者:基于试验例如生物标记物检测的输出,选择或施用治疗剂例如如本文所描述的激肽释放酶结合剂例如如本文所描述的缓激肽B2受体拮抗剂例如如本文所描述的C1-INH取代剂,用于施用至受试者。

[0205] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白或多肽被施用至受试者。在一些实施方式中,激肽释放酶结合剂是激肽释放酶抑制剂例如肽、小分子抑制剂、激肽释放酶抗体或其片段。在一些实施方式中,缓激肽B2受体的拮抗剂被施用至受试者。在一些实施方式中,C1-INH替换治疗剂被施用至受试者。

[0206] 治疗剂例如激肽释放酶抑制剂例如缓激肽B2受体拮抗剂例如C1-INH取代剂,可与另一疗法一起施用,作为治疗涉及血浆激肽释放酶和/或缓激肽活性的疾病或病况的联合疗法的一部分。例如,用激肽释放酶抑制剂、缓激肽B2受体拮抗剂或C1-INH取代剂中的一个或多个,例如用激肽释放酶抑制剂、缓激肽B2受体拮抗剂或C1-INH取代剂中的一个或多个和另一疗法的联合疗法,可以多种不同的配置被提供。第一试剂可在施用其他疗法之前或之后施用。在一些情况下,同时或时间上接近地(例如,注射之间的短时间间隔,比如相同的治疗期间)施用第一试剂和另一疗法(例如,治疗剂)。也可以更大的时间间隔施用第一试剂和其他疗法。

[0207] 血浆激肽释放酶结合剂

[0208] 血浆激肽释放酶结合剂(例如,结合蛋白,例如多肽,例如抑制性多肽,例如抗体,例如抑制性抗体或其他粘合剂例如小分子)是对各种疾病和病况有用的治疗剂,所述疾病和病况例如涉及血浆激肽释放酶活性的疾病和病况。例如,在一些实施方式中,涉及血浆激肽释放酶活性的疾病或病况是遗传性血管性水肿(HAE)。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白或多肽被施用至处在pKa1介导的或缓激肽介导的病症风险或遭受pKa1介导的或缓激肽介导的病症的受试者。

[0209] 激肽释放酶——组织和/或血浆激肽释放酶——的许多有用的蛋白质抑制剂包括Kunitz结构域。如本文所使用,“Kunitz结构域”是具有至少51个氨基酸的多肽结构域并且包含至少两个,和优选地三个,二硫键。折叠结构域,以便第一和第六半胱氨酸、第二和第四以及第三和第五半胱氨酸形成二硫键(例如,在具有58个氨基酸的Kunitz结构域中,半胱氨酸可存在于对应氨基酸5、14、30、38、51和55的位置,其根据下面提供的BPTI同源序列的编号,并且可在位置5和55,14和38,和30和51的半胱氨酸之间形成二硫键),或者,如果存在两个二硫键,它们可在其半胱氨酸的相应的亚组之间形成。各半胱氨酸之间的间隔可在对应:5至55、14至38和30至51位置之间的下述间隔的7、5、4、3、2、1或0个氨基酸以内,其根据下面提供的BPTI序列的编号。BPTI序列可用作参考来指任何一般性Kunitz结构域中的具体位置。感兴趣的Kunitz结构域与BPTI的比较可通过鉴定最佳适合比对进行,其中比对的半胱氨酸的数量最大化。

[0210] BPTI的Kunitz结构域的3D结构(以高分辨率)是已知的。一种X射线结构作为“6PTI”存放在Brookhaven蛋白质数据库中(Brookhaven Protein Data Bank)。一些BPTI同源物的3D结构是已知的(Eigenbrot等,(1990)Protein Engineering,3(7):591-598;Hynes等,(1990)Biochemistry,29:10018-10022)。至少八十一个Kunitz结构域序列是已知的。已知的人同源物包括也称为组织因子途径抑制剂(TFPI)的LACI的三个Kunitz结构域(Wun等,(1988)J.Biol.Chem.263(13):6001-6004;Girard等,(1989)Nature,338:518-20;Novotny等,(1989)J.Biol.Chem.,264(31):18832-18837)、间- α -胰蛋白酶抑制剂APP-I的两个Kunitz结构域(Kido等,(1988)J.Biol.Chem.,263(34):18104-18107)、来自胶原蛋白的Kunitz结构域、TFPI-2的三个Kunitz结构域(Sprecher等,(1994)PNAS USA,91:3353-3357)、1型肝细胞生长因子活化剂抑制剂的Kunitz结构域、2型肝细胞生长因子活化剂抑制剂的Kunitz结构域、描述在美国专利出版号:2004-0152633中的Kunitz结构域。LACI是包含三个Kunitz结构域,分子量为39kDa(表1中的氨基酸序列)的人血清磷糖蛋白。

[0211] 表1:示例性天然Kunitz结构域

[0212]	<p>LACI : (SEQ ID NO.4)</p> <pre> 1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLNAds eedehtiit dtelpplkLM 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC 101 KKMCTRDnan riiktntlqge kpdfCfleed pgiCrgyitr yfyngqtkgC 151 erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn gfqvdnygtq lnavnsltp 201 qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC 251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm </pre> <p>信号序列(1-28)是大写和加下划线的 LACI-K1 (50-107)是大写的 LACI-K2 (121-178) 是加下划线的 LACI-K3 (211-270)是粗体</p>
--------	---

[0213]	<p>BPTI (SEQ ID NO: 5)</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">1</td> <td style="text-align: center;">2</td> <td style="text-align: center;">3</td> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="text-align: center;">5</td> </tr> <tr> <td>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</td> <td>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</td> <td>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</td> <td>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</td> <td>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</td> </tr> <tr> <td>RPDFCLEPPYTGPCKARI</td> <td>IIRYFYNAGLAGLCQ</td> <td>TFVYGGCRAKRNNFKSAED</td> <td>CMRTC</td> <td>GGGA</td> </tr> </table>	1	2	3	4	5	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	RPDFCLEPPYTGPCKARI	IIRYFYNAGLAGLCQ	TFVYGGCRAKRNNFKSAED	CMRTC	GGGA
1	2	3	4	5												
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678												
RPDFCLEPPYTGPCKARI	IIRYFYNAGLAGLCQ	TFVYGGCRAKRNNFKSAED	CMRTC	GGGA												

[0214] 上面的Kunitz结构域称为LACI-K1 (残基50至107)、LACI-K2 (残基121至178) 和 LACI-K3 (213至270)。Wun等报道了LACI的cDNA序列(J.Biol.Chem.,1988,263(13):6001-6004)。Girard等(Nature,1989,338:518-20)报道了突变研究,其中三个Kunitz结构域的每个的P1残基均被改变。当F.VIIa络合至组织因子时,LACI-K1抑制因子VIIa(F.VIIa),并且LACI-K2抑制因子Xa。

[0215] 包含示例性Kunitz结构域的蛋白质包括下述蛋白质,其中SWISS-PROT登陆号在括弧中:

- [0216] A4_HUMAN(P05067),A4_MACFA(P53601),A4_MACMU(P29216),
- [0217] A4_MOUSE(P12023),A4_RAT(P08592),A4_SAIISC(Q95241),
- [0218] AMBP_PLEPL(P36992),APP2_HUMAN(Q06481),APP2_RAT(P15943),
- [0219] AXP1_ANTAF(P81547),AXP2_ANTAF(P81548),BPT1_BOVIN(P00974),
- [0220] BPT2_BOVIN(P04815),CA17_HUMAN(Q02388),CA36_CHICK(P15989),
- [0221] CA36_HUMAN(P12111),CRPT_BOOMI(P81162),ELAC_MACEU(O62845),
- [0222] ELAC_TRIVU(Q29143),EPPI_HUMAN(O95925),EPPI_MOUSE(Q9DA01),
- [0223] HTIB_MANSE(P26227),IBP_CARCR(P00993),IBPC_BOVIN(P00976),
- [0224] IBPI_TACTR(P16044),IBPS_BOVIN(P00975),ICS3_BOMMO(P07481),
- [0225] IMAP_DROFU(P11424),IP52_ANESU(P10280),ISC1_BOMMO(P10831),
- [0226] ISC2_BOMMO(P10832),ISH1_STOHE(P31713),ISH2_STOHE(P81129),
- [0227] ISIK_HELPO(P00994),ISP2_GALME(P81906),IVB1_BUNFA(P25660),
- [0228] IVB1_BUNMU(P00987),IVB1_VIPAA(P00991),IVB2_BUNMU(P00989),
- [0229] IVB2_DABRU(P00990),IVB2_HEMHA(P00985),IVB2_NAJNI(P00986),
- [0230] IVB3_VIPAA(P00992),IVBB_DENPO(P00983),IVBC_NAJNA(P19859),
- [0231] IVBC_OPHHA(P82966),IVBE_DENPO(P00984),IVBI_DENAN(P00980),
- [0232] IVBI_DENPO(P00979),IVBK_DENAN(P00982),IVBK_DENPO(P00981),
- [0233] IVBT_ERIMA(P24541),IVBT_NAJNA(P20229),MCPI_MELCP(P82968),
- [0234] SBPI_SARBU(P26228),SPT3_HUMAN(P49223),TKD1_BOVIN(Q28201),

- [0235] TKD1_SHEEP(Q29428),TXCA_DENAN(P81658),UPTI_PIG(Q29100),
[0236] AMBP_BOVIN(P00978),AMBP_HUMAN(P02760),AMBP_MERUN(Q62577),
[0237] AMBP_MESAU(Q60559),AMBP_MOUSE(Q07456),AMBP_PIG(P04366),
[0238] AMBP_RAT(Q64240),IATR_HORSE(P04365),IATR_SHEEP(P13371),
[0239] SPT1_HUMAN(O43278),SPT1_MOUSE(Q9R097),SPT2_HUMAN(O43291),
[0240] SPT2_MOUSE(Q9WU03),TFP2_HUMAN(P48307),TFP2_MOUSE(O35536),
[0241] TFPI_HUMAN(P10646),TFPI_MACMU(Q28864),TFPI_MOUSE(O54819),
[0242] TFPI_RABIT(P19761),TFPI_RAT(Q02445),YN81_CAEEL(Q03610)

[0243] 各种方法可用于鉴定来自序列数据库的Kunitz结构域。例如,可针对GenBank序列数据库(National Center for Biotechnology Information(国家生物技术信息中心), National Institutes of Health(国立卫生研究院),Bethesda MD,) 例如使用BLAST;针对HMMs的Pfam数据库(Hidden Markov Models)(例如,使用Pfam搜索的默认参数;针对SMART数据库;或针对ProDom数据库,检索Kunitz结构域的已知氨基酸序列、共有序列或基序(例如,ProSite基序(ProSite Motif))。例如,Pfam版本9的Pfam登陆号PF00014提供了许多Kunitz结构域和HMM,用于鉴定Kunitz结构域。Pfam数据库的描述可见Sonhammer等(1997) *Proteins* 28(3):405-420,并且HMM的详细说明可见于例如Gribskov等(1990) *Meth.Enzymol.*183:146-159;Gribskov等(1987) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 84:4355-4358; Krogh等(1994) *J.Mol.Biol.*235:1501-1531;和Stultz等(1993) *Protein Sci.*2:305-314。HMMs的SMART数据库(Simple Modular Architecture Research Tool(简单模块架构搜索工具),EMBL,Heidelberg,DE)描述在Schultz等(1998), *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95:5857和Schultz等(2000) *Nucl.Acids Res* 28:231中。SMART数据库包含通过用HMMer2搜索程序的隐马尔可夫模型进行性能分析(profiling)而鉴定的结构域(R.Durbin等(1998) *Biological sequence analysis:probabilistic models of proteins and nucleic acids*.Cambridge University Press(剑桥大学出版社))。也注释和监测数据库。ProDom蛋白质结构域数据库由同源的结构域的自动汇编组成(Corpet等(1999), *Nucl.Acids Res.*27:263-267)。使用SWISS-PROT 38和TREMBL蛋白质数据库的递归PSI-BLAST搜索构建当前版本的ProDom(Altschul等(1997) *Nucleic Acids Res.*25:3389-3402;Gouzy等(1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340.)。数据库自动产生每个结构域的共有序列。Prosite列举了作为基序的Kunitz结构域并且鉴定包括Kunitz结构域的蛋白质。见例如Falquet等 *Nucleic Acids Res.*30:235-238(2002)。

[0244] Kunitz结构域主要利用两个环区域(“结合环”)中的氨基酸与靶蛋白酶相互作用。第一环区域大概在对BPTI的氨基酸13-20的残基之间。第二环区域大概在对BPTI的氨基酸31-39的残基之间。Kunitz结构域的示例性文库改变第一和/或第二环区域的一个或多个氨基酸位置。当筛选与激肽释放酶相互作用的Kunitz结构域时或当选择改善的亲性和变体时,尤其有用的待改变的位置包括:就BPTI的序列而言,位置13、15、16、17、18、19、31、32、34和39。这些位置的至少一些预期密切接触靶蛋白酶。改变其他位置也是有用的例如在三维结构中临近上述位置的位置。

[0245] Kunitz结构域的“框架区”被定义为是Kunitz结构域的部分的那些残基,但是尤其不包括第一和第二结合环区域中的残基,即,大概对应BPTI的氨基酸13-20和BPTI的31-39

的残基。相反地,不在结合环中的残基可忍耐更宽范围的氨基酸置换(例如,保守和/或非保守替换)。

[0246] 在一种实施方式中,这些Kunitz结构域是环状结构的变体形式,包括人脂蛋白相关的凝集抑制剂(LACI)蛋白质的Kunitz结构域1。LACI包含三个内部明确定义的肽环结构,其是典范Kunitz结构域(Girard, T.等,1989.Nature, 338:518-520)。已经筛选、分离本文所述的LACI的Kunitz结构域1的变体,其以增强的亲和力和特异性结合激肽释放酶(见例如美国专利号5,795,865和6,057,287)。这些方法可也施用至其他Kunitz结构域框架,以获得与激肽释放酶例如血浆激肽释放酶相互作用的其他Kunitz结构域。激肽释放酶功能的有用调节剂通常结合和/或抑制激肽释放酶,如使用激肽释放酶结合和抑制试验测定的。

[0247] 在一些方面中,激肽释放酶结合剂(例如,结合蛋白,例如多肽,例如抑制性多肽,例如抗体,例如抑制性抗体或其他粘合剂,例如小分子)结合血浆激肽释放酶的活性形式。在一些实施方式中,激肽释放酶结合剂,结合和抑制血浆激肽释放酶例如人血浆激肽释放酶和/或鼠激肽释放酶。

[0248] 血浆激肽释放酶结合蛋白可以是全长(例如,IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(例如,IgA1、IgA2)、IgD和IgE)或可仅仅包括抗原结合片段(例如,Fab、F(ab')₂或scFv片段)。结合蛋白可包括两个重链免疫球蛋白和两个轻链免疫球蛋白,或可以是单链抗体。血浆激肽释放酶结合蛋白可以是重组蛋白质比如人源化的、CDR移植的、嵌合的、去免疫化的或体外产生的抗体,并且可任选地包括源自人生殖系免疫球蛋白序列的恒定区。在一种实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白是单克隆抗体。

[0249] 在一些实施方式中,激肽释放酶结合蛋白结合和抑制血浆激肽释放酶例如人血浆激肽释放酶和/或鼠激肽释放酶。示例性血浆激肽释放酶结合蛋白公开在美国公开号20120201756中,其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,激肽释放酶结合蛋白是抗体(例如,人抗体),其具有选自下述的抗体的轻链和/或重链:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白与下述竞争或结合与下述相同的表位:M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本文也称为DX-2922)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本文也称为DX-2930)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09和M35-G04。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白是DX-2930。

[0250] 下面提供了DX-2930的重链和轻链可变区序列。

[0251] DX-2930重链可变区:

[0252] EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRF
TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGMVTVSS (SEQ ID NO:6)

[0253] DX-2930轻链可变区:

[0254] DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPKAPKLLIYKASTLESVPSRFSGSGSG
TEFTLTISLQPDFATYYCQQYNTYWFQGGTKVEI (SEQ ID NO:7)

[0255] 在一些方面中,激肽释放酶结合多肽(例如,抑制性多肽)结合活性形式的血浆激

肽释放酶。示例性多肽血浆激肽释放酶试剂公开在美国专利号5,795,865、美国专利号5,994,125、美国专利号6,057,287、美国专利号6,333,402、美国专利号7,628,983和美国专利号8,283,321、美国专利号7,064,107、美国专利号7,276,480、美国专利号7,851,442、美国专利号8,124,586、美国专利号7,811,991和美国公开号20110086801中,其每一篇的全部内容通过引用并入本文。在一些实施方式中,激肽释放酶结合多肽是DX-88(非天然产生的激肽释放酶抑制剂,也称为**KALBITOR[®]**(艾卡拉肽(ecallantide)),SEQ ID NO:8)。在一些实施方式中,激肽释放酶抑制剂包括SEQ ID NO:8的氨基酸3-60的约58-氨基酸序列或具有SEQ ID NO:8的60-氨基酸序列的DX-88多肽,或由SEQ ID NO:8的氨基酸3-60的约58-氨基酸序列或具有SEQ ID NO:8的60-氨基酸序列的DX-88多肽组成。

[0256] Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp(SEQ ID NO:8)

[0257] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白是EPIKAL-2(SEQ ID NO:9),其是非天然存在的激肽释放酶抑制剂,具有58残基氨基酸序列(对应SEQ ID NO:8的残基3-60),并且在残基34具有Ile至Ser的氨基酸替换和在残基39具有Glu至Gly的氨基酸替换。EPIKAL-2的序列显示在下面:

[0258] EpiKal2:Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp(SEQ ID NO:9)

[0259] 在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白与本文所述的结合蛋白可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白在HC和/或LC框架区(例如,HC和/或LC FR 1,2,3,和/或4)中可与本文所述的结合蛋白具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白在HC和/或LC CDR(例如,HC和/或LC CDR1,2,和/或3)中可与本文所述的结合蛋白可具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。在一些实施方式中,血浆激肽释放酶结合蛋白可在恒定区(例如,CH1、CH2、CH3、和/或CL1)可与本文所述的结合蛋白具有约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性。

[0260] 在一些方面中,小分子结合活性形式的血浆激肽释放酶。

[0261] 缓激肽B2受体拮抗剂

[0262] 在一些实施方式中,缓激肽B2受体拮抗剂被施用至受试者。示例性缓激肽B2受体拮抗剂包括Incatibant(**Firazyr[®]**),其是包含10个氨基酸的拟肽药物,其阻止天然缓激肽与缓激肽B2受体的结合。

[0263] C1-INH取代剂

[0264] 在一些实施方式中,C1-INH取代剂被施用至受试者。示例性C1-INH取代剂是公众

可获得的并且包括例如Berinert®，其是纯化的人巴氏消毒的纳米过滤的C1-INH缩合物。

实施例

[0265] 实施例1:切割的激肽原

[0266] 基于接触系统的分析,切割的激肽原是合适的用于测量接触系统激活的生物标记物。切割的激肽原先前已经显示在HAE发作期间、在肝硬化中升高,并且是由脓毒症期间接触系统激活造成的。针对切割的激肽原结合完整的激肽原的消耗(depletion)淘选抗体噬菌体展示文库。用切割的激肽原和获得自杂交瘤细胞系单克隆抗体平行免疫小鼠。两种尝试提供了许多结合切割的和完整的激肽原的不同单克隆抗体,但是没有抗体仅仅结合切割的激肽原。

[0267] 筛选适合蛋白质印迹试验的许多抗体,并且数个被鉴定为效果好,包括图2中显示的显示小鼠mAb(克隆11H05)。显然,该试验能够检测人血浆样品中切割的激肽原。此外,图2中的数据确认玻璃中的血浆收集足够预防接触激活和激肽原切割。

[0268] 基于质谱的方法可也用于检测患者血浆中切割的激肽原。在该方法中,来自患者样品的一种免疫物吸附激肽原,蛋白水解消化洗脱的激肽原并且通过LC-MC分析肽片段。

[0269] 实施例2:完整的和切割的激肽原

[0270] 蛋白质印迹用于显示在发作期间从患者获得并且收集在柠檬酸化的血浆管——包含抗蛋白酶混合物——中的血浆展示完整的激肽原(即,1-链)的量的下降(图3)。观察到切割的激肽原(即,2-链)的增加。

[0271] 实施例3:测量切割的激肽原水平的试验

[0272] 使用Licor检测,进一步优化用于检测完整的(1-链)和切割的(2-链)高分子量激肽原(HMWK)的蛋白质印迹试验。本文所述的该试验使用通过杂交瘤技术产生的小鼠单克隆抗体(克隆11H05)通过,所述杂交瘤技术如下进行:用2-链HMWK免疫动物,并且通过ELISA针对1-链和2-链HMWK筛选杂交瘤融合。基于其在蛋白质印迹试验中的表现和其特异性结合HMWK的轻链而不结合其重链的能力,选择11H05mAb。优选轻链结合剂,因为轻链不存在于其他血浆激肽原(低分子量激肽原,LMWK)中,其不是pKa1底物。试验也用于表明在塑料管中收集血浆的重要性,因为在玻璃管中收集导致接触系统激活(图4)。

[0273] 在一些例子中,在本文所述的蛋白质印迹试验中使用下述材料和条件:

[0274] 材料

[0275] • XCell SureLock® 小型细胞(Mini-Cell),Life Technologies(Invitrogen), Cat.#(商品目录编码)EI0001

[0276] • 凝胶盒电源供应器(Gel Box Power Supply)

[0277] • iBlot®蛋白质印迹转移设备(Western Blotting Transfer Device),Life Technologies(Invitrogen),Cat.#IB1001

[0278] • iBlot®转移堆,硝化纤维素,小型(Transfer Stack,nitrocellulose,mini), Life Technologies(Invitrogen),Cat.#IB301001

[0279] • 基质实验室抗冲2多道移液器(Matrix Laboratories Impact 2 Multichannel Pipettor)_或等同物

- [0280] • Rainin自动移液器 (Rainin Pipetman), 分级体积范围 (assorted volume ranges), Rainin, Cat#: P-10, P-20, P-100, P-200, 和 P-1000 或等同物
- [0281] • 具有图表记录仪 (Chart Recorder) 的 -80℃ 冰柜
- [0282] • 具有图表记录仪的 -20℃ 冰柜
- [0283] • 具有图表记录仪的 2-8℃ 冰箱
- [0284] • 0.22μm 聚醚砜 (PES) 过滤器系统, Corning, Cat#431096 或等同物
- [0285] • 去离子和纯化水 (DI水), Ricca Chemical, Cat#9150-5 或等同物
- [0286] • NuPAGE 7% Tris-乙酸盐凝胶, 15-孔, Life Technologies (Invitrogen), Cat.# EA03555Box
- [0287] • Tris-乙酸盐 SDS 电泳缓冲液 (Running Buffer) (20X), Life Technologies (Invitrogen), Cat.#LA0041
- [0288] • NuPAGE 样品还原剂 (10X), Life Technologies (Invitrogen), Cat.#NP0009
- [0289] • NuPAGE 样品缓冲液 (4X), Life Technologies (Invitrogen), Cat.#NP0007
- [0290] • NuPAGE 4-12% Bis-Tris 凝胶, 15-孔, Life Technologies (Invitrogen), Cat.# NP0336BOX
- [0291] • MES SDS 电泳缓冲液 (20X), Life Technologies (Invitrogen), Cat.#NP0002
- [0292] • Odyssey 封闭缓冲液, LI-COR, Cat.#927-40000
- [0293] • Tween20, Sigma, Cat.#P1379
- [0294] • 磷酸缓冲盐溶液 pH 7.4, Sigma, Cat#P-3813 或等同物
- [0295] • Tris, Fisher Scientific, Cat.#T393-5000
- [0296] • 氯化钠, JT Baker, Cat.#3624-19
- [0297] • 6N 盐酸, EMD, Cat.#HX0603M-6
- [0298] • 3M 醋酸钠缓冲液 pH 5.2, Teknova, Cat.#S0296
- [0299] • 牛血清白蛋白 (BSA), 无 IgG 和蛋白酶, Jackson ImmunoResearch, Cat.#001-000-162
- [0300] • 小鼠单克隆抗-LC HMWK 抗体克隆, 克隆 11H05 (#16), 1.4mg/mL, Dyax
- [0301] • 山羊抗小鼠 IRDye 680RD, LI-COR, Cat.#926-68070
- [0302] • Odyssey 单色分子量标记物, LI-COR, Cat.#928-40000
- [0303] • 抗蛋白酶抑制剂混合物 (10X), Dyax 提供
- [0304] • 因子 XIIa, 1.47mg/mL (21.6μM), Enzyme Research Labs, Dyax 提供
- [0305] • 激肽原 (Kininogen) 缺陷血浆, Hyphen-Biomed, Dyax 提供
- [0306] • 单链 HMWK, 1.61mg/mL, Enzyme Research Labs, Cat.#HK 2700
- [0307] • 双链 HMWK, 2.01mg/mL, Enzyme Research Labs, Cat.#HK 2362
- [0308] • 正常人血浆样品, HAE 患者样品和由 Dyax 提供的 Bioreclamation 样品
- [0309] • DX2930, Dyax, Lot#PURDX1-L01, 32.1mg/mL
- [0310] • DX88, Dyax, Lot#B2007-029, 10.1mg/mL
- [0311] 方案概述:

[0312]

非还原测试样品制备	通过添加 5 μ L 的 4X 样品缓冲液至 15 μ L 的~5%测试样品而制备非还原测试样品。将样品加热至 95 $^{\circ}$ C, 5 分钟。将样品短暂离心, 以从测试样品微离心管盖去除任何浓缩物。
凝胶上样和电泳	使用 4-12% Bis-Tris 凝胶对还原的样品进行电泳, 并使用 7% Tris-乙酸盐凝胶对非还原的样品进行电泳。将单色蛋白质标记物上样至每个凝胶的泳道 1。将 QC 样品上样至每个凝胶的泳道 2。将还原的和非还原的测试样品上样至适当的凝胶类型的泳道 3-15。凝胶在 125V 下电泳~75 分钟。
凝胶转移	使用 iBlot 转移堆, 小型和 iBlot 将每个凝胶转移至硝化纤维素膜。在添加凝胶和转移堆至 iBlot 之后, 选择程序 P0 并且电泳~7 分钟。在转移结束之后, 将膜转移至包含 20 ml 的 Odyssey 封闭缓冲液的塑料托盘。
膜封闭	用 20 ml 的 Odyssey 封闭缓冲液封闭膜。用封闭缓冲液在板摇床上孵育膜 1 小时。
小鼠抗 HMWK LC mAb 制备和添加	小鼠抗 HMWK LC mAb 在包含 0.2% Tween-20 的 Odyssey 封闭缓冲液中稀释至 1 μ g/mL。从每个膜丢弃封闭缓冲液。将 20 ml 体积的 1 μ g/mL 一次抗体溶液添加至每个膜并且在板摇床上在室温下孵育膜 1 小时。
山羊抗小鼠 IRDye680 制备和添加	以 1:15,000 稀释度制备山羊抗小鼠 IRDye680。以 1:10 稀释度最初制备山羊抗小鼠 IRDye680, 随后是 1:1,500 稀释度达到最终 1:15,000 的稀释度。在包含 0.2% Tween-20 的 Odyssey 封闭缓冲液中制备山羊抗小鼠 IRDye680。将二次抗体溶液添加至每个膜并且在板摇床上在室温下孵育膜 1 小时。
膜读取	用 PBS 洗提之后, 将膜放置在 Li-Cor Odyssey 上并且读取膜。
膜洗涤	在一次抗体孵育和二次抗体孵育之后, 用包含 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤膜, 每次 5 分钟, 总共洗涤四次。

[0313] 为了评估mAb 11H05检测1-链和2-链HMWK的能力,纯化的蛋白质以包括正常血浆中观察的水平的浓度被掺入到HMWK缺陷血浆中(图5)。显然,在还原条件下,11H05以比2-链HMWK更高的灵敏度检测1-链HMWK。通过考虑mAb对两种形式的HMWK的差别灵敏度,该试验可用于精确定量患者血浆中1-链和2-链HMWK的浓度。可选地,可测定怀疑涉及接触激活的血浆样品中的2-链信号百分数,并且将其与来自正常健康个体的血浆中的2-链信号百分数进行比较。使用后一种方法,试验可用于筛选来自不同疾病的样品并且鉴定与接触系统激活相关的疾病。

[0314] 也进行试验间和试验内精度和准确度测试。在非还原和还原条件下,进行的试验可接受地在所有测试的参数中产生的CV百分数值 $\leq 25\%$ 。

[0315] 也对正常人血浆进行稳定稳定性测试。测定HMWK在0和3个稳定循环之间不出现降解。

[0316] 使用来自患遗传性血管性水肿 (HAE) 的患者的血浆样品验证蛋白质印迹试验,所述遗传性血管性水肿 (HAE) 是已知由过多的接触系统激活和pKa1活性造成的疾病。如图6中所显示,HAE血浆中切割的HMWK的百分数是约20%,其显著高于正常血浆的HMWK的百分数。在HAE发作期间,使用该试验检测的切割的HMWK百分数进一步升高。该数据清楚表明静息(基础)疾病状态期间,HAE血浆中增加的切割的HMWK。因此,通过评估它们恢复切割的激肽原的正常水平的程度,该试验可用于监测治疗性pKa1抑制剂的效力。

[0317] 已知带负电的表面或颗粒,比如磷脂或多磷酸盐是接触系统的有效活化剂,其导致活性pKa1的形成并且由1-链HMWK的蛋白水解产生缓激肽。导致HAE发作中接触系统激活的生理学表面的特性是未知的。但是,HAE发作与FXIIa的产生有关。使用FXIIa——而不是带电的物质比如硫酸葡聚糖或高岭土——作为接触系统引发剂确保更加可再生的接触系统激活和优化的试验表现。测定FXIIa的浓度和反应条件,以接近在HAE患者中观察的切割的激肽原的百分数($\sim 20-50\%$) (图7,表1)。

[0318] 表1-FXIIa处理的人血浆样品的Licor信号强度*

因子XIIa激活条件的还原比较								
FXIIa浓度 (nM)	孵育温度	孵育时间 (min)	单链	双链 (56 kDa)	双链 (46 kDa)	总信号	泳道中的 双链%	来自未处理信 号的双链%
0	N/A	N/A	29300	202	300	30002	1.7%	N/A
2.5	37 °C	10	21900	4010	2370	28280	22.6%	25.8%
2.5	37 °C	30	19500	4240	2370	26110	25.3%	33.9%
2.5	冰	10	20900	447	1220	22567	7.4%	29.2%
2.5	冰	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	冰	10	13300	3270	2780	19350	31.3%	54.9%
5	冰	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	冰	10	12100	2510	2520	17130	29.4%	59.0%
7.5	冰	30	260	4340	12300	16900	98.5%	99.1%

[0320] 泳道中的双链%:双链信号的和/总泳道信号的和

[0321] 来自未处理信号的双链%:1- (处理的单链信号/未处理的单链信号)

[0322] *图5中来自蛋白质印迹的样品的信号分析。

[0323] 使用2.5nM的FXIIa浓度和优化的反应条件,在存在或没有10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DX-2930 (pKa1活性的有效的抗体抑制剂) 情况下检测来自15名男性和15名女性的正常人血浆,并且测定2-链HMWK百分数(表2)。显然,试验能够检测血浆中HMWK蛋白水解的血浆激肽释放酶抑制。显示DX-2930在该试验中展示与艾卡拉肽大概相等的效力,所述艾卡拉肽是用于治疗HAE发作的被批准的pKa1抑制剂(图8)。在该体外试验中与艾卡拉肽的同等效力提示等同的药物

水平可在HAE中同样有效。

[0324] 表2.泳道中双链的平均百分数,还原的和非还原的值*

样品	泳道中双链的平均百分数			
	XIIa (nM)	DX2930 ($\mu\text{g/mL}$)	还原的	非还原的
男性平均数	0	0	16.1%	32.0%
	2.5	0	42.0%	61.2%
	2.5	10	29.5%	43.6%
女性平均数	0	0	9.6%	21.5%
	2.5	0	43.8%	50.2%
	2.5	10	26.4%	30.3%

[0326] *来自15名男性和15名女性的血浆的平均数。

[0327] 也使用该蛋白质印迹试验测试来自患溃疡性结肠炎(UC)和类风湿性关节炎(RA)的患者的样品。患者血浆样品获得自Bioreclamation并且收集在塑料管的抗凝剂中。发现相比正常的对照患者,在UC和RA患者中切割的激肽原的百分数都升高(图9,表3)。

[0328] 表3.溃疡性结肠炎和类风湿性关节炎样品的蛋白质印迹分析的总结

泳道	K2EDTA和柠檬酸钠中还原的患病状态样品,溃疡性结肠炎和类风湿性关节炎							泳道中的双链%
	样品	抗凝剂	疾病	单链 (110kDa)	双链 (56kDa)	双链 (46kDa)	总信号	
1	分子量标准	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	1-链和 2-链标准	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	A3005, N17	抗蛋白酶	正常	20500	775	366	21641	5.3%
4	BRH745075	柠檬酸钠	正常	18700	1340	802	20842	10.3%
5	BRH745056	柠檬酸钠	正常	24200	893	782	25875	6.5%
6	BRH715036	K2EDTA	溃疡性结肠炎	17400	3030	1340	21770	20.1%
7	BRH715037	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	17400	1220	694	19314	9.9%
8	BRH715038	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	N/A	2140	10300	12440	100.0%
9	BRH715039	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	14100	1700	596	16396	14.0%
10	BRH715040	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	13300	1170	2070	16540	19.6%
11	BRH715041	K2EDTA	类风湿性关节炎	N/A	N/A	4950	4950	100.0%
12	BRH715042	K2EDTA	类风湿性关节炎	88	N/A	9250	9338	99.1%
13	BRH715043	K2EDTA	类风湿性关节炎	N/A	N/A	6900	6900	100.0%
14	BRH715044	柠檬酸钠	类风湿性关节炎	N/A	N/A	2850	2850	100.0%
15	BRH715045	柠檬酸钠	类风湿性关节炎	6600	1860	1520	9980	33.9%

[0330] 也使用蛋白质印迹试验检测来自患克罗恩病(CD)的患者的样品。患者血浆样品获得自Bioreclamation并且收集在塑料管中的抗凝剂中。相比正常的对照患者,发现切割的激肽原的百分数在CD患者中升高(图10,表4)。

[0331] 表4.克罗恩病样品的蛋白质印迹分析的总结

泳道	样品	抗凝剂	疾病	HMWK信号					泳道中的双链%
				单链 (150kDa)	单链 (110kDa)	双链 (56kDa)	双链 (46kDa)	总信号	
1	分子量标准	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	1-链和 2-链标准	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	A2992, N14	柠檬酸钠	正常	704	12900	384	576	14564	6.6%
4	BRH745047	柠檬酸钠	正常	1560	5820		192	7572	2.5%
5	BRH745076	柠檬酸钠	正常	5720	12300	382	480	18882	4.6%
6	BRH715026	K2 ED TA	溃疡性结肠炎	N/A	12100	1230	1950	15280	20.8%
7	BRH715027	K2 ED TA	溃疡性结肠炎	N/A	16300	668	1550	18518	12.0%
8	BRH715028	K2 ED TA	溃疡性结肠炎	N/A	6650	504	2250	9404	29.3%
9	BRH715029	K2 ED TA	溃疡性结肠炎	1900	14100	N/A	680	16680	4.1%
10	BRH715030	K2 ED TA	溃疡性结肠炎	N/A	1320	3230	6020	10570	87.3%

[0333] 实施例4:FXIIa和DX2930对正常人血浆(NHP)样品的作用

[0334] 目的:

[0335] 该实验的目的是测定DX-2930对FXIIa接触系统激活的作用。DX2930可抑制血浆激肽释放酶,响应用FXIIa治疗而降低测量的双链与单链比。在FXIIa激活之后,和在样品用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DX-2930预处理时FXIIa激活之后,测试来自五名雄性和五名雌性的柠檬酸钠化的未处理的NHP样品。在非还原和还原条件下分析每个样品组。

[0336] 程序:

[0337] 样品制备

[0338] 1.从冷冻的储存移除NHP样品并且使得其平衡至室温。测试下述雄性NHP样品:BRH745050、BRH745051、BRH745052、BRH745053和BRH745054。测试下述雌性样品:BRH745065, BRH745066, BRH745067, BRH745068和BRH745069。

[0339] 2.通过添加3.35 μL 的DX2930原料(Lot#PURDX1-L01, 32.1mg/mL)至496.65 μL 的1X TBS中,以215 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制备DX2930。

[0340] 3.通过添加5 μL 的FXIIa原料液(25,300nM)至45 μL 的TBS中,制备FXIIa溶液的1:10中间体。通过添加4.45 μL 的1:10中间体至195.55 μL 的TBS中,制备56.25nM FXIIa溶液。

[0341] 4.通过添加2 μL 的215 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DX2930溶液至41 μL 的NHP中,用10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的DX2930制备每个NHP样品。

[0342] 5.通过添加2 μL 的56.25nM FXIIa溶液至43 μL 的每个NHP样品——有和没有DX2930,用2.5nM的FXIIa制备每个NHP样品。

[0343] 6.样品用FXIIa在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育10分钟。通过添加5 μL 的10X抗蛋白酶抑制剂停止反应。

[0344] 7.通过添加5 μL 的样品至95 μL TBS,将每个NHP样品——有FXIIa、有DX2930和FXIIa——和未处理的样品稀释至5%血浆。

[0345] 8.通过添加5 μL 的4X样品缓冲液至15 μL 的样品,制备非还原的样品。

[0346] 9.通过添加5 μL 的4X样品缓冲液和2 μL 的10X还原剂至13 μL 的样品,制备还原的样品。

[0347] 10.所有的样品使用加热板块在95 $^{\circ}\text{C}$ 下加热5分钟。

[0348] 凝胶上样、电泳和转移

[0349] 1.通过添加50ml的20X Tris-乙酸盐SDS电泳缓冲液至950ml的DI水,制备1L体积

的1X Tris-乙酸盐SDS电泳缓冲液。

[0350] 2.通过添加50ml的20X MES SDS电泳缓冲液至950ml的DI水,制备1L体积的1X MES电泳缓冲液。

[0351] 3.通过添加1ml的Tween-20至499ml的Odyssey封闭缓冲液,制备试验缓冲液(具有0.2% Tween的Odyssey封闭缓冲液)。

[0352] 4.通过添加1包装的PBS和1ml的Tween-20至900ml的DI水,制备洗涤缓冲液(具有0.1% Tween的PBS)。充分混合溶液并且使用DI水定容(QS' d)至1L。通过0.22 μ M PES过滤系统过滤终溶液。

[0353] 5.将4 μ L体积的单色蛋白质标记物添加至两个凝胶的泳道1。

[0354] 6.将13 μ L体积的非还原样品添加至7% Tris-乙酸盐凝胶的适当的泳道。

[0355] 7.将13 μ L体积的还原样品添加至4-12% Bis-Tris凝胶的适当的泳道。

[0356] 8.凝胶在125伏特下电泳~75分钟。

[0357] 9.每个凝胶使用iBlot小型-转移堆和iBlot转移系统的程序P0被单独转移至膜。

[0358] 10.将每个膜转移至包含20ml的Odyssey封闭缓冲液的塑料托盘。在Odyssey封闭缓冲液中在板摇床上在室温下孵育膜1小时。

[0359] 11.通过添加28.58 μ L的小鼠抗HMWK mAb,克隆#11H05,1.4mg/mL至29,971.42 μ L的试验缓冲液,制备1 μ g/mL的一次抗体溶液。

[0360] 12.从塑料托盘去除封闭缓冲液。将20ml体积的一次抗体溶液添加至每个托盘并且在板摇床上在室温下孵育膜1小时。

[0361] 13.通过添加5 μ L的山羊抗小鼠IgG IRDye680至45 μ L的试验缓冲液,制备山羊抗小鼠IgG IRDye680的1:10中间体。通过添加26.66 μ L的1:10山羊抗小鼠IgG IRDye680中间体至39,973.34 μ L的试验缓冲液,以1:15,000稀释度制备二次抗体溶液。

[0362] 14.从托盘去除一次抗体溶液。

[0363] 15.每个膜用20ml的洗涤缓冲液洗涤五分钟并且然后丢弃洗液。洗涤重复总共4次洗涤。

[0364] 16.将20ml体积的二次抗体溶液添加至每个托盘并且在板摇床上在室温下孵育膜1小时。

[0365] 17.从托盘去除二次抗体溶液。

[0366] 18.每个膜用20ml的洗涤缓冲液洗涤五分钟并且然后丢弃洗液。洗涤重复总共4次洗涤。

[0367] 19.每个膜用PBS洗提5分钟。

[0368] 20.使用LiCor Odyssey CLx扫描膜。

[0369] 结果:

[0370] 表5和6包含非还原样品数据。表7和8包含还原样品数据。使用两种方法计算切割的HMWK的百分数。使用下述方程式确定泳道中双链的百分数:双链信号的和/总信号的和。使用下述式确定来自未处理信号的双链的百分数:1-(处理的单链信号/未处理的单链信号)。处理的和未处理的样品的制备稍微不同,其中在样品制剂中未处理的样品具有稍微更高百分数的血浆。所以未处理的样品产生比处理的样品稍微更高的总体信号。泳道中双链的百分数值用于确定切割的HMWK的百分数,因为处理的和未处理的样品之间稍微不同样品

制备。

[0371] 表16包含激活和抑制结果的总结。在还原条件下,未处理的雄性和雌性NHP样品分别包含16.1%和9.6%切割的HMWK平均数。用FXIIa处理的雄性和雌性NHP样品分别包含42.0%和43.8%的切割的HMWK的平均数。用DX-2930预处理后用FXIIa处理的雄性和雌性NHP样品分别包含29.5%和26.4%的切割的HMWK的平均数。

[0372] 在非还原条件下,未处理的雄性和雌性NHP样品分别包含32.0%和21.5%的切割的HMWK的平均数。用FXIIa处理的雄性和雌性NHP样品分别包含61.2%和50.2%的切割的HMWK的平均数。用DX-2930预处理后用FXIIa处理的雄性和雌性NHP样品分别包含43.6%和30.3%的切割的HMWK的平均数。

[0373] 结论:

[0374] 用FXIIa处理NHP样品与未处理的样品相比增加切割的HMWK百分数。用DX-2930预处理,随后进行FXIIa激活的NHP样品,比仅仅用FXIIa样品产生更少的切割HMWK,但是与未处理的样品相比,产生稍微更高的切割的HMWK的百分数。还原的未处理的NHP样品比非还原的未处理的NHP样品包含更少的切割的HMWK。也发现未处理的NHP样品,用FXIIa处理的样品,和用DX2930预处理后用FXIIa处理的样品产生可再生的结果。

[0375] 表5.FXIIa激活的非还原的DX2930抑制,雄性样品,单链/双链HMWK信号,总信号,双链HMWK的百分数

通过因子 XIIa 对雄性 NHP 的非还原激活, 用 DX2930 对因子 XIIa 的抑制								
雄性 NHP 样品	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	HMWK 信号			总信号	泳道中的双链%	来自未处理信号的双链%
			单链 (120kDa)	双链 (100 kDa)	双链 (90 kDa)			
BRH745050	0	0	17900	4670	0	22570	20.7%	N/A
BRH745050	2.5	0	8160	7750	1770	17680	53.8%	54.4%
BRH745050	2.5	10	12600	6620	812	20032	37.1%	29.6%
BRH745051	0	0	19600	3450	0	23050	15.0%	N/A
BRH745051	2.5	0	10000	9430	2140	21570	53.6%	49.0%
BRH745051	2.5	10	15300	6480	915	22695	32.6%	21.9%
BRH745052	0	0	22500	8570	1100	32170	30.1%	N/A
BRH745052	2.5	0	11000	10700	3050	24750	55.6%	51.1%
BRH745052	2.5	10	16500	8500	1500	26500	37.7%	26.7%
BRH745053	0	0	6370	13100	7390	26860	76.3%	N/A
BRH745053	2.5	0	1710	8310	10500	20520	91.7%	73.2%
BRH745053	2.5	10	4360	9310	6490	20160	78.4%	31.6%
BRH745054	0	0	27100	5900	0	33000	17.9%	N/A
BRH745054	2.5	0	11500	9880	2270	23650	51.4%	57.6%
BRH745054	2.5	10	15100	6280	814	22194	32.0%	44.3%

[0377] 泳道中的双链%:双链信号的和/总泳道信号的和

[0378] 来自未处理信号的双链%:1-(处理的单链信号/未处理的单链信号)

[0379] 表6.FXIIa激活的非还原的DX2930抑制,雌性样品,单链/双链HMWK信号,总信号,双链HMWK的百分数

通过因子 XIIa 对雌性 NHP 的非还原激活, 通过 DX2930 对因子 XIIa 的抑制

雌性 NHP 样品	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	HMWK 信号			总信号	泳道中的双链%	来自未处理信号的双链%
			单链 (120kDa)	双链 (100 kDa)	双链 (90 kDa)			
BRH745065	0	0	14700	2500	161	17361	15.3%	N/A
BRH745065	2.5	0	4750	5550	3160	13460	64.7%	67.7%
BRH745065	2.5	10	10500	3270	453	14223	26.2%	28.6%
BRH745066	0	0	23200	4460	17.4	27677	16.2%	N/A
BRH745066	2.5	0	14200	10600	1780	26580	46.6%	38.8%
BRH745066	2.5	10	15100	5920	205	21225	28.9%	34.9%
BRH745067	0	0	26000	8610	300	34910	25.5%	N/A
BRH745067	2.5	0	13700	9470	1410	24580	44.3%	47.3%
BRH745067	2.5	10	19800	8880	795	29475	32.8%	23.8%
BRH745068	0	0	25400	9180	211	34791	27.0%	N/A
BRH745068	2.5	0	14200	12500	2610	29310	51.6%	44.1%
BRH745068	2.5	10	15800	7350	708	23858	33.8%	37.8%
BRH745069	0	0	20900	6470	0	27370	23.6%	N/A
BRH745069	2.5	0	17000	11500	1820	30320	43.9%	18.7%
BRH745069	2.5	10	21600	8960	198	30758	29.8%	-3.3%

[0381] 泳道中的双链%:双链信号的和/总泳道信号的和

[0382] 来自未处理信号的双链%:1-(处理的单链信号/未处理的单链信号)

[0383] 表7.减少的FXIIa激活的DX2930抑制,雄性样品,单链/双链HMWK信号,总信号,双链HMWK的百分数

用因子 XIIa 对雄性 NHP 的还原的激活, 用 DX2930 对因子 XIIa 的抑制

雄性 NHP 样品	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	HMWK 信号			总信号	泳道中的双链%	来自未处理信号的双链%
			单链	双链 (56 kDa)	双链 (46 kDa)			
BRH745050	0	0	28300	0	0	28300	0.0%	N/A
BRH745050	2.5	0	14400	3360	2620	20380	29.3%	49.1%
BRH745050	2.5	10	19200	2560	1430	23190	17.2%	32.2%
BRH745051	0	0	26800	0	0	26800	0.0%	N/A
BRH745051	2.5	0	12800	2950	2580	18330	30.2%	52.2%
BRH745051	2.5	10	13900	2100	1210	17210	19.2%	48.1%
BRH745052	0	0	17800	853	1500	20153	11.7%	N/A
BRH745052	2.5	0	12100	2980	3250	18330	34.0%	32.0%
BRH745052	2.5	10	16900	2790	2190	21880	22.8%	5.1%
BRH745053	0	0	7280	4340	8430	20050	63.7%	N/A
BRH745053	2.5	0	3180	5620	9240	18040	82.4%	56.3%
BRH745053	2.5	10	6420	5470	6660	18550	65.4%	11.8%
BRH745054	0	0	22100	625	586	23311	5.2%	N/A
BRH745054	2.5	0	9610	2660	2020	14290	32.8%	56.5%
BRH745054	2.5	10	12500	2010	1300	15810	20.9%	43.4%

[0385] 泳道中的双链%:双链信号的和/总泳道信号的和

[0386] 来自未处理信号的双链%:1-(处理的单链信号/未处理的单链信号)

[0387] 表8.减少的FXIIa激活的DX2930抑制,雌性样品,单链/双链HMWK信号,总信号,双

链HMWK的百分数

用因子 XIIa 对雌性 NHP 的还原激活, 用 DX2930 对因子 XIIa 的抑制

雌性 NHP 样品	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	HMWK 信号			总信号	泳道中的双链%	来自未处理信号的双链%
			单链	双链 (56 kDa)	双链 (46 kDa)			
BRH745065	0	0	17300	2080	1240	20620	16.1%	N/A
BRH745065	2.5	0	4100	4880	3450	12430	67.0%	76.3%
BRH745065	2.5	10	9770	3740	1960	15470	36.8%	43.5%
BRH745066	0	0	21300	1770	753	23823	10.6%	N/A
BRH745066	2.5	0	9710	4280	2760	16750	42.0%	54.4%
BRH745066	2.5	10	13600	3990	1780	19370	29.8%	36.2%
BRH745067	0	0	21900	375	1850	24125	9.2%	N/A
BRH745067	2.5	0	11900	5120	3430	20450	41.8%	45.7%
BRH745067	2.5	10	19000	3610	2440	25050	24.2%	13.2%
BRH745068	0	0	29400	525	966	30891	4.8%	N/A
BRH745068	2.5	0	19600	5660	5130	30390	35.5%	33.3%
BRH745068	2.5	10	25100	4050	3260	32410	22.6%	14.6%
BRH745069	0	0	19900	500	688	21088	5.6%	N/A
BRH745069	2.5	0	12000	2910	2560	17470	31.3%	39.7%
BRH745069	2.5	10	15000	1790	1350	18140	17.3%	24.6%

[0388]

[0389]

泳道中的双链%:双链信号的和/总泳道信号的和

[0390]

来自未处理信号的双链%:1-(处理的单链信号/未处理的单链信号)

[0391]

表9.泳道中双链的平均百分数,还原值和非还原值

泳道中双链的平均百分数

样品	XIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	还原的	非还原的
雄性平均数	0	0	16.1%	32.0%
	2.5	0	42.0%	61.2%
	2.5	10	29.5%	43.6%
雌性平均数	0	0	9.6%	21.5%
	2.5	0	43.8%	50.2%
	2.5	10	26.4%	30.3%

[0392]

[0393]

实施例6.使用DX-2930和DX-88对FXIIa激活的抑制

[0394]

目的:

[0395]

该实验的目的是测定DX-2930和DX-88对抑制FXIIa激活的效力。以5个浓度测试DX-2930:200、100、30、12和5µg/mL。以5个浓度测试DX-88:9.4、4.7、1.4、0.56和0.24µg/mL。用FXIIa处理通过DX-2930和DX-88预处理的样品。除了预处理的样品之外,测试一个未处理的样品和两个仅仅用FXIIa处理的样品。在还原条件下测试样品。

[0396]

程序:

[0397]

1.通过添加250µL的每个血浆样品BRH745070、BRH745071和BRH745048至1.5mL微离心管并且充分混合,制备NHP库(pool)。

[0398]

2.通过添加4.21µL的DX2930原料液(32.1mg/mL)至25.79µL的TBS,制备4500µg/mL DX2930溶液。通过添加15µL的4500µg/mL溶液至15µL的TBS制备2250µg/mL DX2930溶液。通

过添加6 μ L的2250 μ g/mL溶液至14 μ L的TBS,制备675 μ g/mL DX2930溶液。通过添加8 μ L的675 μ g/mL溶液至12 μ L的TBS,制备270 μ g/mL DX2930溶液。通过添加10 μ L的270 μ g/mL溶液至14 μ L的TBS,制备112.5 μ g/mL DX2930溶液。

[0399] 3.通过添加2 μ L的每种DX2930溶液至41 μ L的NHP库,制备用DX-2930预处理的五种血浆样品。

[0400] 4.通过添加6.28 μ L的DX88原料液(10.1mg/mL)至293.72 μ L的TBS,制备211.5 μ g/mL DX88溶液。通过添加15 μ L的211.5 μ g/mL溶液至15 μ L的TBS,制备105.75 μ g/mL DX88溶液。通过添加8.94 μ L的105.75 μ g/mL溶液至21.06 μ L的TBS,制备31.5 μ g/mL DX88溶液。通过添加12 μ L的31.5 μ g/mL溶液至18 μ L的TBS,制备12.6 μ g/mL DX88溶液。通过添加12.86 μ L的12.6 μ g/mL至17.14 μ L的TBS,制备5.4 μ g/mL DX88溶液。

[0401] 5.通过添加2 μ L的每种DX-88溶液至41 μ L的NHP库,制备用DX-88预处理的五种血浆样品。

[0402] 6.通过添加5 μ L的the原料液(25,300nM)至45 μ L的TBS,制备FXIIa的1:10中间体。通过添加4.45 μ L的1:10中间体至195.55 μ L的TBS,制备56.25nM FXIIa溶液。

[0403] 7.通过添加2 μ L的56.25nM FXIIa溶液至每个样品,用2.5nM的FXIIa处理通过DX2930和DX88预处理的每个血浆样品。

[0404] 8.通过添加2 μ L的TBS和2 μ L的56.25nM FXIIa溶液至41 μ L的NHP库,制备仅仅包含FXIIa的两个样品。

[0405] 9.通过添加4 μ L的TBS至41 μ L的NHP库,制备一个未处理的样品。

[0406] 10.所有包含FXIIa的样品在37 $^{\circ}$ C下孵育10分钟。

[0407] 11.将5 μ L体积的抗蛋白酶抑制剂添加至每个包括未处理的样品的样品。每个重复的总样品体积是50 μ L。

[0408] 12.通过添加5 μ L的样品至95 μ L TBS,将每个样品稀释至~5%血浆。

[0409] 13.通过添加5 μ L的4X样品缓冲液和2 μ L的10X还原剂至13 μ L的样品,制备样品。

[0410] 14.所有的样品使用加热板块在95 $^{\circ}$ C下加热5分钟。

[0411] 15.通过添加50ml的20X MES SDS电泳缓冲液至950ml的DI水,制备1L体积的1X MES电泳缓冲液。

[0412] 16.通过添加1ml的Tween-20至499ml的Odyssey封闭缓冲液,制备试验缓冲液(具有0.2%Tween的Odyssey封闭缓冲液)。

[0413] 17.通过添加1包装的PBS和1ml的Tween-20至900ml的DI水,制备洗涤缓冲液(具有0.1%Tween的PBS)。充分混合溶液并且使用DI水定容至1L。通过0.22 μ M PES过滤系统过滤终溶液。

[0414] 18.将4 μ L体积的单色蛋白质标记物添加至两个凝胶的泳道1。

[0415] 19.将13 μ L体积的还原样品添加至4-12%Bis-Tris凝胶的适当的泳道。

[0416] 20.凝胶在125伏特下电泳~75分钟。

[0417] 21.使用iBlot小型-转移堆和iBlot转移系统的程序P0将凝胶转移至膜。

[0418] 22.将膜转移至包含20ml的Odyssey封闭缓冲液的塑料托盘。在Odyssey封闭缓冲液中板摇床上在室温下孵育膜1小时。

[0419] 23.通过添加14.29 μ L的小鼠抗HMWK mAb,克隆#11H05,1.4mg/mL至19,985.7 μ L的

试验缓冲液,制备1 μ g/mL的一次抗体溶液。

[0420] 24.从塑料托盘去除封闭缓冲液。将20ml体积的一次抗体溶液添加至膜并且在板摇床上在室温下孵育1小时。

[0421] 25.通过添加5 μ L的山羊抗小鼠IgG IRDye680至45 μ L的试验缓冲液,制备山羊抗小鼠IgG IRDye680的1:10中间体。通过添加13.33 μ L的1:10山羊抗小鼠IgG IRDye680中间体至19,986.7 μ L的试验缓冲液,以1:15,000稀释度制备二次抗体溶液。

[0422] 26.从托盘去除一次抗体溶液。

[0423] 27.用20ml的洗涤缓冲液洗涤膜五分钟并且然后丢弃洗液。洗涤重复总共4次洗涤。

[0424] 28.将20ml体积的二次抗体溶液添加至膜并且在板摇床上在室温下孵育1小时。

[0425] 29.从托盘去除二次抗体溶液。

[0426] 30.用20ml的洗涤缓冲液洗涤膜五分钟并且然后丢弃洗液。洗涤重复总共4次洗涤。

[0427] 31.用PBS洗涤膜5分钟。

[0428] 32.使用LiCor Odyssey CLx扫描膜。

[0429] 结果:

[0430] 表10包含DX-2930和DX-88抑制实验的结果。计算每个泳道中的双链的百分数,并且通过比较处理的信号与未处理的信号计算。为了该比较,使用泳道中双链的百分数。未处理的NHP库产生的双链百分数值为3.8%。当NHP库仅仅用FXIIa处理时,两个重复样品产生的双链百分数值为24.4%。相比用DX-88制备的样品,用DX-2930预处理的样品产生稍微更低的双链百分数值。用5 μ g/mL的DX-2930和0.24 μ g/mL的DX-88预处理的样品产生的双链百分数值分别为22.3%和23.9%。这些值与仅仅用FXIIa处理的样品中双链百分数非常接近。

[0431] 结论:

[0432] 用DX-2930预处理的样品产生比用DX-88预处理的样品稍微更低的双链百分数值。

[0433] 表10. 使用DX-2930和DX-88对FXIIa的抑制, HMWK信号, 双链HMWK的百分数

使用DX-88和DX-2930抑制FXIIa接触激活								
FXIIa (nM)	DX2930 (μ g/mL)	DX88 (μ g/mL)	单链 (110 kDa)	HMWK 双链 (56 kDa)	双链 (46 kDa)	总信号	泳道中 的双链%	来自未处理信 号的双链%
0.00	0.00	0.00	26600	413	643	27656	3.8%	N/A
2.50	0.00	0.00	20900	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	22900	349	592	23441	4.0%	15.4%
2.50	0.00	1.40	21900	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%

[0435] 双链泳道%: 双链信号的和/总泳道信号的和

- [0436] 来自未处理信号的双链%:1- (处理的单链信号/未处理的单链信号)
- [0437] 实施例7. 测定HAE、RA、UC和CD患者样品中切割的激肽原的水平
- [0438] 目的:
- [0439] 该实验的目的是评估来自患遗传性血管性水肿 (HAE) 的患者的抗蛋白酶处理的血浆样品。从每个患者测试两个HAE样品——一个基础样品和一个发作样品。在还原和非还原条件下测试样品。另外,测试来自被诊断患克罗恩病、类风湿性关节炎和溃疡性结肠炎的患者的样品。也测试正常人血浆样品。仅仅在还原条件下测试另外的样品。
- [0440] 程序:
- [0441] 1. 测试六组HAE患者样品。通过添加5 μ L的样品至95 μ L的TBS,制备每个血浆样品。
- [0442] 2. 测试五个克罗恩病血浆样品,五个类风湿性关节炎血浆样品和五个溃疡性结肠炎样品。通过添加5 μ L的样品至95 μ L的TBS,制备每个血浆样品。
- [0443] 3. 通过添加5 μ L的样品至95 μ L的TBS,制备七个正常人血浆样品用作对照。
- [0444] 4. 通过添加5 μ L的4X样品缓冲液至15 μ L的样品,制备非还原样品。
- [0445] 5. 通过添加5 μ L的4X样品缓冲液和2 μ L的10X还原剂至13 μ L的样品,制备还原样品。
- [0446] 6. 使用加热板块,在95 $^{\circ}$ C下加热所有的样品5分钟。
- [0447] 7. 通过添加50ml的20X Tris-乙酸盐SDS电泳缓冲液至950ml的DI水,制备1L体积的1X Tris-乙酸盐SDS电泳缓冲液。
- [0448] 8. 通过添加100ml的20X MES SDS电泳缓冲液至1900ml的DI水,制备2L体积的1X MES电泳缓冲液。
- [0449] 9. 通过添加2ml的Tween-20至998ml的Odyssey封闭缓冲液,制备试验缓冲液 (具有0.2% Tween的Odyssey封闭缓冲液)。
- [0450] 10. 通过添加1包装的PBS和1ml的Tween-20至900ml的DI水,制备洗涤缓冲液 (具有0.1% Tween的PBS)。充分混合溶液并且使用DI水定容至1L。通过0.22 μ M PES过滤系统过滤终溶液。
- [0451] 11. 将4 μ L体积的单色蛋白质标记物添加至四个凝胶的泳道1。
- [0452] 12. 将13 μ L体积的非还原样品添加至7% Tris-乙酸盐凝胶的适当的泳道。
- [0453] 13. 将13 μ L体积的还原样品添加至4-12% Bis-Tris凝胶的适当的泳道。
- [0454] 14. 凝胶在125伏特下电泳~75分钟。
- [0455] 15. 使用iBlot小型-转移堆和iBlot转移系统上的程序P0将每个凝胶单独转移至膜。
- [0456] 16. 将每个膜转移至包含20ml的Odyssey封闭缓冲液的塑料托盘。在Odyssey封闭缓冲液中在板摇床上在室温下孵育膜1小时。
- [0457] 17. 通过添加57.14 μ L的小鼠抗HMWK mAb,克隆#11H05,1.4mg/mL至79,942.86 μ L的试验缓冲液,制备1 μ g/mL一次抗体溶液。
- [0458] 18. 从塑料托盘去除封闭缓冲液。将20ml体积的一次抗体溶液添加至每个托盘并且在板摇床上在室温下孵育膜1小时。
- [0459] 19. 通过添加10 μ L的山羊抗小鼠IgG IRDye680至90 μ L的试验缓冲液,制备山羊抗小鼠IgG IRDye680的1:10中间体。通过添加53.33 μ L的1:10山羊抗小鼠IgG IRDye680中间体至79,946.67 μ L的试验缓冲液,以1:15,000稀释度制备二次抗体溶液。

- [0460] 20.从托盘去除一次抗体溶液。
- [0461] 21.每个膜用20ml的洗涤缓冲液洗涤五分钟并且然后丢弃洗液。洗涤重复总共4次洗涤。
- [0462] 22.20ml体积的二次抗体溶液添加至每个托盘并且在板摇床上在室温下孵育膜1小时。
- [0463] 23.从托盘去除二次抗体溶液。
- [0464] 24.每个膜用20ml的洗涤缓冲液洗涤五分钟并且然后丢弃洗液。洗涤重复总共4次洗涤。
- [0465] 25.每个膜用PBS洗涤5分钟。
- [0466] 26.使用LiCor Odyssey CLx扫描膜。
- [0467] 结果:
- [0468] 如预期的,与在基础样品中相反,大部分患者样品在发作样品中展示升高水平的双链HMWK。表11和12包含该实验的HAE数据。表13包含溃疡性结肠炎和类风湿性关节炎患者样品的数据组。表14包含克罗恩病患者样品的数据。
- [0469] 表11.非还原HAE患者样品,基础和发作, HMWK信号,泳道中双链的百分数

[0470]

非还原的抗蛋白酶HAE患者样品,基础和发作							
患者ID	患者缩写	HAE	HMWK 信号			总信号	泳道中的双链%
			120 kDa	100 kDa	90 kDa		
A3009	N18	正常	15500	3750	N/A	19250	19.5%
A4970	AC	基础	13000	4300	240	17540	25.9%
A4908	AC	发作	9450	5910	1740	17100	44.7%
A5564	BB	基础	15900	5650	585	22135	28.2%
A5353	BB	发作	11600	10500	2340	24440	52.5%
A4607	FF	基础	11400	4850	N/A	16250	29.8%
A4619	FF	发作	6770	6750	2090	15610	56.6%
A5346	DG	基础	10800	3850	102	14752	26.8%
A5422	DG	发作	5650	2080	133	7863	28.1%
A4183	PC	基础	9530	1190	N/A	10720	11.1%
A4671	PC	发作	8840	1570	N/A	10410	15.1%
A5248	GR	基础	14300	4270	44.1	18614.1	23.2%
A2315	GR	发作	11600	4610	490	16700	30.5%

[0471] 泳道中的双链%:双链信号的和/总泳道信号的和

[0472] 表12.还原的HAE患者样品,基础和发作, HMWK信号,泳道中双链的百分数

[0473]

还原的抗蛋白酶HAE患者样品，基础和发作							
患者ID	患者缩写	HAE	HMWK 信号			总信号	泳道中的双链%
			110 kDa	56 kDa	46 kDa		
A3009	N18	正常	18700	802	926	20428	8.5%
A4970	AC	基础	14500	2980	1480	18960	23.5%
A4908	AC	发作	8500	3540	2670	14710	42.2%
A5564	BB	基础	12400	3160	1380	16940	26.8%
A5353	BB	发作	8980	3980	2620	15580	42.4%
A4607	FF	基础	10900	2490	1620	15010	27.4%
A4619	FF	发作	6130	3930	2520	12580	51.3%
A5346	DG	基础	11200	2400	709	14309	21.7%
A5422	DG	发作	7900	2640	749	11289	30.0%
A4183	PC	基础	13900	1850	572	16322	14.8%
A4671	PC	发作	13500	2120	572	16192	16.6%
A5248	GR	基础	19000	2120	1160	22280	14.7%
A2315	GR	发作	16400	3660	1580	21640	24.2%

[0474] 泳道中的双链%：双链信号的和/总泳道信号的和

[0475] 表13. 来自患溃疡性结肠炎和类风湿性关节炎的个体的血浆样品，HMWK信号，泳道中双链的百分数

[0476]

K2EDTA 和柠檬酸钠中还原的患病状态样品，溃疡性结肠炎和类风湿性关节炎							
样品	抗凝剂	疾病	HMWK 信号			总信号	泳道中的双链%
			单链 (110 kDa)	双链 (56 kDa)	双链 (46 kDa)		
A3005, N17	抗蛋白酶	正常	20500	775	366	21641	5.3%
BRH745075	柠檬酸钠	正常	18700	1340	802	20842	10.3%
BRH745056	柠檬酸钠	正常	24200	893	782	25875	6.5%
BRH715036	K2EDTA	溃疡性结肠炎	17400	3030	1340	21770	20.1%
BRH715037	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	17400	1220	694	19314	9.9%
BRH715038	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	N/A	2140	10300	12440	100.0%
BRH715039	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	14100	1700	596	16396	14.0%
BRH715040	柠檬酸钠	溃疡性结肠炎	13300	1170	2070	16540	19.6%
BRH715041	K2EDTA	类风湿性关节炎	N/A	N/A	4950	4950	100.0%
BRH715042	K2EDTA	类风湿性关节炎	88	N/A	9250	9338	99.1%
BRH715043	K2EDTA	类风湿性关节炎	N/A	N/A	6900	6900	100.0%
BRH715044	柠檬酸钠	类风湿性关节炎	N/A	N/A	2850	2850	100.0%
BRH715045	柠檬酸钠	类风湿性关节炎	6600	1860	1520	9980	33.9%

[0477] 泳道中的双链%：双链信号的和/总泳道信号的和

[0478] 表14. 来自患克罗恩病的个体的血浆样品，HMWK信号，泳道中双链的百分数

K2EDTA 和柠檬酸钠中还原的患病状态样品，克罗恩病和牛皮癣								
样品	抗凝剂	疾病	HMWK 信号				总信号	泳道中的双链%
			单链 (150 kDa)	单链 (110 kDa)	双链 (56 kDa)	双链 (46 kDa)		
A2992, N14	柠檬酸钠	正常	704	12900	384	576	14564	6.6%
BRH745047	柠檬酸钠	正常	1560	5820	N/A	192	7572	2.5%
BRH745076	柠檬酸钠	正常	5720	12300	382	480	18882	4.6%
BRH715026	K2EDTA	克罗恩病	N/A	12100	1230	1950	15280	20.8%
BRH715027	K2EDTA	克罗恩病	N/A	16300	668	1550	18518	12.0%
BRH715028	K2EDTA	克罗恩病	N/A	6650	504	2250	9404	29.3%
BRH715029	K2EDTA	克罗恩病	1900	14100	N/A	680	16680	4.1%
BRH715030	K2EDTA	克罗恩病	N/A	1320	3230	6020	10570	87.5%

[0480] 泳道中的双链%：双链信号的和/总泳道信号的和/其他实施方式

[0481] 本说明书中公开的所有特征可以任何组合结合。本说明书中公开的每个特征可通过服务于相同、等同或类似的目的的可选特征替换。因此，除非另外明确指出，公开的每个特征仅仅是一系列等同物或类似特征的例子。

[0482] 从上面的说明书，本领域技术人员可容易知道本发明的本质特征，并且在不背离其精神和范围的情况下，可对本发明作出各种改变和修饰，以使其适合各种用途和条件。因此，其他实施方式也在权利要求范围内。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 戴埃克斯有限公司
 [0003] D·J·塞克斯顿
 [0004] R·福塞特
 [0005] J·A·肯尼斯顿
 [0006] G·康利
 [0007] A·尼克森
 [0008] C·汤乎尔
 [0009] B·阿德尔曼
 [0010] Y·群
 [0011] <120> 缓激肽介导的病症的评估和治疗
 [0012] <130> D0617.70063W000
 [0013] <140> TBD
 [0014] <141> 2014-01-17
 [0015] <150> US 61/754,607
 [0016] <151> 2013-01-20
 [0017] <160> 9
 [0018] <170> PatentIn版本3.5
 [0019] <210> 1
 [0020] <211> 644
 [0021] <212> PRT
 [0022] <213> 智人
 [0023] <400> 1
 [0024] Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser
 [0025] 1 5 10 15
 [0026] Leu Thr Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp
 [0027] 20 25 30
 [0028] Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn
 [0029] 35 40 45
 [0030] Gln Ser Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys
 [0031] 50 55 60
 [0032] Thr Val Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu
 [0033] 65 70 75 80
 [0034] Gly Asp Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr
 [0035] 85 90 95
 [0036] Lys Asp Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly
 [0037] 100 105 110
 [0038] Lys Arg Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile

[0039]	115	120	125
[0040]	Thr Pro Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly		
[0041]	130	135	140
[0042]	Cys Val His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu		
[0043]	145	150	155
[0044]	Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu		
[0045]	165	170	175
[0046]	Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly		
[0047]	180	185	190
[0048]	Leu Asn Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys		
[0049]	195	200	205
[0050]	Glu Asn Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly		
[0051]	210	215	220
[0052]	Asp Thr Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg		
[0053]	225	230	235
[0054]	Ile Ala Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe		
[0055]	245	250	255
[0056]	Val Gln Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro		
[0057]	260	265	270
[0058]	Thr Asn Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys		
[0059]	275	280	285
[0060]	Leu Asn Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val		
[0061]	290	295	300
[0062]	Lys Lys Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp		
[0063]	305	310	315
[0064]	Phe Val Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu		
[0065]	325	330	335
[0066]	Thr Glu Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn		
[0067]	340	345	350
[0068]	Ala Glu Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val		
[0069]	355	360	365
[0070]	Asn Cys Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys Arg Pro Pro Gly		
[0071]	370	375	380
[0072]	Phe Ser Pro Phe Arg Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr		
[0073]	385	390	395
[0074]	Thr Val Ser Pro Pro His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu		
[0075]	405	410	415
[0076]	Arg Asp Ser Gly Lys Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly		
[0077]	420	425	430

[0078]	His Glu Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu
[0079]	435 440 445
[0080]	Arg Asp Gln Gly His Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly
[0081]	450 455 460
[0082]	His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp
[0083]	465 470 475 480
[0084]	Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys
[0085]	485 490 495
[0086]	His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys
[0087]	500 505 510
[0088]	Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser
[0089]	515 520 525
[0090]	Glu Asp Ser Thr Thr Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly
[0091]	530 535 540
[0092]	Pro Thr Pro Ile Pro Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe
[0093]	545 550 555 560
[0094]	Ser Asp Phe Gln Asp Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile
[0095]	565 570 575
[0096]	Ser Pro Ala Pro Ile Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln
[0097]	580 585 590
[0098]	Ile Asp Pro Asn Gly Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp
[0099]	595 600 605
[0100]	Thr Thr Ser Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu
[0101]	610 615 620
[0102]	Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr
[0103]	625 630 635 640
[0104]	Asp Gly Leu Ser
[0105]	<210> 2
[0106]	<211> 362
[0107]	<212> PRT
[0108]	<213> 智人
[0109]	<400> 2
[0110]	Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp Leu Phe
[0111]	1 5 10 15
[0112]	Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn Gln Ser
[0113]	20 25 30
[0114]	Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys Thr Val
[0115]	35 40 45
[0116]	Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu Gly Asp

[0117]	50	55	60
[0118]	Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr Lys Asp		
[0119]	65	70	75 80
[0120]	Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly Lys Arg		
[0121]	85	90	95
[0122]	Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile Thr Pro		
[0123]	100	105	110
[0124]	Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly Cys Val		
[0125]	115	120	125
[0126]	His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu Arg His		
[0127]	130	135	140
[0128]	Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu Phe Met		
[0129]	145	150	155 160
[0130]	Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly Leu Asn		
[0131]	165	170	175
[0132]	Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys Glu Asn		
[0133]	180	185	190
[0134]	Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly Asp Thr		
[0135]	195	200	205
[0136]	Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg Ile Ala		
[0137]	210	215	220
[0138]	Ser Phe Ser Gln Asn Cys Asp Ile Tyr Pro Gly Lys Asp Phe Val Gln		
[0139]	225	230	235 240
[0140]	Pro Pro Thr Lys Ile Cys Val Gly Cys Pro Arg Asp Ile Pro Thr Asn		
[0141]	245	250	255
[0142]	Ser Pro Glu Leu Glu Glu Thr Leu Thr His Thr Ile Thr Lys Leu Asn		
[0143]	260	265	270
[0144]	Ala Glu Asn Asn Ala Thr Phe Tyr Phe Lys Ile Asp Asn Val Lys Lys		
[0145]	275	280	285
[0146]	Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Val		
[0147]	290	295	300
[0148]	Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu Thr Glu		
[0149]	305	310	315 320
[0150]	Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn Ala Glu		
[0151]	325	330	335
[0152]	Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys		
[0153]	340	345	350
[0154]	Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys		
[0155]	355	360	

[0195] <212> PRT
 [0196] <213> 人工序列
 [0197] <220>
 [0198] <223> 合成多肽
 [0199] <400> 4
 [0200] Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys
 [0201] 1 5 10 15
 [0202] Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu
 [0203] 20 25 30
 [0204] Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys
 [0205] 35 40 45
 [0206] Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
 [0207] 50 55 60
 [0208] Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
 [0209] 65 70 75 80
 [0210] Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser
 [0211] 85 90 95
 [0212] Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
 [0213] 100 105 110
 [0214] Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
 [0215] 115 120 125
 [0216] Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
 [0217] 130 135 140
 [0218] Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly
 [0219] 145 150 155 160
 [0220] Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
 [0221] 165 170 175
 [0222] Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
 [0223] 180 185 190
 [0224] Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
 [0225] 195 200 205
 [0226] Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly
 [0227] 210 215 220
 [0228] Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly
 [0229] 225 230 235 240
 [0230] Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn
 [0231] 245 250 255
 [0232] Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile
 [0233] 260 265 270

[0234]	Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys
[0235]	275 280 285
[0236]	Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met
[0237]	290 295 300
[0238]	<210> 5
[0239]	<211> 58
[0240]	<212> PRT
[0241]	<213> 人工序列
[0242]	<220>
[0243]	<223> 合成多肽
[0244]	<400> 5
[0245]	Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
[0246]	1 5 10 15
[0247]	Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
[0248]	20 25 30
[0249]	Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
[0250]	35 40 45
[0251]	Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
[0252]	50 55
[0253]	<210> 6
[0254]	<211> 122
[0255]	<212> PRT
[0256]	<213> 人工序列
[0257]	<220>
[0258]	<223> 合成多肽
[0259]	<400> 6
[0260]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0261]	1 5 10 15
[0262]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
[0263]	20 25 30
[0264]	Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0265]	35 40 45
[0266]	Ser Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
[0267]	50 55 60
[0268]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0269]	65 70 75 80
[0270]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0271]	85 90 95
[0272]	Ala Tyr Arg Arg Ile Gly Val Pro Arg Arg Asp Glu Phe Asp Ile Trp

[0273]	100	105	110
[0274]	Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
[0275]	115	120	
[0276]	<210> 7		
[0277]	<211> 105		
[0278]	<212> PRT		
[0279]	<213> 人工序列		
[0280]	<220>		
[0281]	<223> 合成多肽		
[0282]	<400> 7		
[0283]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0284]	1 5 10 15		
[0285]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp		
[0286]	20 25 30		
[0287]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
[0288]	35 40 45		
[0289]	Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0290]	50 55 60		
[0291]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0292]	65 70 75 80		
[0293]	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Thr Tyr Trp Thr		
[0294]	85 90 95		
[0295]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile		
[0296]	100 105		
[0297]	<210> 8		
[0298]	<211> 60		
[0299]	<212> PRT		
[0300]	<213> 人工序列		
[0301]	<220>		
[0302]	<223> 合成多肽		
[0303]	<400> 8		
[0304]	Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys		
[0305]	1 5 10 15		
[0306]	Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys		
[0307]	20 25 30		
[0308]	Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu		
[0309]	35 40 45		
[0310]	Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp		
[0311]	50 55 60		

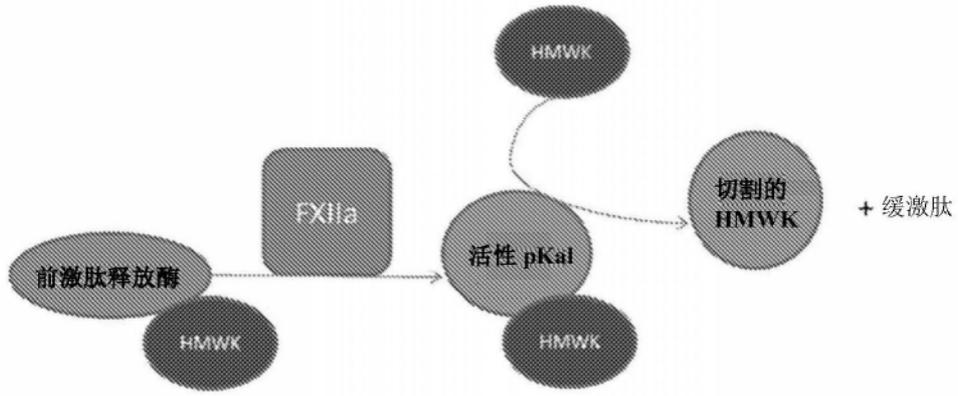


图1

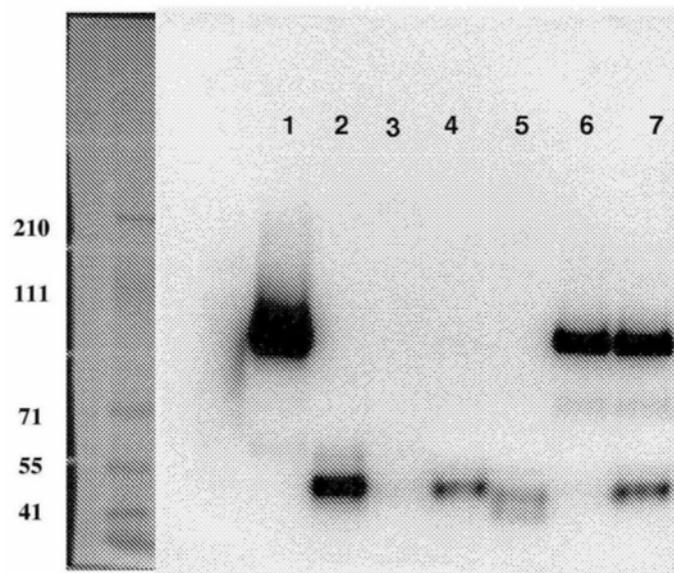


图2

在 HAE 患者抗蛋白酶样品中通过蛋白质印迹量化完整的 1 链激肽原

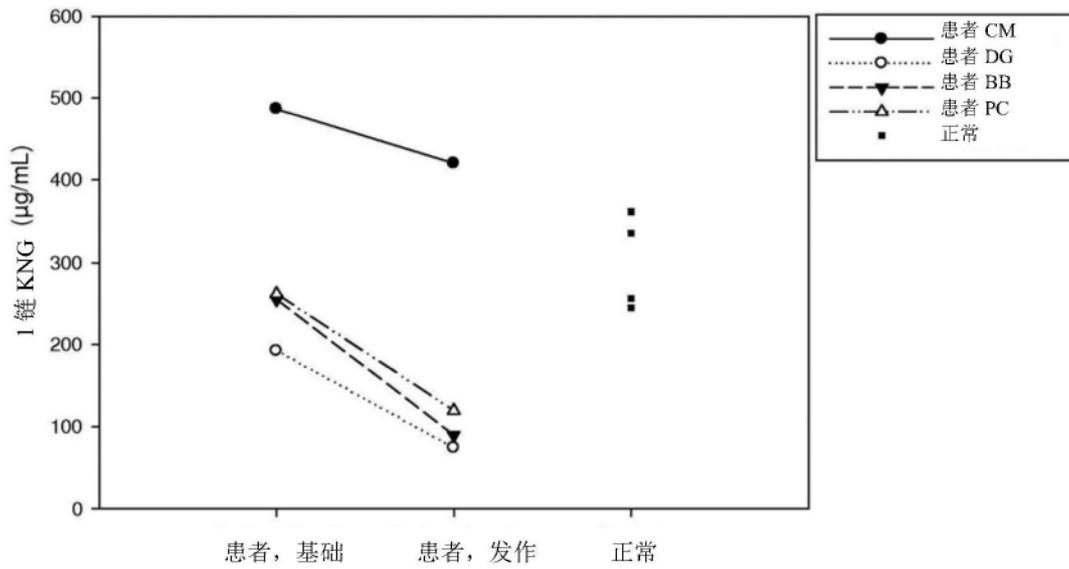


图3

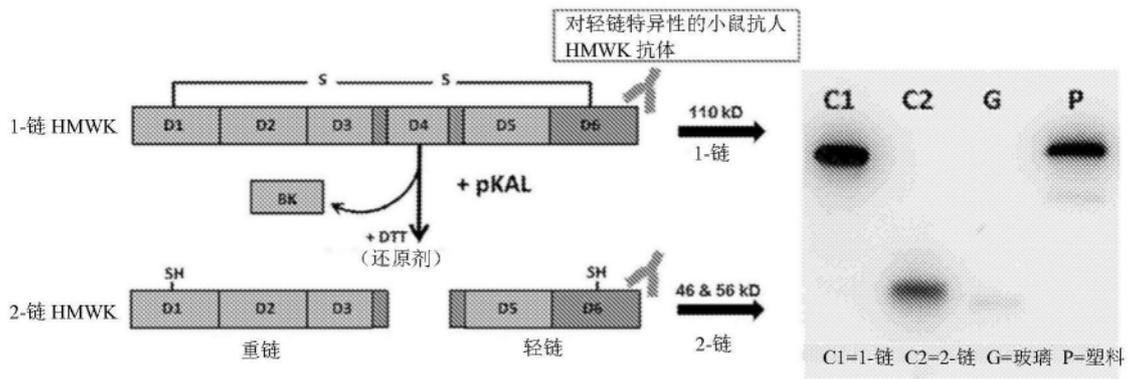


图4

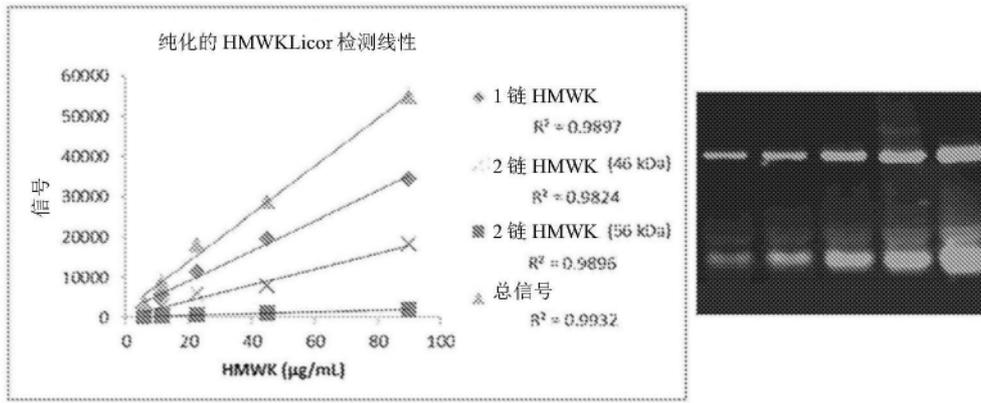


图5

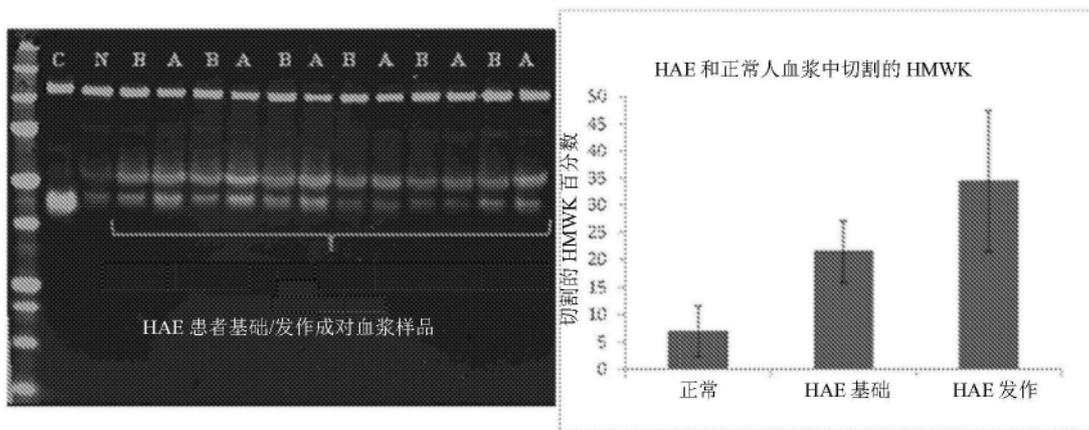


图6

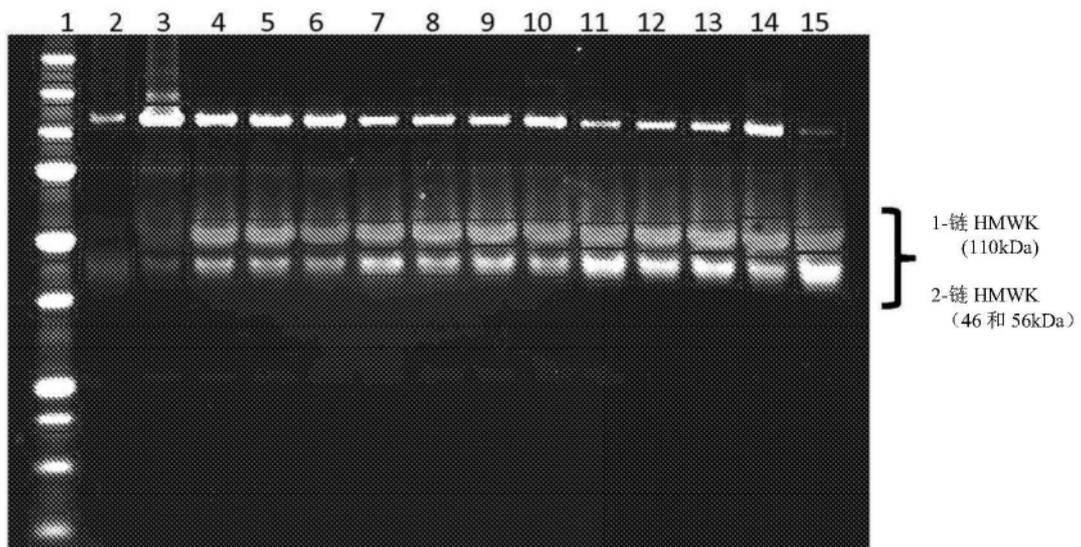


图7A

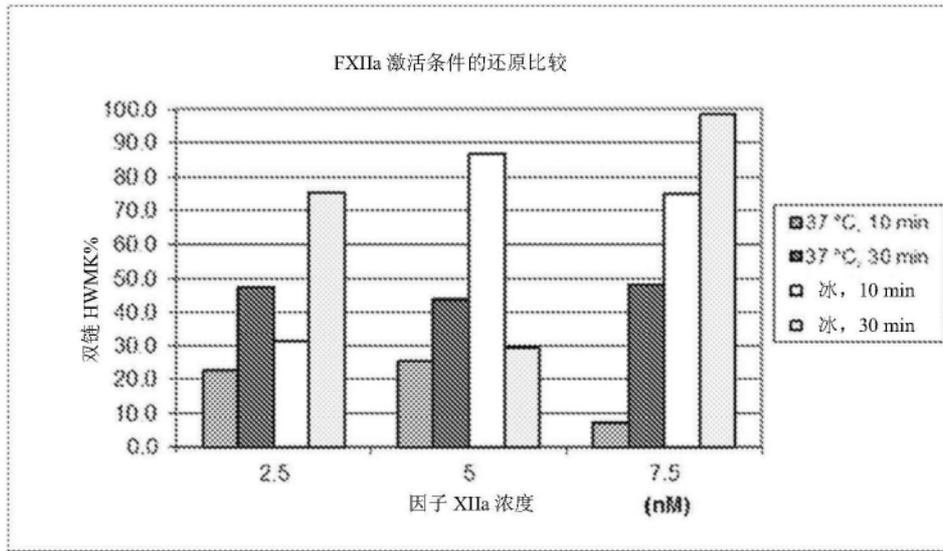


图7B

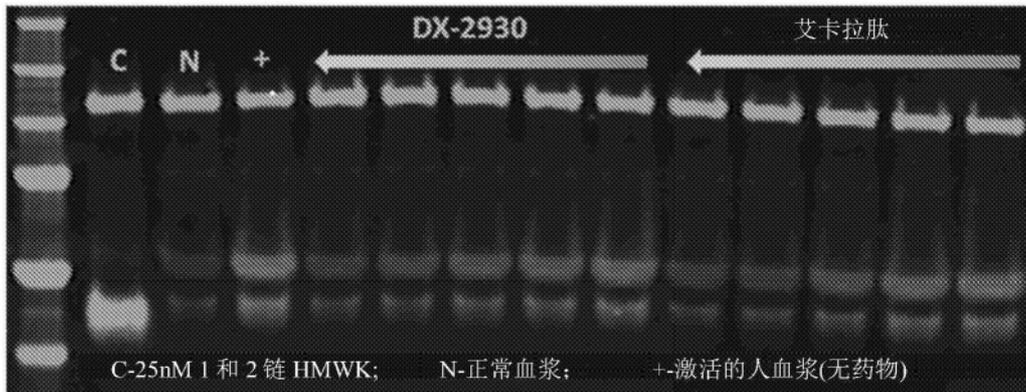


图8A

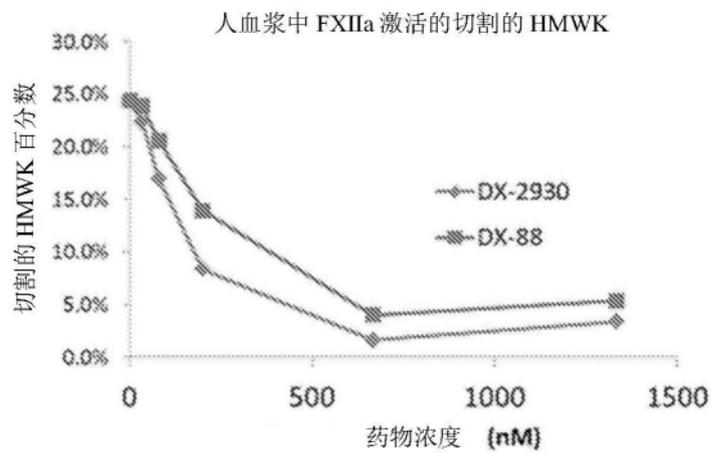


图8B

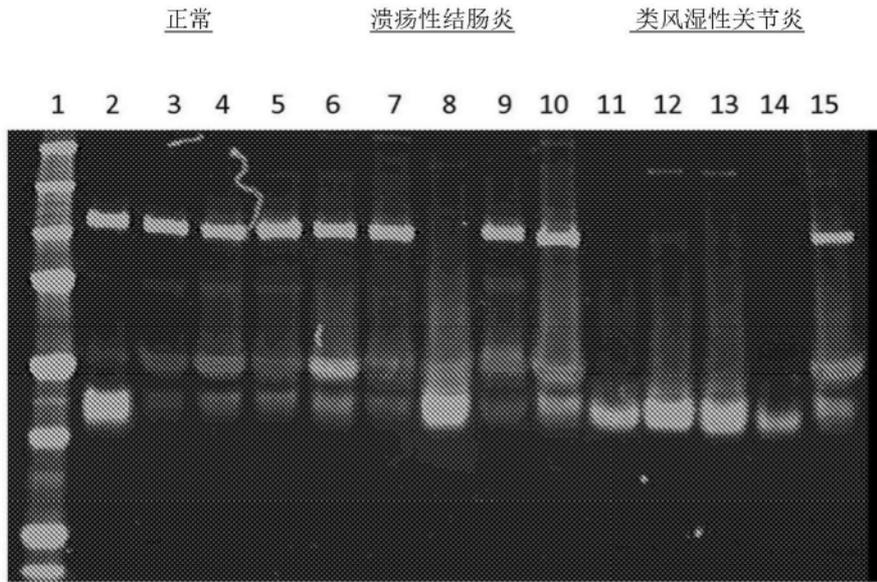


图9

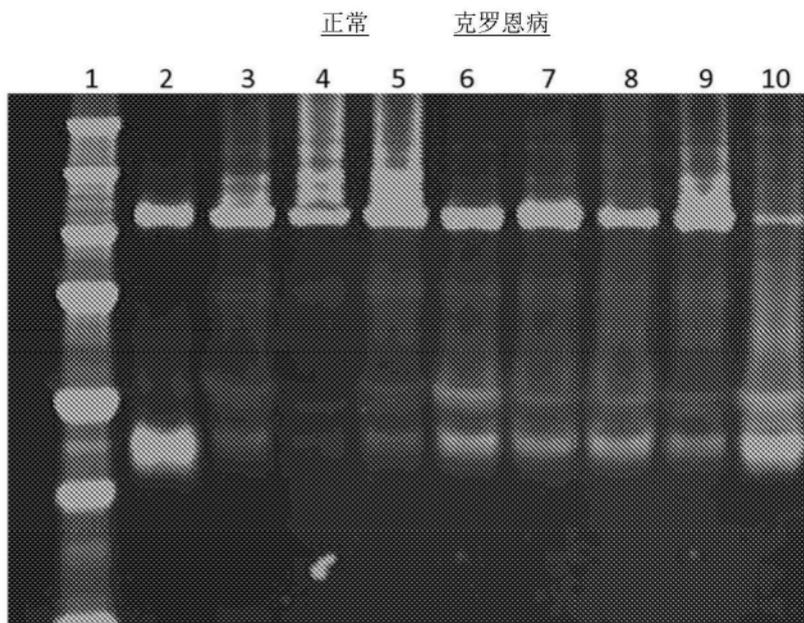


图10