



공개특허 10-2025-0066486



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0066486
(43) 공개일자 2025년05월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/37 (2006.01) *C07K 14/755* (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01) *C12Q 1/56* (2006.01)
G01N 33/573 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/37 (2013.01)
C07K 14/755 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2025-7014548(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년10월17일
심사청구일자 2025년04월30일
- (62) 원출원 특허 10-2023-7012295
원출원일자(국제) 2014년10월17일
심사청구일자 2023년05월10일
- (85) 번역문제출일자 2025년04월30일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/061247
- (87) 국제공개번호 WO 2015/061183
국제공개일자 2015년04월30일
- (30) 우선권주장
61/893,505 2013년10월21일 미국(US)
61/939,837 2014년02월14일 미국(US)

- (71) 출원인
다케다 파마수티컬 컴퍼니 리미티드
일본 오사카시 주오구 도쇼마찌 4 쪽메 1-1
- (72) 발명자
섹스톤, 다니엘, 제이.
미국 매사추세츠주 02176 멜로즈 마빈 로드 59
파우셋, 라이언
미국 매사추세츠주 02476 알링턴 매사추세츠 애비뉴 1357
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 박보현

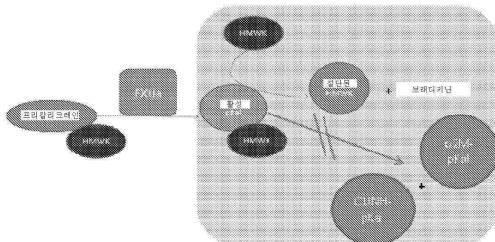
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 혈장 칼리크레인 시스템 바이오마커를 결정하기 위한 검정법

(57) 요약

혈장 칼리크레인(pKal) 시스템의 활성화 수준을 결정하기 위한 방법 및 검정법, 및 pKal 시스템에서 pKal 조절제의 활성을 평가하기 위한 이의 용도.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/36 (2013.01)

C12Q 1/56 (2013.01)

G01N 33/573 (2013.01)

G01N 33/6893 (2013.01)

G01N 2800/224 (2013.01)

G01N 2800/52 (2021.08)

(72) 발명자

케니스톤, 존, 에이.

미국 매사추세츠주 02043 헹햄 롱매도우 로드 8

콘리, 그레고리, 피.

미국 매사추세츠주 02139 케임브리지 넘버1 엘름
스트리트 64

닉슨, 앤드류

미국 매사추세츠주 02339 하노버 에버그린 레인 41

텐후어, 크리스토퍼

미국 매사추세츠주 01748 흉킨턴 웨지우드 드라이
브 10

아델만, 베트

미국 매사추세츠주 02142 케임브리지 스위트 400
퍼스트 스트리트 215

명세서

청구범위

청구항 1

생체외 활성화 방법이며,

혈장 칼리크레인(pKal) 시스템의 활성화제와 함께 대상체로부터 수득된 혈장 샘플을 항온처리하는 단계로서, 여기서, 활성화제가 인자 FXIIa이고, 활성화제가 생체외 첨가되는 것인, 단계;

상기 항온처리 전후에 혈장 샘플에서 pKal 마커의 수준을 측정하는 단계; 및

활성화 이후 혈장 샘플에서 pKal 마커 수준의 변화를 결정하는 단계로서, 여기서, pKal 마커는 알파2M-pKal 또는 C1-INH-pKal인, 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, pKal 마커의 수준이 pKal 마커에 결합하는 항체를 사용하여 측정되는 것인, 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, pKal 마커의 수준이 면역검정에 의해 측정되는 것인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 혈장 샘플 및 활성화제가 pKal 조절제 후보의 존재 하에 항온처리되는 것인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 혈장 칼리크레인에 대한 pKal 조절제 후보의 활성을 평가하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, pKal 조절제 후보가 pKal 억제제 후보인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 pKal과 연관된 질환을 갖거나 가질 위험이 있는지를 평가하는 단계를 추가로 포함하되, 미리 결정된 값과 비교하여 절단된 HMWK의 상승된 수준은 상기 대상체가 상기 질환을 갖거나 가질 위험이 있음을 나타내는 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, pKal과 연관된 질환이 유전성 혈관부종(HAE)인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 pKal과 연관된 질환을 가지는 인간 환자이며 상기 질환의 치료를 받고 있고; pKal과 연관된 질병은 HAE이고; 혈장 샘플은 치료 과정 후에 또는 치료 과정 중에 수득되는 것인, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 치료 효능을 평가하는 단계를 추가로 포함하되, 여기서 치료 전과 비교하여 절단된 HMWK의 감소된 수준 또는 치료 과정에 걸쳐 절단된 HMWK의 감소된 수준은 치료가 효과적임을 나타내는 것인, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 환자가 pKal 억제제로 치료되는 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, pKal 억제제가 DX-2930인, 방법.

청구항 13

제5항에 있어서, pKal 조절제 후보가 pKal 억제제 후보인, 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본원은 2013년 10월 21일자로 출원된 미국 가출원 제61/893,505호의 출원일의 이익, 및 2014년 2월 14일자로 출원된 미국 가출원 제61/939,837호의 출원인의 이익을 주장하고, 이들 각각의 전체 내용이 본 명세서에 참조문헌으로 포함된다.

배경 기술

[0003]

혈장 칼리크레인(plasma kallikrein: pKal)은 순환 시 주요 브래디키닌 생성 효소이다. pKal의 활성화는 유전성 혈관부종(hereditary angioedema: HAE)과 연관된 질환 병리학과 연결된 접촉 시스템을 통해 발생한다. 브래디키닌은 통증, 염증, 부종 및 혈관신생의 주요 조절물질이다.

발명의 내용

[0004]

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

[0005]

본 개시내용은 본 명세서에 기재된 바와 같은 HMWK 생체외 활성화 검정법, 내인성 절단된 HMWK 검정법 및 pKal 생체외 활성화 검정법을 포함하는 다수의 바이오마커 검정법의 개발에 기초한다. 이러한 검정법은 대상체의 혈장에서 혈장 칼리크레인(pKal) 시스템의 활성화 수준을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 이들은 pKal 시스템을 조절(저해 또는 활성화)하는 데 있어서 이의 활성에 대해 후보 화합물을 평가하기 위해 또한 사용될 수 있다.

[0006]

일 양상에서, 본 개시내용은 (i) 대상체로부터 얻은 혈장 샘플을 혈장 칼리크레인(pKal) 시스템(예를 들어, FXIIa)의 활성화제와 항온처리하는 단계; (ii) 항온처리 전에 및 후에 혈장 샘플에서 온전한 고분자량 키니노겐(HMWK), 절단된 HMWK, 또는 둘 다의 수준을 측정하는 단계; 및 (iii) 활성화 후에 샘플에서 온전한 HMWK의 감소를 결정하는 단계를 포함하는 생체외 활성화 방법을 특징으로 한다. 임의로, 혈장 샘플 및 활성화제는 pKal 조절제 후보(예를 들어, 저해제 후보, 예컨대 DX2930 또는 활성화제 후보)의 존재 하에 항온처리된다. 상기 방법은 pKal 조절제 후보의 활성을 평가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 온전한 HMWK 및 절단된 HMWK의 수준은 웨스턴 블롯 분석, 예컨대 프로테인 심플 웨스턴 블롯 분석(Protein Simple Western blot analysis)에 의해 측정된다.

[0007]

또 다른 양상에서, 본 개시내용은 대상체로부터 혈장 샘플을 제공하는 단계; 및 혈장 샘플에서 절단된 HMWK의 수준을 측정하는 단계를 포함하는 대상체에서 혈장 활성화를 평가하는 방법을 특징으로 한다. 절단된 HMWK의 수준은 예를 들어 웨스턴 블롯, 예컨대 프로테인 심플 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정될 수 있다. 몇몇 실시형태에

서, 대상체는 pKal 시스템과 연관된 질환을 갖거나 이를 가지는 것으로 의심된다. 대안적으로 또는 또한, 대상체는 pKal 저해제에 의해 치료된다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법은 pKal 저해제의 효능(efficacy)을 평가하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, 치료 전의 것과 비교하여 치료 후의 절단된 HMWK의 수준 감소는 pKal 저해제가 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0008] 훨씬 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 (i) 샘플을 pKal 기질의 존재 하에 pKal 시스템 활성화제(예를 들어, XIIa 인자 또는 FXIIa)와 항온처리하는 단계, 및 (ii) 기질의 절단 속도에 기초하여 pKal의 활성을 측정하는 단계를 포함하는 샘플(예를 들어, 대상체로부터의 혈장 샘플)에서 pKal 활성을 결정하기 위한 생체외 검정법을 제공한다. 몇몇 예에서, pKal에 의해 절단된 후 검출 가능한 신호를 방출할 수 있는 라벨에 부착된 기질 및 기질의 절단 속도는 검출 가능한 신호의 규모에 기초하여 결정된다. 몇몇 예에서, 혈장 샘플은 활성화제, pKal 기질 및 pKal 조절제 후보(예를 들어, 저해제 조절제 또는 활성화제 조절제)와 항온처리된다. 상기 방법은 pKal 조절제 후보(예를 들어, DX-2930)의 활성을 평가하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, pKal 저해제 후보의 부재 하의 pKal 활성의 수준에 대한 pKal 조절제 후보의 존재 하의 pKal 활성의 수준의 변화는 저해제 후보가 효과적이라는 것을 나타낸다. 예를 들어, pKal 활성의 수준 감소는 pKal 조절제 후보가 pKal 저해제라는 것을 나타내지만; pKal 활성의 수준 상승은 pKal 조절제 후보가 pKal 활성화제라는 것을 나타낸다. 본 명세서에 기재된 임의의 검정 방법은 마이크로플레이트에서 수행될 수 있다.

[0009] 본 명세서에 기재된 임의의 검정 방법에서, 상기 방법은 대상체가 pKal과 연관된 질환(예를 들어, HAE)을 가지고거나 이의 위험에 있는지를 평가하는 단계를 추가로 포함할 수 있고; 미리 결정된 값과 비교하여 절단된 HMWK의 수준 상승은 대상체가 질환을 가지거나 이의 위험에 있다는 것을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 pKal과 연관된 질환(예를 들어, HAE)을 가지는 인간 환자일 수 있고, 질환의 치료(예를 들어, pKal 저해제, 예컨대 DX2930)가 실시된다. 혈장 샘플은 치료 후에 또는 치료의 과정 동안 얻어질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 치료의 효능을 평가하는 단계를 추가로 포함하고; 치료(예를 들어, pKal 저해제, 예컨대 DX2930) 전의 것과 비교하여 절단된 HMWK의 수준 감소 또는 치료(예를 들어, pKal 저해제, 예컨대 DX2930)의 과정 동안 절단된 HMWK의 수준 감소는 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0010] 추가로, 본 개시내용은 대상체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 임의의 검정 방법을 포함하는 pKal 매개 또는 브래디키닌 매개 장애의 위험이 있거나 이를 겪는 대상체를 평가하는 방법을 제공한다. 제공된 방법은 혈장 칼리크레인 매개 혈관부종(kallikrein-mediated angioedema: KMA), 또는 평가 및 치료에서 유용한 pKal에 의해 매개된 다른 질환에 의한 환자의 분석을 허용한다.

[0011] 본 개시내용의 실시형태는 환자, 예를 들어 혈장 칼리크레인에 의해 생성된 브래디키닌에 의해 발생한 부종을 겪는 환자의 확인 및 치료에서의 바이오마커 및 이의 용도를 제공한다. 본 명세서에 개시된 방법, 조성물 및 장치는 다수의 방식으로 유용하다. 예를 들어, pKal 마커의 수준은 상승한 접촉 시스템 활성화와 연관된 장애를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 초기 스크리닝에 예를 들어 질환의 전임상 모델에서 혈장 칼리크레인 저해제(예를 들어, DX-88, EPIKAL2 또는 DX-2930)에 의한 실험실내 또는 생체내 시험이 후행할 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 약동학적 바이오마커로서 또는 그렇지 않으면 칼리크레인 저해제에 대한 대상체의 반응을 모니터링 하기 위해 또한 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 혈장 칼리크레인에 의해 매개된 질환의 치료가 가능하게 하고, pKal 매개 또는 브래디키닌 매개 장애, 예를 들어 HAE, 비히스타민 의존적 특발성 혈관부종, 류마티스성 관절염, 크론병, 루푸스, 알츠하이머병, 패혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/판류 손상, 뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 헤파린 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 접막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 패혈증, 급성 중대뇌동맥(middle cerebral artery: MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 전신 홍반 루푸스 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스폴딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 아나필락시스, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안 증후군, 낭성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)의 예방학적 치료 동안 투약을 관리하기 위해 동반 진단제에서 사용될 수 있다.

[0012] 일 양상에서, 본 개시내용은 대상체를 평가하거나 치료하는, 예를 들어 히스타민 매개 장애로부터 pKal 매개 장애, 예컨대 브래디키닌 매개 혈관부종을 구별하거나, pKal 매개 장애의 미래의 공격을 예측하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 본 명세서에 개시된 pKal 활성화와 상관된 하나 이상의 마커(pKal 마커), 예를 들어 프리칼리

크레인, 활성 pKal, 알파 2M-pKal, C1-INH-pKal, 온전한 키니노겐 및 절단된 키니노겐의 수준을 획득, 예를 들어 결정하여서, 상기 대상체를 평가하거나 치료하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 히스타민 매개 염증성 반응과 상관된 하나 이상의 마커(H-마커), 예를 들어 트립타제의 수준을 획득, 예를 들어 검출하는 단계를 포함한다.

[0013] 몇몇 실시형태에서, 상기 pKal 매개 장애는 HAE, IAE, IBD 또는 IBS이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 pKal 매개 장애는 비히스타민 의존적 특발성 혈관부종, 류마티스성 관절염, 크론병, 루푸스, 알츠하이머병, 패혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/관류 손상, 뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 헤파린 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 점막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 패혈증, 급성 중대뇌동맥(MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 전신 홍반 루푸스 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스풀딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 아나필락시스, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안 증후군, 낭성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)으로부터 선택된다.

[0014] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 대상체를 평가하거나 치료하는 방법을 제공하고, 상기 대상체는 pKal 매개 장애 둘 다, 예를 들어 브래디키닌 매개 혈관부종, 및 히스타민 관련 장애와 일치하는 증상을 가지고, 상기 방법은 a) 임의로 상기 대상체가 pKal 매개 장애 및 히스타민 관련 장애의 하나 또는 둘 다와 일치하는 부종 또는 복부 불편과 같은 증상을 가진다는 것을 결정하는 단계; b) 상기 대상체가 상기 증상에 대해 항히스타민 치료제에 의해 치료되지 않는 경우, 상기 대상체를 항히스타민 치료제에 의해 치료하는 단계; c) 예를 들어 프리칼리크레인, 활성 pKal, 알파 2M-pKal, C1-INH-pKal, 온전한 키니노겐 및 절단된 키니노겐의 pKal 활성화와 상관된 하나 이상의 마커(pKal 마커)의 수준을 획득, 예를 들어 검출하는 단계; d) 상기 수준이 미리 결정된 기준을 만족시키는 경우, 예를 들어 이것이 기준 수준이거나 이를 초과하는 경우, 칼리크레인 저해제 치료제에 대해 대상체를 선택하거나, 칼리크레인 저해제를 상기 대상체에게 투여하여서, 상기 대상체를 평가하거나 치료하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 칼리크레인 저해제 치료제에 대해 대상체를 선택하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 대상체에게 칼리크레인 저해제를 투여하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 칼리크레인 저해제 치료제에 대한 대상체의 선택, 또는 상기 대상체에 대한 칼리크레인 저해제의 투여는 대상체가 상기 항히스타민 치료제에 대한 허용 가능한 반응을 나타낸다는 결정 전에, 예를 들어 항히스타민 치료제에 의한 상기 치료의 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간 또는 10시간 내에 발생한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 대상체가 pKal 매개 장애 및 히스타민 관련 장애 둘 다와 일치하는 증상을 가진다는 결정 및 pKal 마커의 수준을 결정하기 위한 상기 환자로부터의 샘플의 획득은 서로 30분, 1시간, 2시간 또는 3시간 내에; 또는 동일한 방문에서 건강관리 제공자에게 발생한다.

[0015] 몇몇 실시형태에서, 상기 pKal 저해제는 DX-88, DX-2930, 또는 EpiKal-2로부터 선택된다.

[0016] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 히스타민 매개 염증성 반응과 상관된 하나 이상의 마커(H-마커)의 수준을 획득, 예를 들어 결정하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 pKal 매개 장애에 대한 감수성에 대해 평가된다. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 부종, 예를 들어 HAE의 증상, 예를 들어 이들과 일치하는 증상을 가진다. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 원치 않는 pKal 활성화를 특징으로 하는 장애의 증상을 가지고, 상기 대상체는 항히스타민 치료제가 투여된다. 특정한 실시형태에서, 상기 항히스타민 치료제는 본 명세서에 개시된 바와 같은 결정 단계 전에 또는 후에 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간 또는 10시간 내에 투여된다. 특정한 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 본 명세서에 개시된 바와 같은 평가 또는 결정 전에, 후에 또는 동안에 상기 대상체에게 항히스타민 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0017] 몇몇 실시형태에서, 상기 결정 또는 평가에 반응하여, 상기 대상체에 대한 칼리크레인 저해제의 투여. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 하기 증상 또는 특성 중 하나 이상 또는 모두를 가진다: 재발하는 종창의 공격; 종창이 완전히 또는 대개 말초인 종창(예를 들어, 대상체는 유의적인 복부 또는 기도 종창을 가지지 않음); 두드러기; 감염의 증거의 부재 하의 홍반, 통증 및 종창; 항히스타민제 또는 코티코스테로이드 치료제에 대한 반응의 실패; 또는 비히스타민 매개 부종. 소정의 실시형태에서, 상기 대상체는 지속적인 또는 재발하는 부종을 가지고, 항히스타민제 및 스테로이드 치료제 중 하나 또는 둘 다에 비반응성이다. 소정의 실시형태에서, 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 가지지 않거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예

를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 가지고, 대상체는 HAE의 병력을 가지지 않거나; 대상체는 HAE의 병력을 가지거나; 대상체는 IAE의 병력을 가지지 않거나; 대상체는 IAE의 병력을 가지거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 가지지 않거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 가지거나; 대상체는 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 가지거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 가지지 않고, 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 가지지 않거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 가지지 않고, 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 가지거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 가지지 않고, 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 가지지 않거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 가지고, 히스타민 매개 장애, 식품 알레르기의 병력을 가지지 않거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 가지고, 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 가진다.

[0018]

몇몇 실시형태에서, 대상체는 예를 들어 HAE에 대해 예를 들어 예방학적 치료에서 칼리크레인 저해제에 의해 치료되고, 칼리크레인 저해제에 대한 대상체 반응은 평가되거나 모니터링되고, 임의로, 상기 모니터링에 반응하여, 치료제가 선택되거나 투여되고, 예를 들어 결정에 반응하여, 칼리크레인 저해제의 투약량이 조정된다. 몇몇 실시형태에서, pKal 마커의 결정은 동반 진단제의 상황에서 수행되고, 임의로, 치료제의 투여는 결정에 기초하여 주어지거나 보류된다. 소정의 실시형태에서, 상기 획득에 반응하여, 임박한 급성 공격, 예를 들어 HAE 또는 IEA 공격을 확인한다. 특정한 실시형태에서, 상기 대상체는 특발성 혈관부종에 대한 감수성에 대해 평가된다. 특정한 실시형태에서, 상기 평가는 상기 대상체가 pKal 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 장애, 예를 들어 pKal 매개 혈관부종, 또는 히스타민 매개 장애, 예를 들어 알레르기 식품 반응을 겪는지를 결정하는 것을 포함한다.

[0019]

몇몇 실시형태에서, 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE 또는 IAE의 병력을 갖지 않는다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE 또는 IAE의 병력을 가진다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 갖고, 대상체는 HAE의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 HAE의 병력을 갖거나; 대상체는 IAE의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 IAE의 병력을 갖거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 IBD 또는 IBS의 병력을 가지거나; 대상체는 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 갖거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 갖지 않고, 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 갖고, 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 갖지 않거나; 대상체는 pKal 매개 장애, 예를 들어 HAE, IAE, IBD 또는 IBS의 병력을 갖고, 히스타민 매개 장애, 예를 들어 식품 알레르기의 병력을 가진다.

[0020]

몇몇 실시형태에서, pKal 마커, 예를 들어 본 명세서에 개시된 pKal 마커는 항체 기반 시약에 의해 검출된다. 소정의 실시형태에서, pKal 마커는 샌드위치 면역검정법에 의해 검출된다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 샌드위치 면역검정법에 의해 알파 2M-pKal 및 C1-INH-pKal의 수준을 획득, 예를 들어 검출하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 전기영동 분리 검정법, 예를 들어 웨스턴 블롯에 의해 키니노겐, 예를 들어 온전한 또는 절단된 키니노겐 중 하나 또는 둘 다의 수준을 획득, 예를 들어 검출하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, pKal 마커, 예를 들어 키니노겐은 다른 생성물로부터의 분석물질의, 예를 들어 웨스턴 블롯에 의한, 전기영동 분리와 같은 분리에 의존하는 검정법에서 검출된다. 몇몇 실시형태에서, pKal 마커는 심플 웨스턴(Simple Western)(상표명) 검정법에 의해 검출된다. 심플 웨스턴(상표명) 검정법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Rustandi et al. Qualitative and quantitative evaluation of Simon™ a new CE-based automated Western blot system as applied to vaccine development. Electrophoresis. 2012 Sep; 33(17):2790-7] 참조). 심플 웨스턴(상표명) 제품은 또한 상업적으로 구입 가능하다(예를 들어, 프로테인심플(ProteinSimple)(캘리포니아주 산타 클라라) 참조).

[0021]

몇몇 실시형태에서, 예를 들어 프리칼리크레인, 활성 프리Kal, 알파 2M-pKal 또는 C1INH-pKal의 제1 pKal 마커는 샌드위치 면역검정법에 의해 검출되고, 제2 pKal 마커, 예를 들어 키니노겐은 다른 생성물로부터의 분석물질의, 예를 들어 웨스턴 블롯 또는 심플 웨스턴(상표명)에 의한, 전기영동 분리와 같은 분리에 의존하는 검정법에서 검출된다. 소정의 실시형태에서, pKal 마커의 검출은 정성적이다. 소정의 실시형태에서, pKal 마커의 검출은 정량적이다. 특정한 실시형태에서, 상기 방법은 C1-INH-pKal 및 α2M-pKal의 수준을 결정하는 단계를 포함한다.

특정한 실시형태에서, 상기 방법은 활성 pKal의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 프리칼리크레인, 활성 pKal, 알파 2M-pKal, C1-INH-pKal, 온전한 키니노겐 및 절단된 키니노겐의 수준은 각각 검출된다.

[0022] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 예를 들어 프리칼리크레인, 활성 pKal, 알파 2M-pKal, C1-INH-pKal, 온전한 키니노겐 또는 절단된 키니노겐의 pKal 마커의 수준을 기준 값과 비교하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준 값은 HAE에서, 예를 들어 하나 이상의 HAE 대상체에서 상기 pKal 마커의 수준의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준 값은 공격 동안 HAE에서, 예를 들어 급성 공격 동안 하나 이상의 HAE 대상체에서 상기 pKal 마커의 수준의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준 값은 IAE에서, 예를 들어 하나 이상의 IAE 대상체에서 pKal 마커의 수준의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준 값은 급성 공격 동안 IAE에서, 예를 들어 급성 공격 동안 하나 이상의 IAE 대상체에서 pKal 마커의 수준의 함수이다. 소정의 실시형태에서, 상기 기준 값은 HAE 또는 IAE의 부재 하에, 예를 들어 HAE 또는 IAE의 병력을 가지지 않는 하나 이상의 대상체에서 pKal 마커의 수준의 함수이다.

[0023] 특정한 실시형태에서, 상기 방법은, 예를 들어 비교에 반응하여, 대상체를 분류하는, 예를 들어 pKal 매개 장애에 대한 위험에 대해 대상체를 분류하는 단계, 또는 상기 대상체로부터 치료제를 투여하거나 보류하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은, 예를 들어 비교에 반응하여, 상기 대상체에 대한 치료를 선택하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은, 예를 들어 비교에 반응하여, 상기 대상체로부터 치료제, 예를 들어 칼리크레인 결합체; 브래디키닌 B2 수용체 길항제; 또는 C1-INH 대체 물질을 투여하거나 보류하는 단계를 포함한다. 특정한 실시형태에서, 상기 치료는 pKal 저해제, 예를 들어 DX-88; EpiKal-2 및 DX-2930으로부터 선택된 pKal 저해제의 투여이다.

[0024] 몇몇 실시형태에서, 상기 대상체로부터의 샘플은 예를 들어 프리칼리크레인, 예를 들어 항프리칼리크레인 항체; 활성 pKal, 예를 들어 항-활성 pKal 항체; 알파 2M-pKal, 예를 들어 항-알파 2M-pKal 항체; C1INH-pKal, 예를 들어 항-C1INH-pKal 항체; 또는 H 마커, 예를 들어 항-H 마커 항체로부터의 본 명세서에 개시된 하기 마커 중 2개 이상에 대한 포획제를 포함하는 기질과 접촉하고; 임의로, 적어도 하나의 포획제는 pKal 마커에 대한 포획제이다.

[0025] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 샘플, 예를 들어 상기 대상체로부터의 혈액 또는 혈장 샘플을 획득하는 단계를 포함한다.

[0026] 몇몇 실시형태에서, 상기 기질은 C1-INH-pKal에 대한 포획제; 및 알파2M-pKal에 대한 포획제를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 기질은 프리칼리크레인, 예를 들어 항프리칼리크레인 항체에 대한 포획제; 활성 pKal, 예를 들어 항-활성 pKal 항체에 대한 포획제 중 하나 또는 둘 다를 추가로 포함한다.

[0027] 몇몇 실시형태에서, (제1 마커에 대한) 제1 포획제 및 (제2 마커에 대한) 제2 포획제는 기질에 배치되어서, 제1 마커의 존재에 대한 신호는 제2 마커의 존재에 대한 신호로부터 구별될 수 있다. 소정의 실시형태에서, (제1 마커에 대한) 상기 제1 포획제는 제1 위치 또는 주소에 위치하고, (제2 마커에 대한) 상기 제2 포획제는 제2 위치 또는 주소에 위치한다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 위치 또는 주소 및 상기 제2 위치 또는 주소는 상기 기질에서 중첩하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 포획제는 제1 pKal 마커에 대한 것이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 포획제는 제1 pKal 마커에 대한 것이고, 상기 제2 포획제는 제2 pKal 마커에 대한 것이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 포획제는 pKal 마커에 대한 것이고, 상기 제2 포획제는 H-마커에 대한 것이다. 소정의 실시형태에서, 상기 제1 마커는 2M-pKal이고, 상기 제2 마커는 C1INH-pKal이다. 소정의 실시형태에서, 2M-pKal에 대한 포획제는 항-2M-pKal 항체이고, C1INH-pKal에 대한 포획제는 항-C1INH-pKal 항체이다.

[0028] 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 기질을 검출 가능한, 예를 들어 라벨링된, 항-2M-pKal 항체 및 검출 가능한, 예를 들어 라벨링된, 항-C1INH-pKal 항체와 접촉시켜, pKal 마커의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 상기 항체는 착색 제품을 생성하거나, 광자를 방출하거나, 광자를 흡수하거나, 기질을 변경하거나, 기질의 전도율을 변경하는 모이어티에 의해 라벨링된다. 소정의 실시형태에서, 상기 항체는 전기화학 발광을 이용하는 모이어티에 의해 라벨링된다. 소정의 실시형태에서, 상기 항체는 레시늄(resinium)에 의해 라벨링된다. 특정한 실시형태에서, 상기 기질은 중간 규모 발견 장치에서 제공된다. 특정한 실시형태에서, 상기 기질은 혈액 및 혈장 중 하나 또는 둘 다와 사용하기에 적합한 딥스틱(dip-stick) 장치로서 제공된다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 포획제 및 상기 제2 포획제는 공통 또는 유체 연결 챔버, 예를 들어 챔버, 예를 들어 웰(well) 또는 오목부(depression), 다중 챔버 장치, 예를 들어 다중웰 플레이트에 배치된다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 포획제 및 상기 제2 포획제는 기질에서 인쇄된다.

- [0029] 몇몇 실시형태에서, 제1 pKal 마커에 대한 상기 포획제는 상기 기질에서 제1 위치에 있고, 제2 pKal 마커에 대한 상기 포획제는 상기 기질에서 제2 위치에 있고, 상기 제1 및 제2 위치는 상기 기질에 배치되어서, 제1 pKal 마커의 존재에 대한 신호는 제2 pKal 마커로부터의 신호와 구별될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 상기 기질은 제3 위치에서 제3 마커에 대한 포획제를 포함하고, 제3 위치는 상기 기질에 배치되어서, 제3 마커의 존재에 대한 신호는 상기 제1 및 제2 마커로부터의 신호와 구별될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 포획제는 알파 2M-pKal 또는 C1INH-pKal에 특이적이다. 특정한 실시형태에서, 상기 제1 포획제는 알파 2M-pKal에 특이적이고, 상기 제2 포획제는 C1INH-pKal에 특이적이다.
- [0030] 몇몇 실시형태에서, 샘플에서의 pKal 마커의 수준의 결정은 기질과 상기 샘플의 접촉의 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 또는 5시간 내에 만들어질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 샘플에서의 2개의 pKal 마커의 수준의 결정은 기질과 상기 샘플의 접촉의 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 또는 5시간 내에 만들어질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 2개의 pKal 마커의 수준의 결정은 동시에 수행된 검정법, 예를 들어 항온처리에서 만들어질 수 있거나, 시험을 위한 다른 간격은 서로와 중첩한다.
- [0031] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 복수의 pKal 마커에 대한 포획제를 포함하는 기질을 제공한다.
- [0032] 추가의 양상에서, 본 개시내용은 장애가 pKal 저해제에 의한 치료에 감수성인지를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 예를 들어 상기 장애를 겪는 대상체, 또는 상기 장애에 대한 동물 모델에서 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 pKal 마커의 하나 이상의 수준을 평가하는 단계; 결정된 수준을 기준과 비교하는 단계를 포함하고, 미리 결정된 기준을 만족시키는 수준은, 예를 들어 이것이 기준 수준이거나 이보다 큰 경우, pKal 저해제에 의한 치료에 감수성인 장애를 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 실험실내 또는 생체내, 또는 상기 장애의 동물 모델에서 칼리크레인 저해제의 효과를 평가하는 단계를 포함한다.
- [0033] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 pKal 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 장애를 가지는 대상체를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 예를 들어 본 명세서에 기재된 방법에 의해 본 명세서에 기재된 pKal 마커의 수준을 평가하는 단계, 치료를 결정하는 단계 및 상기 평가에 반응하여 이를 선택하는, 예를 들어 칼리크레인 저해제의 투약량 또는 투약 빈도 중 하나 또는 둘 다를 선택하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 상기 대상체에게 칼리크레인 저해제를 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 상기 환자는 상기 평가 전에 칼리크레인 저해제가 투여된다. 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 상기 선택된 투약량 또는 빈도에서 칼리크레인 저해제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0034] 추가의 양상에서, 본 개시내용은 장애가 pKal 저해제에 의한 치료에 감수성인지를 결정하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 예를 들어 상기 장애를 겪는 대상체, 또는 상기 장애에 대한 동물 모델에서 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 하나 또는 복수의 pKal 마커의 수준을 평가하는 단계; 결정된 수준을 기준과 비교하는 단계를 포함하고, 미리 결정된 기준을 만족시키는 수준은, 예를 들어 이것이 기준 수준이거나 이보다 큰 경우, pKal 저해제에 의한 치료에 감수성인 장애를 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은 실험실내 또는 생체내, 또는 상기 장애의 동물 모델에서 칼리크레인 저해제의 효과를 평가하는 단계를 포함한다.
- [0035] 또 다른 양상에서, 본 개시내용은 최소 접촉 활성화에 의해 혈액과 같은 샘플의 수집을 위한 방법 및 장치를 특징으로 한다. 일 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 포획 시약, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 예를 들어 DX-88과 서열이 유사한 폴리펩타이드, 예를 들어 DX-88과 1개, 2개 또는 5개 이하의 아미노산 잔기가 다른 것, 예를 들어 EPIKAL-2이 내부에 배치된 용기를 특징으로 한다. 용기는 예를 들어 구멍, 개구, 격막 등에 의해 구성되어서, 동일한 용기에서 대상체로부터의 혈액과 같은 샘플의 수집 및 포획 시약에 의한 샘플에서의 pKal 관련 마커, 예를 들어 pKal의 결합을 허용한다. 결합 종, 예를 들어 pKal의 측정은 동일한 용기에서 수행될 수 있거나, 일 실시형태에서, 기질은 측정에 대해 이전 용기로부터 제거되고, 예를 들어 측정은 또 다른 장치 내에 또는 상에 있을 수 있다. 일 실시형태에서, 용기의 용적은 0.5-100, 0.5-50, 0.5-10, 1-100, 1-50 또는 1-25ml이다. 일 실시형태에서, 포획 시약, 예를 들어 pKal 포획 시약은 용기의 내면에 배치된다. 포획 시약은 표면에 커플링될 수 있고, 제1 특이적 결합 파트너는 표면에 결합되고, 제2 특이적 결합 파트너는 포획 시약에 커플링된다. 특이적 결합 파트너의 예는 바이오틴 및 아비딘이다. 일 실시형태에서, 바이오틴화 포획 시약, 예를 들어 pKal 포획 시약, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 예를 들어 DX-88과 서열이 유사한 폴리펩타이드, 예를 들어 DX-88과 1개, 2개 또는 5개 이하의 아미노산 잔기가 다른 것, 예를 들어 Epikal-2는 아비딘에 의해 코팅된 용기의 표면에 배치된다.
- [0036] 본 개시내용은 혈장 칼리크레인 매개 혈관부종(KMA), 또는 평가 및 치료에서 유용한 pKal에 의해 매개된 다른

질환을 가지는 환자를 확인할 수 있는 바이오마커를 제공한다.

[0037] 바이오마커를 통해 pKal 활성화를 나타내는 것으로 밝혀진 환자는 pKal 저해제, 예컨대 DX-88, HAE와 연관된 급성 부종성 공격의 치료에 승인된 pKal의 작은 단백질 저해제에 의한 치료에 대한 후보이다. 다른 pKal 저해제는 완전 인간 항체 저해제인 DX-2930을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 바이오마커를 통해 pKal 활성화를 나타내는 것으로 밝혀진 환자는 브래디키닌 B2 수용체 길항제, 예를 들어 인카티반트(Incatisibant)(Firazyr(등록상표))에 의한 치료에 대한 후보이다. 몇몇 실시형태에서, 바이오마커를 통해 pKal 활성화를 나타내는 것으로 밝혀진 환자는 C1-INH 대체 물질, 예를 들어 정제된 인간 살균된 나노여과된 C1-INH 농축액(베리너트(Berinert)(등록상표))에 의한 치료에 대한 후보이다.

[0038] 본 개시내용의 실시형태는 환자, 예를 들어 혈장 칼리크레인에 의해 생성된 브래디키닌에 의해 야기된 부종을 겪는 환자의 확인 및 치료에서의 바이오마커 및 이의 용도를 제공한다. 본 명세서에 개시된 방법, 조성을 및 장치는 다수의 방식에서 유용하다. 예를 들어, pKal 마커의 수준은 상승한 접촉 시스템 활성화와 연관된 장애를 확인하기 위해 사용될 수 있다. 초기 스크리닝은 예를 들어 질환의 전임상 모델에서 혈장 칼리크레인 저해제(예를 들어, DX-88, EPIKAL-2, 또는 DX-2930)에 의한 실험실내 또는 생체내 시험이 후행할 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 약동학적 바이오마커로서 또는 달리 칼리크레인 저해제에 대한 대상체의 반응을 모니터링하기 위해 또한 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 마커는 혈장 칼리크레인에 의해 매개된 질환의 치료가 가능하게 하거나, HAE의 예방학적 치료 동안 투약을 관리하거나, 임박한 급성 HAE 공격을 확인하기 위해 동반 진단제에서 사용될 수 있다.

[0039] 다른 예시적인 실시형태는 마이크로플레이트 기반 pKal 활성 검정법을 포함하고, 이것은 (a) 대상체로부터 혈장 샘플을 제공하는 단계; (b) 혈장 샘플을 pKal 기질의 존재 하에 pKal 시스템 활성화제와 항온처리하는 단계(여기서, 기질은 pKal에 의해 절단된 후 검출 가능한 신호를 방출할 수 있는 라벨에 부착됨); 및 (c) 검출 가능한 신호의 밀도에 기초하여 pKal의 활성을 측정하는 단계를 포함한다. 활성화제는 FXIIa 인자일 수 있다. 몇몇 예에서, 혈장 샘플은 활성화제, pKal 기질 및 pKal 저해제 후보와 항온처리될 수 있다. 몇몇 예에서, 상기 방법은 pKal 저해제 후보의 활성을 평가하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, pKal 저해제 후보의 부재 하의 pKal 활성의 수준에 비해 pKal 저해제 후보의 존재 하의 pKal 활성의 수준의 감소는 저해제 후보가 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0040] 본 개시내용의 하나 이상의 실시형태의 상세내용은 하기 설명에 기재되어 있다. 본 개시내용의 다른 특징 또는 이점은 몇몇 실시형태의 하기 도면 및 상세한 설명, 및 또한 첨부된 청구범위로부터 명확할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 혈장 칼리크레인의 접촉 시스템 활성화에 관여하는 요소의 도시이다. 절단된 HMWK는 웨스턴 블롯에 의해 결정될 수 있다. a2M-pKal 및 C1INH-pKal은 면역검정법(MSD 플랫폼)에 의해 결정될 수 있다.

도 2는 웨스턴 블롯 분석에 의한 절단된 키니노겐 검출을 보여준다. 샘플을 환원 조건 하에 SDS-PAGE(3-8% 트리스-아세테이트)를 사용하여 분석한 후, PVDF 막으로 옮기고, 면역블로팅하였다. 1 레인 - 50nM 온전한 키니노겐; 2 레인 - 50nM 절단된 키니노겐; 3 레인 - 50nM 저분자량 키니노겐; 4 레인 - 1:20의 시트르산나트륨 첨가 인간 혈장(유리 수집 관); 5 레인 - 1:20의 시트르산나트륨 첨가 인간 혈장 (플라스틱) 칼리크레인(처리됨); 6 레인 - 1:20 시트르산나트륨 첨가 인간 혈장 (플라스틱); 7 레인 - 1:20의 시트르산나트륨 첨가 인간 혈장 (플라스틱)(20nM 2개의 사슬 키니노겐이 첨가됨).

도 3은 C1INH-pKal 복합체의 정제를 보여준다. 양이온 교환 크로마토그램(패널 A)은 C1INH, pKal 및 복합체의 분리를 나타낸다. 양이온 교환으로부터의 분획을 수집하고 SDS-PAGE에 의해 분석하였다(패널 B).

도 4는 인간 혈장에서 C1INH-pKal 검출에 대한 샌드위치 ELISA 표준 곡선을 보여준다. 마우스 항-pKal(클론 13G11)을 플레이팅하고, 염소 항-C1 저해제를 검출에 사용하였다.

도 5는 인간 혈장에서 C1INH-pKal 검출에 대한 샌드위치 ELISA 표준 곡선을 보여준다. 염소 항-C1-INH를 플레이팅하고, 마우스 항-pKal(클론 13G11)을 검출에 사용하였다.

도 6은 a2M-pKal 복합체의 정제를 보여준다. 복합체를 크기 배제 크로마토그래피(패널 A)에 의해 정제하고, 분획을 SDS-PAGE에 의해 분석하였다(패널 B).

도 7은 a2M-pKal 복합체의 정량화를 보여준다. 혈장 칼리크레인 활성은 과량의 a2M의 첨가 시 플래토

(plateau) 수준으로 감소하는 것으로 나타났다(패널 A). 표준 곡선으로서 pKal에 비해 10배 과량의 α 2M을 사용하는 것이 구축되고, 이로부터 본 발명의 정제된 α 2M-pKal 복합체의 몰 농도는 복합체에서의 pKal의 농도에 따라 결정된다.

도 8은 인간 혈장에서 α 2M-pKal 검출에 대한 샌드위치 ELISA 표준 곡선을 보여준다. 항- α 2M을 플레이팅하고, 마우스 항-pKal(클론 13G11)을 검출에 사용하였다.

도 9는 인간 혈장에서 α 2M-pKal 검출에 대한 샌드위치 ELISA 표준 곡선을 보여준다. 항-pKal(클론 13G11)을 플레이팅하고, 항- α 2M을 검출에 사용하였다.

도 10은 황산덱스트란에 의한 활성화 후 정상 인간 혈장에서의 C1INH-pKal 및 α 2M-pKal 복합체의 검출을 보여준다.

도 11은 공격 동안 얻은 환자 샘플에서 온전한 키니노겐(즉, 1-사슬)의 검출을 보여준다. 환자 혈장 샘플을 항프로테아제 칙테일을 함유하는 시트르산염 첨가 혈장 관에서 수집하였다.

도 12는 마이크로플레이트 기반 pKal 활성 검정법의 도식적 예시이고, 수반된 실험은 치료된 원숭이에서 pKal 활성에 대한 DX-2930의 저해 활성을 보여준다.

도 13은 위약/비히클 치료된 원숭이로부터의 혈장, 및 이 동일한 혈장으로 스파이킹된 DX-2930 대조군에서의 실험을 보여준다.

도 14는 HAE 환자(CM, DG, BB 및 GR)로부터의 혈장 샘플에서 HMWK를 보여준다. 샘플을 항프로테아제 저해제 칙테일에서 수집하였다. MW: 마커; C: 1 사슬($6.44\mu\text{g}/\text{mL}$) + 2 사슬($1.54\mu\text{g}/\text{mL}$); 1: CM 기준; 2: CM 공격; 3: DG 기준; 4: DG 공격; 5: BB 기준; 6: BB 공격; 7: GR 기준; 8: GR 공격; 및 9: 혼주된 정상 혈장.

도 15는 웨스턴 블롯 검정법에 의해 결정된 HAE 환자로부터의 샘플에서 1-사슬 HMWK의 수준을 보여준다.

도 16은 사이노몰거스(cynomolgus) 원숭이에서의 pKal 활성화에 대한 DX-2930의 저해 활성을 보여준다. 다중용량 DX-2930은 (카올린 또는 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 황산덱스트란에 의한 혈장 활성화에 의해 또는 이것 없이) 4일 APTT 혈장 샘플의 사이노몰거스 원숭이 키니노겐 웨스턴 블롯 분석에서 사용되었다.

도 17은 프로테인 심플 웨스턴 분석 및 전통적인 웨스턴 블롯 분석 둘 다를 사용하여 예시적인 pKal 저해제 Dx-2930의 저해 활성을 검사하기 위한 예시적인 HMWK 생체외 활성화 검정법을 예시한다. 본 명세서에 기재된 HMWK 생체외 활성화 검정법은 DX-2930의 최소 수준이 pKal 활성화를 저해하고, 이것이 정상 인간 혈장에서 내인성 C1 저해제 단독을 능가한다는 것을 보여준다.

도 18은 DX2930 적정에 의한 XIIa 인자 활성화 혈장에 대한 프로테인 심플 원데이터를 보여주는 HMWK 생체외 활성화 검정법을 도시한다.

도 19는 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정된 바와 같은 30분 활성화 후 혈장에서의 인간 HMW 키니노겐의 검출을 보여준다.

도 20은 혈장 활성화를 검출하는 데 있어서 프로테인 심플 웨스턴 검정법과 전통적인 웨스턴 블롯 검정법 사이의 비교를 보여준다.

도 21은 혈장 활성화를 검출하는 데 있어서 프로테인 심플 웨스턴 검정법과 전통적인 웨스턴 블롯 검정법 사이의 비교를 보여준다.

도 22는 순수한(neat) 혈장 샘플 BRH745047에서 30분 FXIIa 활성화 후 1-사슬 HMWK의 감소의 백분율을 보여준다.

도 23은 순수한 혈장 샘플 BRH745048에서 30분 FXIIa 활성화 후 1-사슬 HMWK의 감소의 백분율을 보여준다.

도 24는 순수한 혈장 샘플 BRH745064에서 30분 FXIIa 활성화 후 1-사슬 HMWK의 감소의 백분율을 보여준다.

도 25는 순수한 혈장 샘플 BRH745062에서 30분 FXIIa 활성화 후 1-사슬 HMWK의 감소의 백분율을 보여준다.

도 26은 순수한 혈장 샘플 BRH745049, BRH745062 및 BRH745063에서 30분 FXIIa 활성화 후 1-사슬 HMWK의 감소의 백분율을 보여준다.

도 27은 다양한 농도에서 FXIIa를 가지는 혈장에서 1-사슬 HMWK의 감소를 보여주는 차트이다.

도 28은 본 명세서에 기재된 내인성 절단된 키니노겐 검정법에 의해 결정된 바와 같은 정상, 기준 및 HAE 공격 환자에서의 2-사슬 HMWK의 수준을 보여준다.

도 29는 프로테인 심플 웨스턴 블롯 및 전통적인 웨스턴 블롯에 의해 결정된 바와 같은 HAE 샘플에서의 내인성 절단된 키니노겐을 보여주는 차트이다.

도 30은 HAE 환자로부터 샘플에서의 내인성 절단된 키니노겐의 수준을 보여준다. 1 레인: 정제된 1-사슬 및 2-사슬 HMWK. 2 레인: 시트르산염에 의해 수집된 정상 인간 혈장 샘플.

도 31은 DX-2930에 의해 처리된 원숭이로부터의 혈장 샘플에서 pKal 활성의 저해 백분율 및 DX-88(에칼란타이드), C1-INH, 또는 DX-2930에 의해 실험실내 스파이킹된 혈장 샘플에서 pKal 활성의 저해를 보여주는 그래프이다. 저해 백분율은 예시적인 생체외 pKal 활성화 검정법을 이용하여 측정된다. 오차 막대는 표준 평균 오차를 나타낸다.

도 32는 DX-2930의 다른 용량으로 치료된 인간 및 원숭이로부터의 혈장에서 pKal 활성의 생체외 저해 백분율을 보여주는 그래프이다. 저해 백분율은 예시적인 생체외 pKal 활성화 검정법을 이용하여 측정된다. 과선은 에칼란 타이드의 치료학적 유효 수준의 C_{max} 와 일치하는 농도인, 80nM DX-2930에 의해 관찰된 저해 백분율을 보여준다.

도 33은 비히클 대조군에서 상응하는 샘플과 비교하여 각각의 용량 그룹에 대한 매일 투약 후의 평균 저해를 비교하는, DX-2930 1상 연구로부터의 혈장 샘플에서의 "pKal 활성의 저해(%)"를 보여주는 일련의 도면이다. 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다.

도 34는 FXIIa 치료 후 DX-2930 1a상 대상체로부터의 웨스턴 블롯 데이터를 보여주는 그래프이다. 오차 막대는 대상체 사이의 표준 편차를 사용하여 계산된다. 그룹 1 대상체는 0.1mg/kg가 투약되고, 그룹 2 대상체는 0.3mg/kg가 투약되고, 그룹 3 대상체는 1mg/kg가 투약되고, 그룹 4 대상체는 3mg/kg가 투약된다.

도 35는 FXIIa 치료의 부재 하의 DX-2930 1a상 대상체로부터의 웨스턴 블롯 데이터의 그래프를 보여준다. 오차 막대는 대상체 사이의 표준 편차를 사용하여 계산된다. 그룹 1 대상체는 0.1mg/kg가 투약되고, 그룹 2 대상체는 0.3mg/kg가 투약되고, 그룹 3 대상체는 1mg/kg가 투약되고, 그룹 4 대상체는 3mg/kg가 투약된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042]

대상체로부터의 샘플에서 온전한 고분자량 키니노겐(HMWK), 절단된 HMWK 및/또는 pKal 활성과 같은 혈장 칼리크 레인(pKal) 시스템과 연관된 바이오마커의 수준을 측정하기 위한 검정법이 본 명세서에 기재되어 있다. 몇몇 실 시형태에서, 검정법은 대상체로부터 얻은 샘플을 pKal 시스템의 활성화제와 항온처리하는 단계 및 온전한 고분자량 키니노겐(HMWK), 절단된 HMWK 및/또는 pKal 활성의 수준을 측정하는 단계를 포함한다. 이러한 검정법은 예를 들어 대상체가 pKal과 연관된 질환을 가지거나 이의 위험에 있는지를 평가하고, pKal과 연관된 질환의 치료를 평가하고, 약물 후보, 예를 들어 pKal 조절제, 예컨대 pKal 저해제를 확인하기 위해 유용하다. 이러한 검정법은 예를 들어 치료, 예컨대 pKal과 연관된 질환의 치료에 대해 대상체를 선택하기 위해 또한 유용하다.

[0043]

정의

[0044]

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

[0045]

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

[0046]

본 명세서에 사용된 바대로, "획득한다" 또는 "획득하는"은 예를 들어 물리적 집합체 또는 값을 "직접적으로 획득" 또는 "간접적으로 획득"함으로써 물리적 집합체 또는 값을, 예를 들어 숫자 값의 보유를 얻는 것을 의미한다. "직접적으로 획득하는"은 물리적 집합체 또는 값을 얻기 위해 프로세스를 수행하는 것(예를 들어, 그 용어가 본 명세서에 정의된 바대로 샘플에서 검정법 또는 시험을 수행하거나 "샘플을 분석하는" 것)을 의미한다. "간접적으로 획득하는"은 또 다른 당사자 또는 공급원(예를 들어, 물리적 집합체 또는 값을 직접적으로 획득한 제3 당사자 실험실)으로부터 물리적 집합체 또는 값을 수취하는 것을 의미한다. 물리적 집합체를 직접적으로 획득하는 것은 프로세스를 수행하는 것, 예를 들어 물리적 물질, 예를 들어 출발 물질의 물리적 변화를 포함하는 샘플을 분석하는 것을 포함한다. 예시적인 변화는 2개 이상의 출발 물질로부터 물리적 집합체를 만드는 것, 물질을 전단 또는 단편화시키는 것, 물질을 분리하거나 정제하는 것, 2개 이상의 별개의 집합체를 혼합물로 합하는 것, 공유 또는 비공유 결합을 파괴하거나 형성하는 것을 포함하는 화학 반응을 수행하는 것을 포함한다. 값을 직접적으로 획득하는 것은 샘플 또는 또 다른 물질의 물리적 변화를 포함하는 프로세스를 수행하는 것, 예를 들어

물질, 예를 들어 샘플, 분석물질 또는 시약의 물리적 변화를 포함하는 분석 프로세스(때때로 본 명세서에서 "물리적 분석"이라 칭함)를 수행하는 것, 분석 방법, 예를 들어 하기 중 하나 이상을 포함하는 방법을 수행하는 것을 포함한다: 또 다른 물질로부터 물질, 예를 들어 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 분리 또는 정제; 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 또 다른 물질, 예를 들어 완충제, 용매 또는 반응물과의 조합; 또는 예를 들어 분석물질의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경; 또는 예를 들어 시약의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 시약 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경.

[0047] 본 명세서에 사용된 바대로, 샘플을 "분석하는" 것은 샘플 또는 또 다른 물질, 예를 들어 출발 물질의 물리적 변화를 포함하는 프로세스를 수행하는 것을 포함한다. 예시적인 변화는 2개 이상의 출발 물질로부터 물리적 집합체를 만드는 것, 물질을 전단 또는 단편화시키는 것, 물질을 분리하거나 정제하는 것, 2개 이상의 별개의 집합체를 혼합물로 합하는 것, 공유 또는 비공유 결합을 파괴하거나 형성하는 것을 포함하는 화학 반응을 수행하는 것을 포함한다. 샘플을 분석하는 것은 물질, 예를 들어 샘플, 분석물질 또는 시약의 물리적 변화를 포함하는 분석 프로세스(때때로 본 명세서에서 "물리적 분석"이라 칭함)를 수행하는 것, 분석 방법, 예를 들어 하기 중 하나 이상을 포함하는 방법을 수행하는 것을 포함할 수 있다: 또 다른 물질로부터 물질, 예를 들어 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 분리 또는 정제; 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 또 다른 물질, 예를 들어 완충제, 용매 또는 반응물과의 조합; 또는 예를 들어 분석물질의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 분석물질 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경; 또는 예를 들어 시약의 제1 구성요소와 제2 구성요소 사이의 공유 또는 비공유 결합의 파괴 또는 형성에 의한 시약 또는 이의 단편 또는 다른 유도체의 구조의 변경.

[0048] 용어 "효현제"는, 본 명세서에 사용된 바대로, 단백질의 바이오활성을 모방하거나 상향조절(예를 들어, 강화 또는 보강)하는 물질을 의미하도록 의도된다. 효현제는 야생형 단백질의 적어도 하나의 바이오활성을 가지는 야생형 단백질 또는 이의 유도체일 수 있다. 효현제는 또한 단백질의 적어도 하나의 바이오활성을 증가시키는 화합물일 수 있다. 효현제는 또한 폴리펩타이드와 또 다른 문자, 예를 들어 표적 웨პ타이드 또는 핵산의 상호작용을 증가시키는 화합물일 수 있다.

[0049] 용어 "길항제"는 본 명세서에 사용된 바대로 단백질의 적어도 하나의 바이오활성을 하향조절(예를 들어, 억제 또는 저해)하는 물질을 의미하도록 의도된다. 길항제는 단백질과 또 다른 문자, 예를 들어 표적 웨პ타이드 또는 효소 기질 사이의 상호작용을 저해하거나 감소시키는 화합물일 수 있다. 길항제는 또한 존재하는 발현된 단백질의 양을 감소시키거나 저해하는 화합물일 수 있다. 통상적으로, 단백질 또는 유전자의 저해는, 본 명세서에 기재되거나 당해 분야에서 인정된 하나 이상의 방법에 의해 측정된, 적어도 10% 이상, 예를 들어 20%, 30%, 40% 또는 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 이상의 단백질 또는 유전자의 발현 또는 관련 활성의 감소, 또는 1배 초과, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 50배, 100배 이상의 발현 또는 관련 활성의 감소를 의미한다.

[0050] 본 명세서에 사용된 바대로, "결합 친화도"는 겉보기 결합 상수 또는 K_a 를 의미한다. K_a 는 분해 상수(K_d)의 역수이다. 결합 단백질은, 예를 들어 특정한 표적 문자에 대해 적어도 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} 및 $10^{11} M^{-1}$ 의 결합 친화도를 가질 수 있다. 제2 표적에 비해 제1 표적에 대한 결합 단백질의 더 높은 친화도 결합은 제2 표적의 결합에 대한 K_a (또는 숫자 값 K_d)보다 제1 표적의 결합에 대한 더 높은 K_a (또는 더 적은 숫자 값 K_d)로 표시될 수 있다. 이러한 경우에, 결합 단백질은 제2 표적(예를 들어, 제2 입체구성의 동일한 단백질 또는 이의 모방체; 또는 제2 단백질)에 비해 제1 표적(예를 들어, 제1 입체구성의 단백질 또는 이의 모방체)에 대해 특이성을 가진다. (예를 들어, 특이성 또는 다른 비교에 대한) 결합 친화도의 차이는 적어도 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37.5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000 또는 10^5 배일 수 있다.

[0051] 결합 친화도는 평형 투석, 평형 결합, 젤 여과, ELISA, 표면 플라스몬 공명 또는 (예를 들어, 형광 검정법을 이용한) 분광법을 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 결합 친화도를 평가하기 위한 예시적인 조건은 트리스-완충제(50mM 트리스, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂(pH 7.5)) 중에 있다. 이 기술은 결합 단백질(또는 표적) 농도의 함수로서 결합 및 유리 결합 단백질의 농도를 측정하도록 이용될 수 있다. 결합 결합 단백질의 농도([결합])는 유리 결합 단백질의 농도([유리]) 및 표적에서의 결합 단백질에 대한 결합 부위의 농도와 관련되고, 여기서 (N)은 하기 식에 의해 표적 문자마다 결합 부위의 수이다:

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

[0052]

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

[0054]

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

[0055]

용어 "포획 시약"은 리간드에 특이적으로 결합하는 모이어티를 의미한다.

[0056]

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

[0057]

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

[0058]

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

[0059]

본 명세서에 사용된 바대로, "검출 시약"은 검출하고자 하는 모이어티에 결합하는 모이어티를 의미한다. 통상적으로, 이것은 신호, 예를 들어 형광을 생성하거나, 측정 가능한 화합물을 생성한다.

[0060]

"에피토프"는 결합 단백질(예를 들어, 항체, 예컨대 Fab 또는 전장 항체)에 의해 결합된 표적 화합물 상의 부위를 의미한다. 표적 화합물이 단백질인 경우, 이 부위는 전부 아미노산 성분으로 이루어지거나, 전부 단백질의 아미노산의 화학 변형(예를 들어, 글라이코실 모이어티)으로 이루어지거나, 이들의 조합으로 이루어질 수 있다. 중첩하는 에피토프는 적어도 하나의 공통의 아미노산 잔기, 글라이코실기, 포스페이트기, 설플레이트기 또는 다른 분자 특징을 포함한다.

[0061]

제1 결합 단백질이 제2 결합 단백질이 결합하는 표적 화합물 상의 동일한 부위에 결합하거나, 제2 결합 단백질이 결합하는 부위와 중첩(예를 들어, 아미노산 서열 또는 다른 분자 특징(예를 들어, 글라이코실기, 포스페이트기 또는 설플레이트기)의 면에서, 예를 들어 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100% 중첩)하는 부위에 결합하는 경우, 제1 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 제2 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 "동일한 에피토프에 결합한다".

[0062]

에피토프에 대한 제1 결합 단백질의 결합이 에피토프에 결합하는 제2 결합 단백질의 양을 (예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 이상) 감소시키는 경우, 제1 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 제2 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 "결합에 대해 경쟁한다". 경쟁은 직접적(예를 들어, 제1 결합 단백질은 제2 결합 단백질이 결합한 에피토프와 동일하거나 이와 중첩하는 에피토프에 결합함) 또는 간접적(예를 들어, 에피토프에 대한 제1 결합 단백질의 결합은 에피토프에 결합하는 제2 결합 단백질의 능력을 감소시키는 표적 화합물의 입체 변화를 발생시킴)일 수 있다.

[0063]

본 명세서에 사용된 바대로, "기능적" 생물학적 분자는 이것이 특징으로 하는 특성 및/또는 활성을 나타내는 형

태의 생물학적 분자이다.

[0064] 2개의 서열 사이의 "상동성" 또는 "서열 동일성"(이 용어는 본 명세서에서 상호 교환되어 사용됨)의 계산을 하기와 같이 수행한다. 최적 비교 목적을 위해 서열을 정렬한다(예를 들어, 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열 중 하나 또는 둘 다에서 캡이 도입될 수 있고, 비교 목적을 위해 비상동성 서열을 버릴 수 있음). 최적 정렬은 12의 캡 패널티(gap penalty), 4의 캡 연장 패널티(gap extend penalty) 및 5의 프레임 시프트 캡 패널티(frameshift gap penalty)를 가지는 블러섬(Blossum) 62 스코어링 매트릭스를 가지는 GCG 소프트웨어 패키지에서 GAP 프로그램을 이용하여 최고의 점수로서 결정된다. 이후, 상응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오타이드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 비교한다. 제1 서열에서의 위치를 제2 서열에서의 상응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드가 점유하는 경우, 분자는 그 위치에서 동일하다(본 명세서에 사용된 바대로 아미노산 또는 핵산 "동일성"은 아미노산 또는 핵산 "상동성"과 동일함). 2개의 서열 사이의 동일성의 백분율은 서열이 공유한 동일한 위치의 수의 함수이다.

[0065] 바람직한 실시형태에서, 비교 목적을 위해 정렬된 기준 서열의 길이는 기준 서열의 길이의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 더 바람직하게는 적어도 50%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 60% 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98% 또는 100%이다. 예를 들어, 기준 서열은 면역글로불린 가변 도메인 서열의 길이일 수 있다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "낮은 업격도, 중간 업격도, 높은 업격도 또는 매우 높은 업격도 조건 하에 하이브리드화한다"는 하이브리드화 및 세척에 대한 조건을 기술한다. 하이브리드화 반응을 수행하기 위한 가이드라인은 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6]에서 확인될 수 있다. 수성 및 비수성 방법은 이 참조문헌에 기재되어 있고, 이 중 어느 하나가 이용될 수 있다. 본 명세서에서 언급한 특정한 하이브리드화 조건은 하기와 같다: (1) 약 45°C에서의 6X 염화나트륨/나트륨 시트레이트(SSC) 중에서, 이어서 적어도 50°C(세척의 온도는 낮은 업격도 조건 하에 55°C로 증가할 수 있음)에서 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 2회 세척의 낮은 업격도 하이브리드화 조건; (2) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 60°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 중간 업격도 하이브리드화 조건; (3) 약 45°C에서의 6X SSC, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 0.1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 높은 업격도 하이브리드화 조건; 및 (4) 65°C에서의 0.5M 인산나트륨, 7% SDS, 이어서 65°C에서의 0.2X SSC, 1% SDS 중의 1회 이상의 세척의 매우 높은 업격도 하이브리드화 조건. 매우 높은 업격도 조건(4)이 바람직한 조건이고, 달리 기재되지 않은 한 사용되어야 하는 것이다. 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 핵산 또는 이의 보체, 예를 들어 본 명세서에 기재된 결합 단백질을 코딩하는 핵산에 낮은, 중간, 높은 또는 매우 높은 업격도로 하이브리드화하는 핵산을 포함한다. 핵산은 기준 핵산의 길이와 동일한 길이 또는 이의 30%, 20% 또는 10% 내일 수 있다. 핵산은 본 명세서에 기재된 면역글로불린 가변 도메인 서열을 코딩하는 구역에 상응할 수 있다.

[0067] "단리된 조성물"은 단리된 조성물이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 조성물을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 인공으로 또는 천연으로 생성된 조성물은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0068] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "실험실내"는 다세포 유기체 내보다는 인공 환경, 예를 들어 시험관 또는 반응 용기, 세포 배양 등에서 발생하는 사건을 의미한다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "생체내"는 다세포 유기체, 예컨대 인간 또는 비인간 동물 내에 발생하는 사건을 의미한다.

[0070] "단리된 조성물"은 단리된 조성물이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 조성물을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 인공으로 또는 천연으로 생성된 조성물은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0071] "단리된" 단백질은 단리된 단백질이 얻어질 수 있는 천연 샘플의 적어도 하나의 성분의 적어도 90%로부터 제거된 단백질을 의미한다. 관심 있는 종 또는 종의 집단이 중량-중량 기준으로 적어도 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 80%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 99% 순수한 경우, 단백질은 "적어도" 소정의 정도의 순도의 "조성"일 수 있다.

[0072] 용어 "칼리크레인"(예를 들어, 혈장 칼리크레인)은 세린 프로테아제 패밀리의 하위그룹인 웹타다제(단백질 중에 웹타이드 결합을 개열시키는 효소)를 의미한다. 혈장 칼리크레인은 키니노겐을 개열시켜 강력한 전염증성 웹타

이드인 키닌을 생성시킨다.

[0073] 용어 "칼리크레인 저해제"는 칼리크레인을 저해하는 임의의 물질 또는 분자를 의미한다. 예를 들어, DX-88(또한 본 명세서에서 "PEP-1"이라 칭함)은 혈장 칼리크레인(NP_000883)의 강력한($K_i < 1\text{nM}$) 및 특이적 저해제이다. (또한, 예를 들어 WO 제95/21601호 또는 WO 제2003/103475호를 참조).

[0074] 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "DX-2922"는 용어 "X101-A01"과 상호 교환되어 사용된다. 이 항체의 다른 변이체는 이하에 기재되어 있다.

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

[0075] [0076] 본 명세서에 사용된 바대로 용어 "DX-2930"은 용어 "X124-G01"과 상호 교환되어 사용된다. 이 항체의 다른 변이체는 이하에 기재되어 있다.

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

[0077] [0078] 용어 "조절자"는, 조절을 발생시킬 수 있는 생물학적 물질, 예컨대 박테리아, 식물, 진균, 또는 동물 세포 또는 조직으로부터 만들어진, 폴리펩타이드, 핵산, 마크로분자, 복합체, 분자, 소분자, 화합물, 종 등(천연 발생 또는 비천연 발생) 또는 추출물을 의미한다. 조절자는 검정법에서의 포함에 의해 기능적 특성, 생물학적 활성 또는 프로세스의 저해제 또는 활성자, 또는 이들의 조합(직접적으로 또는 간접적으로)(예를 들어, 효현제, 부분 길항제, 부분 효현제, 역효현제, 길항제, 항미생물제, 미생물 감염 또는 증식의 저해제 등)으로서 가능한 활성에 대해 평가될 수 있다. 이러한 검정법에서, 일시에 많은 조절자는 스크리닝될 수 있다. 조절자의 활성을 공지되거나, 비공지되거나, 부분 공지될 수 있다.

[0079] "비필수" 아미노산 잔기는 생물학적 활성을 폐지하지 않거나 더 바람직하게는 이를 실질적으로 변경하지 않으면서 결합체, 예를 들어 항체의 야생형 서열로부터 변경될 수 있는 잔기이지만, "필수" 아미노산 잔기의 변경은 실질적인 활성을 손실시킨다.

[0080] 본 방법에 의해 치료하고자 하는 "환자", "대상체" 또는 "숙주"(이들 용어는 상호 교환되어 사용됨)는 인간 또는 비인간 동물을 의미할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 칼리크레인 매개 장애, 예를 들어 브래디키닌 매개 장애, 예를 들어 유전성 혈관부종(HAE)의 위험이 있거나, 이를 겪는다. 몇몇 실시형태에서, 대상체는 비히스타민 의존적 특발성 혈관부종, 류마티스성 관절염, 크론병, 루푸스, 알츠하이머병, 패혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/관류 손상, 대뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 해파린 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 점막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 패혈증, 급성 중대뇌 동맥(MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 전신성 홍반성 낭창 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스풀딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 과민증, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안증후군, 낭성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)의 위험이 있거나, 이를 겪는다.

[0081] 용어 "프리칼리크레인" 및 "혈장 프리칼리크레인"은 본 명세서에서 상호 교환되어 사용되고, 프리칼리크레인으

로도 공지된 활성 혈장 칼리크레인의 지모겐 형태를 의미한다.

- [0082] 대상체에서의 질환을 "예방하는" 또는 "예방한다"의 용어는 대상체를 약제학적 치료로 처리하는 것, 예를 들어 질환의 적어도 하나의 증상이 예방되게 하는 약물의 투여, 즉 이것이 원치않는 병증의 발생에 대해 숙주를 보호하도록 원치않는 병증(예를 들어, 숙주 동물의 질환 또는 다른 원치않는 상태)의 임상 표출 전에 투여되는 것을 의미한다. 질환을 "예방한다"는 또한 "예방" 또는 "예방학적 치료"로 칭해질 수 있다.
- [0083] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "실질적으로 동일한"(또는 "실질적으로 상동성")은 제1 아미노산 및 제2 아미노산 또는 핵산 서열이 유사한 활성, 예를 들어 결합 활성, 결합 선호도 또는 생물학적 활성을 갖도록 (또는 이를 가지는 단백질을 코딩하도록), 제2 아미노산 또는 핵산 서열과 동일한 또는 동등한(예를 들어, 유사한 측쇄, 예를 들어 보존된 아미노산 치환을 가짐) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 충분한 수를 포함하는 제1 아미노산 또는 핵산 서열을 의미하도록 본 명세서에서 사용된다. 항체의 경우에, 제2 항체는 동일한 특이성 및 동일한 항원에 비해 적어도 50%, 적어도 25% 또는 적어도 10%의 친화도를 가진다.
- [0084] 본 명세서에 개시된 서열에 대한 서열 유사성 또는 상동성(예를 들어, 적어도 약 85%의 서열 동일성)은 또한 본 원의 일부이다. 몇몇 실시형태에서, 서열 동일성은 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상일 수 있다.
- [0085] 또한, 핵산 분절이 가닥의 보체에 선택적 하이브리드화 조건(예를 들어, 매우 엄격한 하이브리드화 조건) 하에 하이브리드화할 때 실질적인 동일성이 존재한다. 핵산은 전체 세포 중에, 세포 용해물 중에 또는 부분 정제된 또는 실질적으로 순수한 형태로 존재할 수 있다.
- [0086] 생물중합체에 대한 모티프 서열은 아미노산이 변할 수 있는 위치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 상황에서 기호 "X"는 일반적으로 달리 기재되지 않은 한 임의의 아미노산(예를 들어, 임의의 20개의 천연 아미노산)을 의미하고, 예를 들어 임의의 비시스테인 아미노산을 의미한다. 다른 허용되는 아미노산은 또한 예를 들어 꿀호 및 슬래시를 사용하여 표시될 수 있다. 예를 들어, "(A/W/F/N/Q)"는 알라닌, 트립토판, 페닐알라닌, 아스파라긴 및 글루타민이 이 특정한 위치에서 허용된다는 것을 의미한다.
- [0087] 임의의 분야 공지된 방법에 의해 통계 유의성을 결정할 수 있다. 예시적인 통계 시험은 스튜던트 T-시험, 만 휘트니(Mann Whitney) U 비모수 시험 및 윌콕슨(Wilcoxon) 비모수 통계 시험을 포함한다. 몇몇 통계학적으로 유의적인 관계는 0.05 또는 0.02 미만의 P 값을 가진다. 2개의 상태 사이의 구별 가능한 정성적 또는 정량적 차이를 나타내는 예를 들어 용어 "유도한다", "저해한다", "강화한다", "상승시킨다", "증가시킨다", "감소시킨다" 등은 2개의 상태 사이의 차이, 예를 들어 통계학적으로 유의적인 차이를 의미할 수 있다.
- [0088] 본 명세서에 사용된 바대로, "샘플"은 대상체로부터의 조직, 예를 들어 혈액, 혈장 또는 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다. 샘플은 대상체로부터 취한 초기 비처리 샘플, 및 후속하여 처리된, 예를 들어 부분 정제된 또는 보존된 형태 둘 다를 포함한다. 예시적인 샘플은 혈액, 혈장, 눈물 또는 점액을 포함한다.
- [0089] "치료학적으로 효과적인 투약량"은 바람직하게는 비처리 대상체에 비해 통계학적으로 유의적인 정도 또는 적어도 약 20%, 더 바람직하게는 적어도 약 40%, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 60% 및 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 80%로, 측정 가능한 매개변수, 예를 들어 혈장 칼리크레인 활성을 조절한다. 측정 가능한 매개변수, 예를 들어 질환 관련 매개변수를 조절하는 화합물의 능력은 인간 장애 및 병증에서 효능을 예견하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 조성물의 이 특성은 실험실내 매개변수를 조절하는 화합물의 능력을 검사함으로써 평가될 수 있다.
- [0090] 대상체에서 질환(또는 병증)을 "치료하는" 또는 질환을 가지는 대상체를 "치료하는"은 질환의 적어도 하나의 증상이 치유되거나 경감되거나 감소하도록 대상체를 약제학적 치료로 처리하는 것, 예를 들어 약물의 투여를 의미한다.
- [0091] 대상체에서의 질환을 "예방하는"의 용어는 대상체를 약제학적 치료로 처리하는 것, 예를 들어 질환의 적어도 하나의 증상이 예방되게 하는 약물의 투여, 즉 이것이 원치않는 병증의 발생에 대해 숙주를 보호하도록 원치않는 병증(예를 들어, 숙주 동물의 질환 또는 다른 원치않는 상태)의 임상 표출 전에 투여되는 것을 의미한다. 질환을 "예방하는"은 또한 "예방" 또는 "예방학적 치료"로 칭해질 수 있다.
- [0092] "예방학적 유효량"은 원하는 예방학적 결과를 성취하는 데 필요한 효과적인 양, 투약량 및 기간을 의미한다. 통상적으로, 예방학적 용량이 질환 전에 또는 이의 초기 병기에 대상체에서 사용되므로, 예방학적 유효량은 치료학적 유효량보다 낮을 것이다.

- [0093] 알파벳 또는 숫자 도입부를 포함하는 도입부는 단지 이해 및 해석의 편의를 위한 것이고, 반대에 대한 명확한 표시의 부재 시, 제약인 순서 또는 선호도의 계급을 부여하지 않는다.
- [0094] **접촉 시스템 바이오마커**
- [0095] 혈장 칼리크레인은, 고분자량 키니노겐(HMWK)인, 기질에 주로 결합된 프리칼리크레인이라 불리는 비활성 지모겐으로서 순환한다. 자극에 반응하여, FXII는 FXIIa에 활성화된다. FXIIa는 프리칼리크레인을 절단하여 활성 혈장 칼리크레인을 형성한다(도 1). 순환 프리칼리크레인 중 대략 75-90%는 HMWK의 도메인 6과의 비활성 부위 상호작용을 통해 HMWK에 결합한다. 유리 및 HMWK 결합 활성 pKal은 절단된 HMWK 및 브래디키닌을 생성한다. 혈장 칼리크레인 활성화의 바이오마커는 표 2에 기재되어 있다. 바이오마커의 적합성은 HAE의 급성 공격의 존재 및 부재 하에 하기 이의 수준에 의해 입증될 수 있다. 이들 바이오마커의 수준은 브래디키닌 매개 부종 또는 pKal 활성에 의해 매개된 다른 질환의 공격 동안 또한 변경될 수 있다.
- [0096] 하기 표 2는 pKal 또는 브래디키닌 매개 장애에 대해 대상체를 평가하기 위해 표 2 및 본 명세서에 그 외에 기재된 방법에 의해 평가될 수 있는 마커를 제공한다. 표 2는 pKal 또는 브래디키닌 매개 장애와 연관된 마커의 수준의 변화의 방향을 표시한다.
- [0097] **바이오마커를 위한 검정법**
- [0098] 본 명세서에 개시된 바이오마커의 수준(예를 들어, 양), 또는 본 명세서에 개시된 바이오마커의 수준의 변화는 본 명세서에 기재된 검정법 및/또는 당해 분야에 공지된 검정법을 이용하여 평가될 수 있다. 바이오마커의 수준을 평가하기 위해 사용될 수 있는 검정법은 예를 들어 면역검정법, 예를 들어 웨스턴 블로트, 효소 결합 면역흡착 검정법(ELISA)(예를 들어, 샌드위치 ELISA), 방사선면역검정법, 전기화학발광 기반 검출 검정법, 및 관련 기법을 포함한다. 질량 분광법 기반 접근법을 또한 사용할 수 있다. 발색 기질에 의존하는 검정법을 또한 사용할 수 있다.
- [0099] 몇몇 실시형태에서, 전기화학발광 검출 검정법 또는 전기화학발광 및 패턴화 어레이 기술의 조합에 의존하는 검정법을 이용한다(예를 들어, ECL 또는 MULTI-ARRAY 기술 검정법(Meso Scale Discovery(MSD)사제)).
- [0100] (i) **프리칼리크레인**
- [0101] 프리칼리크레인 수준은 프리칼리크레인을 위한 기존의 검정법, 예를 들어 면역검정법, 예를 들어 프리칼리크레인 ELISA를 이용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, 프리칼리크레인 ELISA 키트는 antibodiesonline.com(카탈로그 ABIN858073호)로부터 상업적으로 구입 가능하다. 프리칼리크레인에 결합하는 항체는 당해 분야에 공지되어 있고, 프리칼리크레인의 검출을 위해 예를 들어 면역검정법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 첫과 단일클론 항-인간 프리칼리크레인 항체를 제조한다. 예를 들어, 문헌[Veloso, D. et al. *Blood*, 1987, 70(4):1053-62]을 참조한다. 양 항-인간 프리칼리크레인 항체는 GenWay Biotech, Inc.(GenWay ID: GWB-58AC79)로부터 상업적으로 구입 가능하다.
- [0102] 일 실시형태에서, 샘플의 분취량에서 pKal의 수준이 결정된다. 이후, 샘플의 분취량에서 모든 프리칼리크레인은 pKal로 전환되고, pKal의 수준이 측정된다. 첫 번째 것을 두 번째 것으로부터 공제하여 프리칼리크레인의 양을 생성한다. 수준의 결정은 효소 활성에 의해 만들어질 수 있다.
- [0103] (ii) **활성 혈장 칼리크레인**
- [0104] 활성 혈장 칼리크레인(활성 pKal)은 예를 들어 면역검정법을 이용하여 결정될 수 있다. 면역검정법은 활성 혈장 칼리크레인, 예를 들어 DX-2930 또는 DX-2922 등에만 결합하는 항체를 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, 검정법은 포획 시약, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 예를 들어 DX-88과 서열이 유사한 폴리펩타이드, 예를 들어 DX-88과 1개, 2개 또는 5개 이하의 아미노산 잔기가 다른 것, 예를 들어 EPIKAL-2에 대한 활성 pKal의 결합에 의존한다.
- [0105] 일 실시형태에서, 포획 시약은 기질에 제공되고, 샘플과 접촉되고, 포획 시약에 결합된 양은 예를 들어 항-pKal 항체에 의해 결정된다. 일 실시형태에서, 샘플의 샘플 취급, 예를 들어 하나의 용기로부터 또 다른 용기로의 이동은 최소화되어서, 접촉 활성화의 수준을 감소시킨다. 일 실시형태에서, 포획 시약은 동일한 장치, 예를 들어 수집 용기, 예를 들어 대상체로부터 혈액과 같은 샘플을 수집하기 위해 사용되는 혈액 수집 관에 배치된다.
- [0106] (i) 대상체로부터 혈장 샘플을 제공하는 단계; (ii) 혈장 샘플을 pKal 기질의 존재 하에 pKal 시스템 활성화제와 항온처리하는 단계(여기서, 기질은 pKal에 의해 절단된 후 검출 가능한 신호를 방출할 수 있는 라벨에 부착

됨); 및 (iii) 검출 가능한 신호의 규모에 기초하여 pKal의 활성을 측정하는 단계를 포함할 수 있는, pKal 활성을 결정하기 위한 생체외 활성화 검정법(예를 들어, 마이크로플레이트 기반 pKal 활성 검정법)이 또한 본 개시 내용 내에 있다. 몇몇 예에서, 활성화제는 FXIIa 인자이다. 몇몇 예에서, 혈장 샘플은 활성화제, pKal 기질 및 pKal 저해제 후보와 항온처리된다. 상기 방법은 pKal 저해제 후보의 활성을 평가하는 단계를 추가로 포함할 수 있고, pKal 저해제 후보의 부재 하의 pKal 활성의 수준에 비해 pKal 저해제 후보의 존재 하의 pKal 활성의 수준의 감소는 저해제 후보가 효과적이라는 것을 나타낸다.

표 2. KMA와 연관된 바이오마커

바이오마커	검정법	정상에 대한 HAE 환자에서의 기준 수준	접촉 활성화로 인한 Δ	설명
프리칼리크레인	ELISA 또는 효소 활성	비변경 (약 500nM)	감소	프리칼리크레인은 활성 칼리크레인으로 전환될 수 있거나, 프리칼리크레인을 검출하는 ELISA를 사용할 수 있다. 이 접근법은 환자 수준에서의 개별 변동으로 인해 복잡할 수 있고, 활성 pKal에 특이적인 항체와 경쟁할 것이다.
활성 pKal	ELISA 또는 효소 활성	예측되지 않음	증가	활성 pKal에 특이적인 항체(예를 들어, DX-2930, DX-2922)는 혈장에서 활성 pKal의 검출을 위한 면역검정에서 사용될 수 있다. 그러나, 이 접근법은 제한을 가진다. 혈장에서의 활성 pKal은 α -2-마크로글로불린 (α 2M)과 복합체 형성하는 것으로 보이고, 이것은 몇몇 항체의 pKal에서 에피토프에 대해 경쟁하는 것으로 보인다. 순환 pKal은 활성 부위에 대한 항체에 특이적인 본 발병자들의 pKal의 결합을 방해하지 않는 상호작용을 통해 HMWK에 대부분 결합한다. 더구나, 소정의 처리된 샘플에서 중재로 실시될 수 있다.
α 2M-pKal 복합체	ELISA 또는 MSD	최근 공격 시 상승할 수 있음	증가	α 2M-pKal 복합체는 HAE 공격 및 폐혈증 동안 상승한다.
C1INH-pKal 복합체	ELISA 또는 MSD	최근 공격 시 상승할 수 있음	증가	C1INH-pKal 복합체는 심폐 바이패스 동안 상승한다. C1INH 저해제 복합체는 신속히 청소될 수 있다. 그 결과, 공격 이후 샘플링 시간에 상승을 감출하기 위해 면역검정은 충분히 민감해야 한다.
온전한 HMWK	ELISA	비변경	감소	카니노겐 결핍 혈장에 의한 APTT 또는 면역검정을 사용하여 온전한 카니노겐을 측정하기 위해 시험에 이용 가능하다: www.diapharma.com/downloads/68201025811.pdf
절단된 HMWK	ELISA	비변경	증가	절단된 카니노겐은 HAE 공격 동안 약 47%의 전체 카니노겐으로 증가할 수 있다. - 절단된 카니노겐은 또한 폐혈증, 간경변 동안 상승한다. 검정법은 a) 온전한 카니노겐과 반대인 절단된 카니노겐에 특이적인 항체; 또는 b) 절단된 및 온전한 카니노겐을 분리하고 정량화할 수 있는 검정 포랫(예를 들어, 웨스턴 블로트)을 사용할 수 있다. 이 검정법은 순환 항-pKal 항체에 민감하지 않을 것이고, 세포 표면 결합 활성 pKal이 국제화된 브래더기니N 매개 혈관부종에서 주요 범인인자에 의존하지 않는다.

[0107]

[0108]

상기 방법은 대상체가 pKal과 연관된 질환을 가지거나 이의 위험에 있는지를 평가하는 단계를 또한 추가로 포함할 수 있고; 미리 결정된 값(예를 들어, 건강한 대상체 또는 건강한 대상체의 접단으로부터의 샘플(들)에서 pKal 활성의 수준)과 비교하여 pKal 활성의 수준 상승은 대상체가 질환을 가지거나 이의 위험에 있다는 것을 나타낸다.

[0109]

상기 방법은 치료, 예컨대 pKal과 연관된 질환을 위한 치료의 효능을 평가하는 것을 또한 추가로 포함할 수 있다. 복수의 생체샘플(예를 들어, 혈장 샘플)은 pKal 관련 질환, 예컨대 HAE를 가지고 치료 전에, 치료의 과정 동안 및/또는 치료 후에 치료제, 예컨대 pKal 저해제에 의해 치료되는 환자로부터 얻어질 수 있다. 이 생체샘플에서 pKal 활성 또는 pKal 활성을 나타내는 바이오마커의 수준은 본 명세서에 개시된 임의의 검정 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 치료 전의 것과 비교하여 pKal 활성의 수준 감소 또는 pKal 활성을 나타내는 하나 이상의 바이오마커의 수준 감소 또는 치료의 과정에 걸쳐 pKal 활성/바이오마커의 수준 감소는 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0110]

(iii) α 2M-pKal 복합체

[0111]

혈장 칼리크레인 알파 2 마크로글로불린 복합체(α 2M-pKal 복합체)는 예를 들어 면역검정법을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 샌드위치 기반 ELISA 검정법은 실시예 2에 기재된 바대로 개발되었다. 정량적 샌드위치 ELISA는 문헌[Kaufman, N. et al., Blood, 1991, 77(12):2660-2667 및 Wachtfogel, Y.T. et al., 1989, Blood, 73:468-471]에 보고되어 있다. 면역부동화 효소 검정법은 문헌[Harpel, P.C. et al., J Biol Chem, 1985, 260(7):4257-63]에 보고되어 있다. 발색 기질 검정법은 예를 들어 chromogenicsubstrates.com에서 이용 가능한 발색 기질 S-2302 및 chromogenicsubstrates.com/methods/chromogenic_substrates_methods_kallikrein-like.htm에서 제공된 프로토콜을 사용하여 또한 사용될 수 있다.

[0112]

(iv) C1INH-pKal 복합체

[0113]

C1INH-pKal 복합체는 예를 들어 면역검정법, 예를 들어 ELISA 방법, 예를 들어 실시예 3에 기재된 방법을 이용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 샌드위치 ELISA(여기서, 항-pKal 항체(예를 들어, 마우스 mAb 13G11)는 포획 항체이고, C1INH에 대한 항체는 검출기 항체로서 사용됨), 또는 샌드위치 ELISA(여기서, C1INH에 대한 항체는

포획 항체로서 사용되고, 항-pKal 항체(예를 들어, 마우스 mAb 13G11)는 검출기 항체임)를 사용할 수 있다. C1INH에 대한 항체는 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간 C1 저해제에 대한 마우스 단일클론 항체는 ABBIOTEC(카탈로그 250122호)으로부터 구입 가능하다. 인간 C1 저해제(4G12)에 대한 또 다른 마우스 단일클론 항체는 pierce-antibodies.com(제품 LF-MA0136호)으로부터 구입 가능하다. 염소 항-인간 C1 저해제 항체는 Quidel(카탈로그 A300호)로부터 구입 가능하다. C1INH-pKal 복합체의 검출을 위한 또 다른 ELISA 샌드위치 검정법은 문헌[Wachtfogel, Y.T. et al., 1989, Blood, 73:468-471]에서 사용된다.

[0114] (v) 온전한 HMWK

[0115] 온전한 고분자량 키니노겐(HMWK)은 예를 들어 응고제 또는 면역학적 방법, 예를 들어 방사선면역검정법을 이용하여 평가될 수 있다(예를 들어, 문헌[Kerbiriou-Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2):2734-86] 참조). 인간 HMWK의 경쇄에 대한 단일클론 항체가 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Reddigarai, S.R. & Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74:695-702]을 참조한다. 발색 기질에 의존하는 HMWK에 대한 검정법을 또한 이용할 수 있다. 예를 들어 문헌[Scott, C.F. et al. Thromb Res, 1987, 48(6):685-700; Gallimore, M.J. et al. Thromb Res, 2004, 114(2):91-96]을 참조한다.

[0116] HMWK를 코딩하는 인간 유전자는 키니노겐 1(KNG1)이다. KNG1은 전사되고 대안적으로 스플라이싱되어 HMWK 또는 저분자량 키니노겐(LMWK)을 코딩하는 mRNA를 형성한다. HMWK의 예시적인 단백질 서열이 하기 제공된다:

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

```
MKLITILFLCSRLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKYNSQNQSNNQFVLYRITEATKTVGSDFYFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTQCIITPAEGPVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTN SPELEE TLTHITTKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKLGQSLD CNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGIKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHHEQQHGLGHGHFKFLDDLEHQGGHVLDHGHHKHKHGHHGKHKNGKGKNGKHNGWKTTEHLASSSEDSTTPSAQTQEKTGPTIPSIAKPGVTVTFSDFQDSLATMMPPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNLISFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVEINPTTQMKESEYYFDLTDGLS (서열 번호 5)
```

[0117] [0118] (iv) 절단된 HMWK

[0119] 또한 본 명세서에서 "절단된 키니노겐"이라 칭하는 절단된 고분자량 키니노겐(HMWK)은 예를 들어 실시예 1에 기재된 방법, 예를 들어 웨스턴 블로트를 이용하여 평가될 수 있다. 마우스 mAb 클론 11H05 등과 같은 절단된 HMWK에 특이적으로 결합하는 항체를 사용할 수 있다. 부가적으로, 절단된 HMWK는 질량 분광법을 이용하여 평가될 수 있다. 절단된 HMWK의 수준을 평가하기 위한 면역블로팅 기법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Buhler R. et al. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(3):223-232]을 참조한다.

[0120] 절단된 키니노겐의 중쇄 및 경쇄의 예시적인 서열은 하기 제공된다.

> 절단된 키니노겐-1 중쇄

```
QESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKYNSQNQSNNQFVLYRITEATKTVGSDFYFYSFKYEIKEGDCPVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTQCIITPAEGPVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPTN SPELEE TLTHITTKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMKESEYYFDLTDGLS (서열 번호 6)
```

> 절단된 키니노겐-1 경쇄

SSRIGEIKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRHWDGHEKQRKHNLGHGHKHER
DQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGHFKLDDDLEHQGGHVLDHGHHKHHGHGHGKHKNK
GKNGKHNGWKTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTGPTIPS LAKPGVTVTFSDFQDSLIA
ATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTS PKCPGRPWSVSEINPTT
QMKESEYYFDLT DGLS (서열 번호 7)

[0122]

[0123] 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용은 생체외 활성화 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (i) 대상체로부터 얻은 혈장 샘플을 혈장 칼리크레인(pKal) 시스템의 활성화제(예를 들어, FXIIa 인자)와 항온처리하는 단계; (ii) 항온처리 전에 및 후에 혈장 샘플에서 온전한 고분자량 키니노겐(HMWK), 절단된 HMWK, 또는 둘 다의 수준을 측정하는 단계; 및 (iii) 활성화 후 샘플에서 온전한 HMWK의 감소를 결정하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 예에서, 온전한 HMWK 및 절단된 HMWK의 수준은 웨스턴 블롯 분석, 예를 들어 심플 웨스턴(상표명) 프로테인 심플(등록상표) 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정된다. 심플 웨스턴(상표명) 검정법은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Rustandi et al. Electrophoresis. 2012 Sep;33(17):2790-7] 참조). 심플 웨스턴(상표명) 제품은 또한 상업적으로 구입 가능하다(예를 들어, 프로테인심플(캘리포니아주 산타 클라라) 참조).

[0124]

본 명세서에 기재된 바와 같은 생체외 활성화 방법은 혈장 활성화를 저해하는 데 있어서 pKal 저해제 후보의 활성을 평가하도록 사용될 수 있다. 더 구체적으로, 혈장 샘플은 pKal 저해제 후보의 존재 하에 활성화제와 항온처리될 수 있다. 활성화 수준이 저해제 후보의 존재 하에 감소하면, 이것은 후보가 혈장 활성화를 저해하는 데 있어서 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0125]

[0125] 다른 실시형태에서, 본 개시내용은 내인성 절단된 HMWK를 측정하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 (i) 대상체로부터 혈장 샘플을 제공하는 단계; 및 (ii) 혈장 샘플에서 절단된 HMWK의 수준을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 몇몇 예에서, 절단된 HMWK의 수준은 프로테인 심플 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정된다.

[0126]

내인성 절단된 HMWK 검정법은 pKal 시스템과 연관된 질환, 예를 들어 본 명세서에 기재된 것을 가지거나 이를 가지는 것으로 의심되는 대상체를 확인하기 위해 이용될 수 있다. 몇몇 예에서, 혈장 샘플은 pKal 시스템과 연관된 질환을 가지거나 이를 가지는 것으로 의심되는 대상체로부터 얻어진다. 대상체에서의 내인성 절단된 HMWK가 건강한 대상체로부터의 것과 비교하여 상승할 때, 이것은 대상체가 질환을 가지거나 이를 가지는 것으로 의심된다는 것을 나타낸다.

[0127]

[0127] 대안적으로 또는 또한, 내인성 절단된 HMWK 검정법은 pKal 시스템과 연관된 질환을 위한 치료의 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 이 경우, 혈장 샘플은 질환을 가지는 대상체로부터 얻어지고, pKal 저해제에 의해 치료된다. 절단된 HMWK의 수준의 감소가 치료 전의 것과 비교하여 치료 후에 관찰되는 경우, 이것은 pKal 저해제가 효과적이라는 것을 나타낸다.

[0128]

추가의 대안 또는 추가로서, 검정법은 대상체가 pKal과 연관된 질환을 가지거나 이의 위험에 있는지를 평가하기 위해 또한 사용될 수 있고; 미리 결정된 값(예를 들어, 건강한 대상체 또는 건강한 대상체의 집단으로부터의 샘플(들)에서 절단된 HMWK의 수준)과 비교하여 절단된 HMWK의 수준 상승은 대상체가 질환을 가지거나 이의 위험에 있다는 것을 나타낸다.

[0129]

상기 방법은 치료, 예컨대 pKal과 연관된 질환을 위한 치료의 효능을 평가하는 단계를 또한 추가로 포함할 수 있다. 복수의 생체샘플(예를 들어, 혈장 샘플)은 pKal 관련 질환, 예컨대 HAE를 가지고, 치료 전에, 치료의 과정 동안 및/또는 치료 후에 치료제, 예컨대 pKal 저해제에 의해 치료된 환자로부터 얻어질 수 있다. 이 생체샘플에서 온전한 HMWK 및/또는 절단된 HMWK의 수준은 본 명세서에 개시된 임의의 검정 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 치료의 전의 것과 비교하여 절단된 HMWK의 수준 감소 또는 치료의 과정에 걸친 절단된 HMWK의 수준 감소는 치료가 효과적이라는 것을 나타낸다.

항체

[0130]

[0131] 항체 및 항원 결합 단편은 제공된 방법에서 사용될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 포획체는 항체 또는 항원 결합 단편이고 이를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 검출체는 항체 또는 항원 결합 단편이고 이를 포함한다. 몇몇 실시형태에서, pKal 매개 또는 브래디키닌 매개 장애의 치료를 위한 치료학적 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편이고 이를 포함한다.

- [0132] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 용어 "항체"는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함하는 단백질을 의미한다. 예를 들어, 항체는 중쇄(H) 가변 구역(본 명세서에서 VH로 축약), 및 경쇄(L) 가변 구역(본 명세서에서 VL이라 축약)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 항체는 2개의 중쇄(H) 가변 구역 및 2개의 경쇄(L) 사슬 가변 구역을 포함한다. 용어 "항체"는 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, 단일 사슬 항체, Fab 및 sFab 단편, F(ab')₂, Fd 단편, Fv 단편, scFv 및 도메인 항체(dAb) 단편(de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3):629-39) 및 완전한 항체를 포함한다. 항체는 IgA, IgG, IgE, IgD, IgM(및 이의 아형)의 구조적 특징을 가질 수 있다. 항체는 임의의 공급원 유래일 수 있지만, 영장류(인간 및 비인간 영장류) 및 영장류화가 바람직하다.
- [0133] VH 및 VL 구역은 "프레임워크 구역"("framework region: FR")이라 칭하는 더 보존된 구역 사이의 "상보성 결정 구역"("complementarity determining region: CDR")이라 칭하는 초가변 구역으로 추가로 세분될 수 있다. 프레임워크 구역 및 CDR의 정도는 정확히 정의되어 있다(문헌[Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition*, U.S. Department of Health and Human Services, NIH 간행물 91-3242호, 및 Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917] 참조, 또한 www.hgmp.mrc.ac.uk 참조). 카밧 정의가 본 명세서에서 사용된다. 각각의 VH 및 VL은 통상적으로, 아미노 말단으로부터 카복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 배열된, 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다.
- [0134] 항체의 VH 또는 VL 사슬은 중쇄 또는 경쇄 불변 구역의 전부 또는 일부를 추가로 포함하여 각각 중쇄 또는 경쇄 면역글로불린 사슬을 형성할 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 2개의 중쇄 면역글로불린 사슬 및 2개의 경쇄 면역글로불린 사슬의 사합체이고, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 사슬은 예를 들어 이황화 결합에 의해 상호 연결된다. IgG에서, 중쇄 불변 구역은 CH1, CH2 및 CH3인 3개의 면역글로불린 도메인을 포함한다. 경쇄 불변 구역은 CL 도메인을 포함한다. 중쇄 및 경쇄의 가변 구역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 구역은 통상적으로 전통적인 보체 시스템의 제1 성분(Clq) 및 면역계(예를 들어, 이팩터 세포)의 다양한 세포를 포함하는, 숙주 조직 또는 인자에 대한 항체의 결합을 매개한다. 면역글로불린의 경쇄는 카파 또는 람다의 유형일 수 있다. 일 실시형태에서, 항체는 글라이코실화된다. 항체는 항체 의존적 세포독성 및/또는 보체 매개 세포 독성에 대해 기능적일 수 있다.
- [0135] 항체의 하나 이상의 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 CDR은 인간, 예를 들어 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2 및 LC CDR3일 수 있다. 각각의 경쇄 CDR은 인간일 수 있다. HC CDR3은 인간일 수 있다. 하나 이상의 프레임워크 구역은 인간, 예를 들어 HC 또는 LC의 FR1, FR2, FR3 및 FR4일 수 있다. 예를 들어, Fc 구역은 인간일 수 있다. 일 실시형태에서, 모든 프레임워크 구역은 인간이고, 예를 들어 인간 체세포 세포, 예를 들어 면역글로불린을 생성하는 조혈 세포 또는 비조혈 세포에 의해 생성된 항체의 프레임워크의 서열을 가진다. 일 실시형태에서, 인간 서열은 예를 들어 생식선 혁산에 의해 코딩된 생식선 서열이다. 일 실시형태에서, 선택된 Fab의 프레임워크(FR) 잔기는 가장 유사한 영장류 생식선 유전자, 특히 인간 생식선 유전자에서 상응하는 잔기의 아미노산 유형으로 전환될 수 있다. 하나 이상의 불변 구역은 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다. 예를 들어, 면역글로불린 가변 도메인, 불변 구역, 불변 도메인(CH1, CH2, CH3, CL1), 또는 전체 항체의 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 98% 또는 100%는 인간 또는 효과적으로 인간일 수 있다.
- [0136] 항체의 전부 또는 일부는 면역글로불린 유전자 또는 이의 분절에 의해 코딩될 수 있다. 예시적인 인간 면역글로불린 유전자는 카파, 람다, 알파(IgA1 및 IgA2), 감마(IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), 델타, 엡실론 및 뮤 불변 구역 유전자, 및 많은 면역글로불린 가변 구역 유전자를 포함한다. 전장 면역글로불린 "경쇄"(약 25KDa 또는 약 214개의 아미노산)는 NH₂ 말단(약 110개의 아미노산)에서 가변 구역 유전자에 의해 코딩되고, COOH- 말단에서 카파 또는 람다 불변 구역 유전자에 의해 코딩된다. 전장 면역글로불린 "중쇄"(약 50KDa 또는 약 446개의 아미노산)는 유사하게 가변 구역 유전자(약 116개의 아미노산) 및 다른 상기 언급된 불변 구역 유전자 중 하나, 예를 들어 (약 330개의 아미노산을 코딩하는) 감마에 의해 코딩된다. HC CDR3이 약 3개의 아미노산 잔기로부터 35개 초과의 아미노산 잔기로 변하므로, 인간 HC의 길이가 상당히 변한다.
- [0137] 전장 항체의 용어 "항원 결합 단편"은 관심 있는 표적에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 전장 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. 전장 항체의 용어 "항원 결합 단편" 내에 포함된 결합 단편의 예는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 헌지 구역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al., (1989)

Nature 341:544-546); 및 (vi) 작용성을 보유하는 단리된 상보성 결정 구역(CDR)을 포함한다. 더욱이, VL 및 VH인 Fv 단편의 2개의 도메인이 별개의 유전자에 의해 코딩되더라도, 이들이, 단일 사슬 Fv(scFv)로서 공지된 1가 분자를 형성하도록 VL 및 VH 구역이 쌍을 지은, 단일 단백질 사슬을 만들게 하는, 합성 링커에 의해 재조합 방법을 이용하여 이들은 연결될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,260,203호, 제4,946,778호 및 제4,881,175호; 문헌[Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883]을 참조한다.

[0138] 항체 단편은 당해 분야의 당업자에게 공지된 종래의 기술을 포함하는 임의의 적절한 기술을 이용하여 얻어질 수 있다. 용어 "단일특이적 항체"는 특정한 표적, 예를 들어 에피토프에 대해 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타내는 항체를 의미한다. 이 용어는 "단일클론 항체" 또는 "단일클론 항체 조성물"(이는 항체가 어떻게 생성되는지와 무관하게 본 명세서에 사용된 바대로 단일 분자 조성물의 항체 또는 이의 단편 제제를 의미함)을 포함한다.

[0139] 본 명세서에 사용된 바대로, "인간화" 면역글로불린 가변 구역은, 면역글로불린 가변 구역이 정상 인간에서 면역원성 반응을 발생시키지 않도록, 충분한 수의 인간 프레임워크 아미노산 위치를 포함하도록 변형된 면역글로불린 가변 구역을 의미한다. "인간화" 면역글로불린의 상세내용은 예를 들어 미국 제6,407,213호 및 미국 제5,693,762호를 포함한다.

[0140] 저해 상수(K_i)는 저해제 효력의 측정치를 제공하고; 이것은 효소 활성을 반으로 감소시키는 데 필요한 저해제의 농도이고, 효소 또는 기질 농도에 의존하지 않는다. 겉보기 $K_i(K_{i,app})$ 는 반응의 정도(예를 들어, 효소 활성)에 대한 상이한 농도의 저해제(예를 들어, 저해 결합 단백질)의 저해 효과를 측정함으로써; 모리슨 식(Morrison equation)(식 1)에 대한 저해제 농도의 함수가 겉보기 K_i 값의 예측치를 생성하면서, 유사-1차 속도 상수의 변화를 맞춤으로써, 상이한 기질 농도에서 얻어진다. K_i 는 기질 농도에 대한 $K_{i,app}$ 의 도면의 선형 회귀 분석으로부터 추출된 y 절편으로부터 얻어진다.

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

[0141]

[0142] 식 중, v = 측정된 속도; v_o = 저해제의 부재 하의 속도; $K_{i,app}$ = 겉보기 저해 상수; I = 전체 저해제 농도; 및 E = 전체 효소 농도.

[0143]

유전성 혈관부종(HAE)

[0144] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레이ن 활성을 포함하는 질환 또는 병증은 유전성 혈관부종(HAE)이다. 유전성 혈관부종(HAE)은 또한 "퀸케(Quincke) 부종", C1 에스터라제 저해제 결핍증, C1 저해제 결핍증 및 유전성 혈관신경성 부종(HANE)으로 공지되어 있다. HAE는 예를 들어 사지, 얼굴, 생식기, 위장관 및 기도에 영향을 미칠 수 있는 심각한 종창(혈관부종)의 재발성 삽화를 특징으로 한다. HAE의 증상은 예를 들어 팔, 다리, 입술, 눈, 혀 및/또는 목의 종창; 목 종창 및 갑작스런 목쉼을 포함할 수 기도 폐색; 명확한 원인이 없는 복부 경련의 반복 삽화; 및/또는 장의 종창(증증일 수 있고, 복부 경련, 구토, 탈수, 설사, 통증 및/또는 쇼크를 발생시킬 수 있음)을 포함한다. 이 HAE를 가지는 개인의 약 1%이 공격 동안 윤곽성 홍반이라 불리는 가렵지 않은 발진을 전개 시킨다.

[0145] 기도의 종창은 삶을 위협할 수 있고, 몇몇 환자에서 사망을 야기한다. 사망률은 15-33%로 추정된다. HAE는 매년 약 15,000 내지 30,000개의 응급실 방문을 발생시킨다.

[0146] 외상 또는 스트레스, 예를 들어 치아 시술, 질병(예를 들어, 바이러스 질병, 예컨대 감기 및 독감), 월경 및 수술은 혈관부종의 공격을 촉발할 수 있다. HAE의 급성 공격을 예방하기 위해, 환자는 이전에 야기된 공격을 가지는 특수 자극을 피하도록 시도할 수 있다. 그러나, 많은 경우에, 공지된 촉발물질 없이 공격이 발생한다. 통상적으로, HAE 증상은 처음에 어린이에서 나타나고, 사춘기 동안 악화된다. 대체로, 치료되지 않은 개인은 1주 내지 2주마다 공격을 갖고, 대부분의 삽화는 약 3일 내지 4일 동안 지속한다 (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema). 공격의 빈도 및 기간은 유전성 혈관부종을 가지는 사람 중에서, 심지어 동일한 가족의 사람 중에서 매우 변한다.

[0147] I형, II형 및 III형으로 공지된 3개의 유형의 HAE가 존재한다. HAE가 50,000명 중 1명의 사람에게 영향을 미치

고, I형이 사례의 약 85%를 차지하며, II형이 사례의 약 15%를 차지하고, III형이 매우 희귀한 것으로 추정된다. III형이 가장 새로 기재된 형태이고, 원래 여성에게만 발생하는 것으로 생각되었지만, 이환된 남성을 가지는 가족이 확인되었다.

[0148] HAE는 상염색체 우성 패턴으로 유전되어서, 이환된 사람은 1명의 이환된 부모로부터 돌연변이를 유전 받을 수 있다. 돌연변이의 새로운 유전자가 또한 발생할 수 있고, 따라서 HAE는 이의 가족에서 장애의 병력을 갖지 않은 사람에서 또한 발생할 수 있다. 사례의 20-25%는 새로운 자발적 돌연변이로부터 생기는 것으로 추정된다.

[0149] 세르핑(SERPING)1 유전자의 돌연변이는 유전성 혈관부종 I형 및 II형을 발생시킨다. 세르핑1 유전자는 염증을 조절하는 데 중요한 C1 저해제 단백질을 만드는 명령을 제공한다. C1 저해제는 염증을 촉진하는 소정의 단백질의 활성을 차단한다. 유전성 혈관부종 I형을 발생시키는 돌연변이는 혈액 중 C1 저해제의 수치를 감소시킨다. 반대로, II형을 발생시키는 돌연변이는 비정상적으로 작용하는 C1 저해제를 생성시킨다. 적절한 수치의 기능적 C1 저해제 없이는, 과도한 양의 브래디키닌이 생성된다. 브래디키닌은 혈관벽을 통해 신체 조직으로 유체의 누출을 증가시킴으로써 염증을 촉진한다. 신체 조직에서의 과도한 유체 축적은 유전성 혈관부종 I형 및 II형을 가지는 개인에서 보이는 종창의 삽화를 발생시킨다.

[0150] F12 유전자의 돌연변이는 유전성 혈관부종 III형의 몇몇 경우와 연관된다. F12 유전자는 응고 XII 인자를 만드는 명령을 제공한다. 혈액 응고(응혈)에서의 중요한 역할 이외에, XII 인자는 또한 염증의 중요한 자극제이고, 브래디키닌의 생성에 관여한다. F12 유전자의 소정의 돌연변이는 활성이 증가한 XII 인자를 생성시킨다. 그 결과, 더 많은 브래디키닌이 생성되고, 혈관벽은 더 누출이 되어, 종창의 삽화를 발생시킨다. 유전성 혈관부종 III형의 다른 원인은 공지되어 있지 않다. 하나 이상의 아직 확인되지 않은 유전자의 돌연변이는 이 경우에 장애에 원인이 될 수 있다.

[0151] HAE는 알레르기 또는 다른 의학 병증으로부터 생긴 혈관부종의 다른 형태와 유사하게 존재할 수 있지만, 이것은 원인 및 치료에서 상당히 다르다. 유전성 혈관부종이 알레르기로 오진될 때, 이것은 항히스타민, 스테로이드 및 /또는 에피네프린(통상적으로 HAE에서 비효과적이지만, 에피네프린은 삶을 위협하는 반응에 사용될 수 있음)으로 가장 흔히 치료된다. 오진은 또한 복부 종창을 가지는 환자에 대해 불필요한 시험적 수술을 발생시키고, 몇몇 HAE 환자에서 복부 통증은 정신신체증(psychosomatic)으로 부정확하게 진단된다.

[0152] C1 저해제 치료제, 및 HAE에 대한 다른 치료제는 문헌[Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925]에 기재되어 있다.

[0153] HAE 공격의 급성 치료는 가능한 빨리 부종의 진행을 중지시키도록 제공된다. 정맥내 투여되는 공여자 혈액으로부터의 C1 저해제 농축물은 하나의 급성 치료이지만; 이 치료는 많은 나라에서 이용 가능하지 않다. C1 저해제 농축물이 이용 가능하지 않은 응급 상황에서, 새로 냉동된 혈장(fresh frozen plasma: FFP)이 또한 C1 저해제를 함유하므로, 이를 대안으로서 사용할 수 있다.

[0154] 유럽에서 1979년 이후로 인간 혈액으로부터 유래한 정제된 C1 저해제가 사용되었다. 몇몇 C1 저해제 치료제가 미국에서 현재 이용 가능하고, 2종의 C1 저해제 제품이 캐나다에서 현재 이용 가능하다. 급성 공격을 위해 2009년에 식품의약청(F.D.A.)이 살균된 베리너트 P(CSL Behring)를 허가하였다. 예방을 위해 2008년에 식품의약청이 나노여과된 신리지(Cinryze)(ViroPharma)를 허가하였다. 루신(Rhucin)(Pharming)은 인간 혈액 매개 병원균으로 인해 감염성 질환 전달의 위험을 보유하지 않는 개발 하에 재조합 C1 저해제이다.

[0155] 급성 HAE 공격의 치료는 또한 통증 경감을 위한 약제 및/또는 IV 유체를 포함할 수 있다.

[0156] 다른 치료 양상은 C1 저해제의 합성을 자극하거나 C1 저해제 소비를 감소시킬 수 있다. 안드로겐 약제, 예컨대 다나졸은 C1 저해제의 생성을 자극함으로써 공격의 빈도 및 중증도를 감소시킬 수 있다.

[0157] 헬리코박터 파일로리(helicobacter pylori)는 복부 공격을 촉발할 수 있다. 에이치. 파일로리를 치료하는 항생제는 복부 공격을 감소시킬 수 있다.

[0158] 더 새로운 치료는 접촉 캐스케이드를 공격한다. 에칼란타이드(KALBITOR(등록상표), DX-88, Dyax)는 혈장 칼리크레인을 저해하고, 미국에서 승인되었다. 이카티반트(Icatibant)(FIRAZYR(등록상표), Shire)는 브래디키닌 B2 수용체를 저해하고, 유럽 및 미국에서 승인되었다.

[0159] HAE의 진단은 예를 들어 가족 병력 및/또는 혈액 시험에 의존할 수 있다. HAE I형, II형 및 III형과 연관된 실험실 발견은 예를 들어 문헌[Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925]에 기재되어 있다. 1형 HAE에서, C4의 수치와 같이 C1 저해제의 수치가 감소하지만, C1q 수치는 정상이다. 2형 HAE에서, C1 저해제

의 수치는 정상이거나 증가하지만; C1 저해제 기능은 비정상이다. C4 수치는 감소하고, C1q 수치는 정상이다. 3 형에서, C1 저해제, C4 및 C1q의 수치는 모두 정상일 수 있다.

[0160] HAE의 증상은, 예를 들어 질의서, 예를 들어 환자, 임상의 또는 가족 구성원이 완료한 질의서를 사용하여 평가될 수 있다. 이러한 질의서는 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어 육안 아날로그 스케일을 포함한다. 예를 들어, 문헌[McMillan, C.V. et al. Patient. 2012;5(2):113-26]을 참조한다.

다른 pKal 매개 또는 브래디키닌 매개 장애

[0162] 혈장 칼리크레인 활성과 관련된 다른 예시적인 질환 또는 병증은 비히스타민 독립적 특발성 혈관부종, 류마티스 성 관절염, 크론병, 루푸스, 알츠하이머병, 폐혈성 쇼크, 화상 손상, 뇌 허혈/관류 손상, 뇌 부종, 당뇨병성 망막병증, 당뇨병성 신경병증, 황반 부종, 혈관염, 동맥 또는 정맥 혈전증, 심실 보조 장치 또는 스텐트와 연관된 혈전증, 혈전증을 동반한 해파린 유도 혈소판 감소증, 혈전색전증 질환, 및 불안정 협심증을 동반한 관상 동맥 질환, 부종, 눈 질환, 통풍, 장 질환, 구강 점막염, 신경병증성 통증, 염증성 통증, 척추관 협착증-퇴행성 척추 질환, 수술후 장폐색, 대동맥 동맥류, 골관절염, 유전성 혈관부종, 폐 색전증, 뇌졸중, 머리 외상 또는 종양 주변 뇌 부종, 폐혈증, 급성 중대뇌동맥(MCA) 허혈성 사건(뇌졸중), 재협착증(예를 들어, 혈관성형술 후), 정신 홍반 루푸스 신염, 자가면역 질환, 염증성 질환, 심혈관 질환, 신경학적 질환, 단백질 미스풀딩과 연관된 질환, 혈관신생, 고혈압성 신경병증 및 당뇨병성 신경병증과 연관된 질환, 알레르기 및 호흡기 질환(예를 들어, 아나필락시스, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 급성 호흡기 불안 증후군, 낭성 섬유증, 지속성, 비염) 및 조직 손상(예를 들어, 화상 또는 화학 손상)을 포함한다.

치료

[0164] 검정 방법을 이용하여 확인된 것과 같은 pKal 매개 또는 브래디키닌 매개 장애, 예컨대 본 명세서에 기재된 것의 위험이 있거나 이를 겪는 대상체는 임의의 적절한 치료제에 의해 치료될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제공된 방법은 제공된 검정법의 결과, 예를 들어 바이오마커 검출에 기초하여 대상체에 대한 치료를 선택하는 단계를 포함한다.

[0165] 몇몇 실시형태에서, 상기 방법은, 검정법의 결과, 예를 들어 바이오마커 검출에 기초하여 대상체에게 투여하기 위한, 치료제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 칼리크레인 결합제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 브래디키닌 B2 수용체 길항제, 예를 들어 본 명세서에 기재된 바와 같은 C1-INH 대체 물질을 선택하는 단계 또는 투여하는 단계 중 하나 또는 둘 다를 포함한다.

[0166] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질 또는 폴리펩타이드는 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합제는 칼리크레인 저해제, 예를 들어 웨პ타이드, 소분자 저해제, 칼리크레인 항체 또는 이들의 단편이다. 몇몇 실시형태에서, 브래디키닌 B2 수용체의 길항제는 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시형태에서, C1-INH 대체 치료제는 대상체에게 투여된다.

[0167] 치료제, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 예를 들어 브래디키닌 B2 수용체 길항제, 예를 들어 C1-INH 대체 물질은 혈장 칼리크레인 및/또는 브래디키닌 활성을 포함하는 질환 또는 병증의 치료를 위해 병용 치료의 일부로서 또 다른 치료제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 칼리크레인 저해제, 브래디키닌 B2 수용체 길항제 또는 C1-INH 대체 물질 중 하나 이상, 예를 들어 칼리크레인 저해제, 브래디키닌 B2 수용체 길항제 또는 C1-INH 대체 물질 중 하나 이상 및 또 다른 치료제와의 병용 치료는 복수의 상이한 구성으로 제공될 수 있다. 제1 물질은 다른 치료제의 투여 전에 또는 후에 투여될 수 있다. 몇몇 상황에서, 제1 물질 및 또 다른 치료제(예를 들어, 치료 물질)는 동시에 또는 가까운 시간적 근접성으로(예를 들어, 주사 사이의 짧은 시간 간격, 예컨대 동일한 치료 세션 동안) 투여된다. 제1 물질 및 다른 치료제는 또한 더 긴 시간적 간격으로 투여될 수 있다.

혈장 칼리크레인 결합제

[0169] 혈장 칼리크레인 결합제(예를 들어, 결합 단백질, 예를 들어 폴리펩타이드, 예를 들어 저해 폴리펩타이드, 예를 들어 항체, 예를 들어 저해 항체, 또는 다른 결합제, 예를 들어 소분자)는 다양한 질환 및 병증, 예를 들어 혈장 칼리크레인 활성을 포함하는 질환 및 병증에 유용한 치료제이다. 예를 들어, 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 활성을 포함하는 질환 또는 병증은 유전성 혈관부종(HAE)이다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질 또는 폴리펩타이드는 pKal 매개 또는 브래디키닌 매개 장애의 위험이 있거나 이를 겪는 대상체에게 투여된다.

[0170] 조직 및/또는 혈장 칼리크레인 중 어느 하나인, 칼리크레인의 다수의 유용한 단백질 저해제는 쿠니츠 도메인

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

[0171]

BPTI의 쿠니츠 도메인의 (높은 해상도의) 3D 구조가 공지되어 있다. X선 구조 중 하나는 "6PTI"로서 브룩하븐(Brookhaven) 단백질 데이터 은행에 수탁되어 있다. 몇몇 BPTI 동족체의 3D 구조(Eigenbrot *et al.*, (1990) Protein Engineering, 3(7):591-598; Hynes *et al.*, (1990) Biochemistry, 29:10018-10022)가 공지되어 있다. 적어도 81개의 쿠니츠 도메인 서열이 공지되어 있다. 공지된 인간 동족체는 조직 인자 경로 저해제(tissue factor pathway inhibitor: TFPI)로서 또한 공지된 LACI의 3개의 쿠니츠 도메인(Wun *et al.*, (1988) J. Biol. Chem., 263(13):6001-6004; Girard *et al.*, (1989) Nature, 338:518-20; Novotny *et al.*, (1989) J. Biol. Chem., 264(31):18832-18837), α -트립신 간 저해제의 2개의 쿠니츠 도메인, APP-I(Kido *et al.*, (1988) J. Biol. Chem., 263(34):18104-18107), 콜라겐으로부터의 쿠니츠 도메인, TFPI-2의 3개의 쿠니츠 도메인(Sprecher *et al.*, (1994) PNAS USA, 91:3353-3357), 간세포 성장 인자 활성자 저해제 1형의 쿠니츠 도메인, 간세포 성장 인자 활성자 저해제 2형의 쿠니츠 도메인, 미국 특히 공보 제2004-0152633호에 기재된 쿠니츠 도메인을 포함한다. LACI는 3개의 쿠니츠 도메인을 함유하는 분자량이 39kDa인 인간 혈청 포스포글라이코단백질(표 1의 아미노산 서열)이다.

표 1

예시적인 천연 쿠니츠 도메인

LACI: (서열 번호 1)	<pre> 1 MIYTMKKVHA LWASVCLLN LAPAPLNAds eedeehtiit dtelpplkIM 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFiYGGCEGN QNRFESLEEC 101 KKMCTRDNan riikttlqqe kpdfCfleed pgiCrgvitr yfvnnqtkqC 151 erfkyggClg nmnnfetlee CknICedgpnn gfqvdyngtq lnavnnsltp 201 qstkvpslfe fhgpswC1tp adrglCrane nrifyynsvig kCrpfkysgC 251 ggnennftsk qeC1raCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm </pre> <p>신호 서열(1-28)은 대문자이고 밑줄 표시된다 LACI-K1(50-107)은 대문자이다 LACI-K2(121-178)는 밑줄 표시된다 LACI-K3(211-270)은 볼드체이다</p>										
BPTI (서열 번호 2)	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <tr> <td>1</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>5</td></tr> <tr> <td>123456789012345678901234567890123456789012345678</td><td>123456789012345678901234567890123456789012345678</td><td>RPDF<u>C</u>LEPPYTGP<u>C</u>KARIIRYFYNAKAGLCQT<u>F</u>VYGG<u>C</u>RAKRNNFKSAED<u>C</u>MRT<u>CG</u>GA</td><td></td><td></td></tr> </table>	1	2	3	4	5	123456789012345678901234567890123456789012345678	123456789012345678901234567890123456789012345678	RPDF <u>C</u> LEPPYTGP <u>C</u> KARIIRYFYNAKAGLCQT <u>F</u> VYGG <u>C</u> RAKRNNFKSAED <u>C</u> MRT <u>CG</u> GA		
1	2	3	4	5							
123456789012345678901234567890123456789012345678	123456789012345678901234567890123456789012345678	RPDF <u>C</u> LEPPYTGP <u>C</u> KARIIRYFYNAKAGLCQT <u>F</u> VYGG <u>C</u> RAKRNNFKSAED <u>C</u> MRT <u>CG</u> GA									

[0172]

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

[0174]

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

A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),
 A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAISC (Q95241),
 AMBP_PLEPL (P36992), APP2_HUMAN (Q06481), APP2_RAT (P15943),
 AXP1_ANTAF (P81547), AXP2_ANTAF (P81548), BPT1_BOVIN (P00974),
 BPT2_BOVIN (P04815), CA17_HUMAN (Q02388), CA36_CHICK (P15989),
 CA36_HUMAN (P12111), CRPT_BOOMI (P81162), ELAC_MACEU (O62845),
 ELAC_TRIVU (Q29143), EPPI_HUMAN (O95925), EPPI_MOUSE (Q9DA01),
 HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
 IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
 IMAP_DROFU (P11424), IP52_ANESU (P10280), ISC1_BOMMO (P10831),
 ISC2_BOMMO (P10832), ISH1_STOHE (P31713), ISH2_STOHE (P81129),
 ISIK_HELP0 (P00994), ISP2_GALME (P81906), IVB1_BUNFA (P25660),
 IVB1_BUNMU (P00987), IVB1_VIPAA (P00991), IVB2_BUNMU (P00989),
 IVB2_DABRU (P00990), IVB2_HEMHA (P00985), IVB2_NAJN1 (P00986),
 IVB3_VIPAA (P00992), IVBB_DENPO (P00983), IVBC_NAJNA (P19859),
 IVBC_OPHHA (P82966), IVBE_DENPO (P00984), IVBI_DENAN (P00980),
 IVBI_DENPO (P00979), IVBK_DENAN (P00982), IVBK_DENPO (P00981),
 IVBT_ERIMA (P24541), IVBT_NAJNA (P20229), MCPI_MELCP (P82968),
 SBPI_SARBU (P26228), SPT3_HUMAN (P49223), TKD1_BOVIN (Q28201),
 TKD1_SHEEP (Q29428), TXCA_DENAN (P81658), UPTI_PIG (Q29100),
 AMBP_BOVIN (P00978), AMBP_HUMAN (P02760), AMBP_MERUN (Q62577),
 AMBP_MESAU (Q60559), AMBP_MOUSE (Q07456), AMBP_PIG (P04366),
 AMBP_RAT (Q64240), IATR_HORSE (P04365), IATR_SHEEP (P13371),
 SPT1_HUMAN (O43278), SPT1_MOUSE (Q9R097), SPT2_HUMAN (O43291),
 SPT2_MOUSE (Q9WU03), TFP2_HUMAN (P48307), TFP2_MOUSE (O35536),
 TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),
 TFPI_RABIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

[0175]

[0176]

서열 데이터베이스로부터 쿠니츠 도메인을 확인하기 위해 다양한 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 쿠니츠 도메인, 공통 서열 또는 모티프(예를 들어, 프로사이트(ProSite) 모티프)의 공지된 아미노산 서열이 예를 들어 BLAST를 사용한 젠뱅크(GenBank) 서열 데이터베이스(국립 바이오기술 정보 기관(National Center for Biotechnology Information), 국립 보건원(National Institutes of Health), 메사추세츠주 베데스다); 예를 들어 Pfam 조사에 대한 디폴트 매개변수를 사용한 HMM(히든 마코브(Hidden Markov) 모델)의 Pfam 데이터베이스; SMART 데이터베이스; 또는 ProDom 데이터베이스에 대해 조사될 수 있다. 예를 들어, Pfam 방출 9의 Pfam 수탁 번호 PF00014는 수많은 쿠니츠 도메인 및 쿠니츠 도메인을 확인하기 위한 HMM을 제공한다. Pfam 데이터베이스의 설명은 문헌[Sonhammer *et al.* (1997) *Proteins* 28(3):405-420]에서 확인될 수 있고, HMM의 자세한 설명은 예를 들어 문헌[Gribskov *et al.* (1990) *Meth. Enzymol.* 183:146-159; Gribskov *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4355-4358; Krogh *et al.* (1994) *J. Mol. Biol.* 235:1501-1531; 및 Stultz *et al.* (1993) *Protein Sci.* 2:305-314]에서 확인될 수 있다. HMM의 SMART 데이터베이스(Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, 독일 하이델베르크)는 문헌[Schultz *et al.* (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5857 및 Schultz *et al.* (2000) *Nucl. Acids Res* 28:231]에 기재되어 있다. SMART 데이터베이스는 HMMer2 조사 프로그램의 히든 마코브 모델에 의한 프로파일링에 의해 확인된 도메인을 함유한다(R. Durbin *et al.* (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). 데이터베이스는 또한 설명되고 모니터링된다. ProDom 단백질 도메인 데이터베이스는 상동성 도메인의 자동 편집으로 이루어진다(Corpet *et al.* (1999), *Nucl. Acids Res.* 27:263-267). 현재의 ProDom 버전은 SWISS-PROT 38 및 TREMBL 단백질 데이터베이스의 귀납적 PSI-BLAST 조사를 이용하여 축조되었다(Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402; Gouzy *et al.* (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340.). 데이터베이스는 각각의 도메인에 대한 공통 서열을 자동으로 생성한다. 프로사이트는 모티프로서 쿠니츠 도메인을 목록화하고 쿠니츠 도메인을 함유하는 단백질을 확인한다. 예를 들어, 문헌[Falquet *et al.* *Nucleic Acids Res.* 30:235-238(2002)]을 참조한다.

[0177]

쿠니츠 도메인은 2개의 루프 구역("결합 루프")에서 아미노산을 주로 사용하여 표적 프로테아제와 상호작용한다. 제1 루프 구역은 BPTI의 13번 내지 20번 아미노산에 상응하는 잔기 사이에 있다. 제2 루프 구역은 BPTI의 31번 내지 39번 아미노산에 상응하는 잔기 사이에 있다. 쿠니츠 도메인의 예시적인 라이브러리는 제1 및/또는 제2 루프 구역에서 하나 이상의 아미노산 위치가 변한다. 칼리크레인과 상호작용하는 쿠니츠 도메인을 스크리닝할 때 또는 개선된 친화도 변이체를 선택할 때, 특히 변하기 유용한 위치는 BPTI의 서열과 관련하여 13

번, 15번, 16번, 17번, 18번, 19번, 31번, 32번, 34번 및 39번 위치를 포함한다. 이들 위치 중 적어도 몇몇은 표적 프로테아제와 가깝게 접촉하는 것으로 예상된다. 다른 위치, 예를 들어 3차원 구조에서 상기 언급된 위치에 인접한 위치를 변화시키는 것이 또한 유용하다.

[0178] 쿠니츠 도메인의 "프레임워크 구역"은 쿠니츠 도메인의 일부인 잔기로서 규정되지만, 구체적으로 제1 및 제2 결합 루프 구역에서의 잔기, 즉 BPTI의 13번 내지 20번 아미노산 및 BPTI의 31번 내지 39번 아미노산에 상응하는 잔기를 배제한다. 반대로, 결합 루프에 있지 않은 잔기는 더 넓은 범위의 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 및/또는 비보존적 치환)을 용인할 수 있다.

[0179] 일 실시형태에서, 이 쿠니츠 도메인은 인간 리포단백질 관련 응고 저해제(lipoprotein-associated coagulation inhibitor: LACI) 단백질의 쿠니츠 도메인 1을 포함하는 루프로 된 구조의 변이체 형태이다. LACI는 패러다임 쿠니츠 도메인인, 3개의 내부의, 잘 한정된, 웨타이드 루프 구조를 함유한다(Girard, T. et al., 1989. Nature, 338:518-520). 본 명세서에 기재된 LACI의 쿠니츠 도메인 1의 변이체가 스크리닝되고 단리되고, 증가한 친화도 및 특이성으로 칼리크레인에 결합한다(예를 들어, 미국 특허 제5,795,865호 및 제6,057,287호 참조). 이 방법은 또한 칼리크레인, 예를 들어 혈장 칼리크레인과 상호작용하는 다른 쿠니츠 도메인을 얻기 위해 다른 쿠니츠 도메인 프레임워크에 적용될 수 있다. 칼리크레인 기능의 유용한 조절자는 통상적으로, 칼리크레인 결합 및 저해 검정법을 이용하여 결정된 것처럼, 칼리크레인에 결합하고/하거나 이를 저해한다.

[0180] 몇몇 양상에서, 칼리크레인 결합제(예를 들어, 결합 단백질, 예를 들어 폴리펩타이드, 예를 들어 저해 폴리펩타이드, 예를 들어 항체, 예를 들어 저해 항체, 또는 다른 결합제, 예를 들어 소분자)는 혈장 칼리크레인의 활성 형태에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합제는 혈장 칼리크레인, 예를 들어 인간 혈장 칼리크레인 및/또는 쥐과 칼리크레인에 결합하고 이를 저해한다.

[0181] 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 전장(예를 들어, IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA(예를 들어, IgA1, IgA2), IgD 및 IgE)일 수 있거나, 오직 항원 결합 단편(예를 들어, Fab, F(ab')2 또는 scFv 단편)을 포함할 수 있다. 결합 단백질은 2개의 중쇄 면역글로불린 및 2개의 경쇄 면역글로불린을 포함할 수 있거나, 단일 사슬 항체일 수 있다. 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 재조합 단백질, 예컨대 인간화된, CDR 그래프팅된, 키메라화된, 탈면역화된 또는 실험실내 생성된 항체일 수 있고, 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래한 불변 구역을 임의로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 단일클론 항체이다.

[0182] 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합 단백질은 혈장 칼리크레인, 예를 들어 인간 혈장 칼리크레인 및/또는 쥐과 칼리크레인에 결합하고 이를 저해한다. 예시적인 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 미국 공보 제20120201756호(이의 전체 내용은 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(본 명세서에서 또한 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(본 명세서에서 또한 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체의 경쇄 및/또는 중쇄를 가지는 항체(예를 들어, 인간 항체)이다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01(본 명세서에서 또한 DX-2922라 칭함), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01(본 명세서에서 또한 DX-2930이라 칭함), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 및 M35-G04와 동일한 에피토프와 경쟁하고 이에 결합한다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 DX-2930이다. US 제20110200611호 및 US 제20120201756호를 참조하고, 이들은 본 명세서에서 참조문헌으로 포함된다.

[0183] 몇몇 양상에서, 칼리크레인 결합 폴리펩타이드(예를 들어, 저해 폴리펩타이드)는 혈장 칼리크레인의 활성 형태에 결합한다. 예시적인 폴리펩타이드 혈장 칼리크레인 물질은 미국 특허 제5,795,865호, 미국 특허 제5,994,125호, 미국 특허 제6,057,287호, 미국 특허 제6,333,402호, 미국 특허 제7,628,983호 및 미국 특허 제8,283,321호, 미국 특허 제7,064,107호, 미국 특허 제7,276,480호, 미국 특허 제7,851,442호, 미국 특허 제8,124,586호, 미국 특허 제7,811,991호 및 미국 공보 제20110086801호(이들의 각각의 전체 내용은 본 명세서에서 참조문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 결합 폴리펩타이드는 DX-88(비천연 발생 칼리크레인 저해제, KALBITOR(등록상표)(에칼란타이드)로도 공지됨, 서열 번호 3)이다. 몇몇 실시형태에서, 칼리크레인 저해제는 서열 번호 3의 3번 내지 60번 아미노산의 약 58개의 아미노산 서열 또는 서열 번호 3의 60개의 아미노산 서열을 가지는 DX-88 폴리펩타이드를 포함하거나 이들로 이루어진다.

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala
 His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys
 Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
 (서열 번호 3)

[0184]

[0185] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 EPIKAL-2(서열 번호 4)이고, 이것은 58개의 잔기 아미노산 서열(서열 번호 3의 3-60번 잔기에 상응)을 갖고, 34번 잔기에서 Ser로의 Ile의 아미노산 치환 및 39번 잔기에서 Gly로의 Glu의 아미노산 치환을 가지는 비천연 발생 칼리크레인 저해제이다. EPIKAL-2의 서열은 이하에 기재되어 있다:

EpiKal2: Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
 Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Phe Ser Tyr Gly Gly
 Cys Gly Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg
 Asp (서열 번호 4)

[0186]

[0187] 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 HC 및/또는 LC 프레임워크 구역(예를 들어, HC 및/또는 LC FR 1, 2, 3 및/또는 4)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 HC 및/또는 LC CDR(예를 들어, HC 및/또는 LC CDR1, 2 및/또는 3)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 혈장 칼리크레인 결합 단백질은 불변 구역(예를 들어, CH1, CH2, CH3 및/또는 CL1)에서 본 명세서에 기재된 결합 단백질과 약 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0188]

몇몇 양상에서, 소분자는 혈장 칼리크레인의 활성 형태에 결합한다.

[0189]

브래디키닌 B2 수용체 길항제

[0190]

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

[0191]

C1-INH 대체 물질

[0192]

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

[0193]

실시예

[0194]

실시예 1: 절단된 키니노겐

[0195]

접촉 시스템의 분석에 기초하여, 절단된 키니노겐은 접촉 시스템 활성화를 측정하기 위한 적합한 바이오마커이다. 절단된 키니노겐은 간경련에서 HAE 공격 동안, 및 폐혈증 동안 접촉 시스템 활성화의 결과로서 상승한 것으로 이전에 나타났다. 항체 파지 디스플레이 라이브러리는 온전한 키니노겐에서 결핍과 조합되어 절단된 키니노겐에 대해 패닝되었다. 동시에, 마우스를 하이브리도마 세포주로부터 얻은 절단된 키니노겐 및 단일클론 항체에 의해 면역화하였다. 노력 둘 다는 절단된 키니노겐에 오직 결합하는 항체를 제공하지 않고 절단된 및 온전한 키니노겐 둘 다에 결합하는 다수의 상이한 단일클론 항체를 제공하였다.

[0196]

다수의 항체는 웨스턴 블롯 검정법에서의 적합성에 대해 스크리닝되고, 몇몇은 도 2에 도시된 마우스 mAb(클론 11H05)를 포함하는 이 작업 웰을 확인하였다. 이 검정법이 인간 혈장 샘플에서 절단된 키니노겐을 검출할 수 있다는 것이 명확하다. 더욱이, 도 2에서의 데이터는 유리에서의 혈장 수집이 접촉 활성화 및 키니노겐 절단을 막기에 충분하다는 것을 확인시켜준다.

[0197]

질량 분광법 기반 접근법은 환자 혈장에서 절단된 키니노겐을 검출하기 위해 또한 사용될 수 있다. 이 접근법에

서, 일 면역은 환자 샘플로부터 키니노겐을 흡수하고, 용리된 키니노겐을 단백질분해로 분해하고, LC-MC에 의해 웹타이드 단편을 분석한다.

[0198] 실시예 2: C1INH-pKal 및 α 2M-pKal에 대한 면역검정법

[0199] ELISA 기반 면역검정법은 이 복합체의 검출을 위해 개발되었다. 샌드위치 기반 ELISA 검정법은 이전에 기재된 것과 유사하고, 예를 들어 문헌[Kaufman, et al., *Blood* 77, 2660-2667, 및 Wachtfogel, *Blood* 73, 468-471]을 참조한다.

[0200] 실시예 3: C1INH-pKal 검정법

[0201] ELISA는 C1INH-pKal 복합체의 검출을 위해 개발되었다. 이 샌드위치 검정법은 포획 시약 또는 검출 시약으로서 pKal 및 C1INH에 대해 항체를 사용한다. 이 검정법의 개발에서의 제1 단계는 C1INH-pKal 복합체의 제조이다. C1INH에 비해 2-4배 몰 과량의 pKal을 항온처리함으로써 이 공유 복합체를 제조하였다. 이후, 복합체는 도 3에 도시된 바대로 양이온 교환 크로마토그래피(캡토(Capto) S 수지)를 사용하여 정제하였다. $280\text{nm}(121, 740\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ 에서 계산된 몰 흡광 계수를 사용하여 복합체를 정량화하였다. C1INH-pKal을 측정하기 위해 유사한 검정법을 사용한 이전의 보고는 흡광 계수를 보고하지 않았다. 정확한 농도 결정은, 약물 투약을 알려주는, 얼마나 많은 pKal이 질환 동안 활성화되는지를 결정하기 위한 검정법 때문에 중요하다.

[0202] ELISA에 의한 C1INH-pKal의 검출을 위한 2개의 검정 포맷을 조사하였다. 제1 포맷은 HRP 라벨링된 2차 항체에 의한 신호 생성 후 포획 시약으로서 항-pKal 항체(마우스 mAb 13G11) 및 검출 항체로서 C1INH에 대한 항체를 사용한다(도 4). 이 검정법은 한자릿수 나노몰 범위 이하로 정량화의 하한을 가진다. 반대의 검정 포맷을 또한 조사하였고, 여기서 항-C1INH는 포획 항체이고, 및 항-pKal(13G11)은 검출 항체이다(도 5). 이 검정 포맷은 정량화의 유사한 하한을 가진다. 2개의 검정 포맷을 가지는 것은 C1INH-pKal 및 α 2M-pKal에 대한 멀티플렉스 검정법에 대한 부가적인 옵션을 제공한다.

[0203] 실시예 4: α 2M-pKal 복합체 검정법

[0204] ELISA는 α 2M-pKal 복합체의 검출을 위해 개발되었다. 이 샌드위치 검정법은 포획 시약 또는 검출 시약으로서 pKal 및 α 2M에 대한 항체를 사용한다. 이 검정법의 개발에서 제1 단계는 α 2M-pKal 복합체의 제조이다. α 2M에 비해 2-4배 몰 과량의 pKal을 항온처리함으로써 이 공유 복합체를 제조하였다. 이후, 복합체는 도 6에 도시된 바대로 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. α 2M은 테트라머까지의 올리고머의 분포로서 존재하는 약 180kDa 하위단위로 이루어진다. pKal과의 상호작용 시, α 2M의 각각의 단량체는 pKal에서 라이신 아민에 의한 α 2M에서의 티오에스터 결합의 가수분해를 통해 공유 아마이드 결합을 형성하는 경향을 가진다. 결과적으로, 정량화를 복잡하게 하는 가교결합된 종의 분포를 예상할 수 있다. 복합체의 활성을 측정하고 표준 곡선을 사용하여 농도로 전환함으로써 α 2M-pKal 복합체를 정량화하기 위해 방법을 도출하였다(도 7). 표적 프로테아제와의 α 2M의 공유 복합체가 작은 합성 웹타이드 기질을 향해 활성 부위를 차단하지 않는다는 것이 문헌에서 널리 공지되어 있으므로 이 정량화 방법이 가능하다.

[0205] C1INH-pKal 검정법에서처럼, ELISA에 의한 α 2M-pKal의 검출을 위해 2개의 검정 포맷을 조사하였다. 제1 포맷은 HRP 라벨링된 2차 항체에 의한 신호 생성 후 포획 시약으로서 항-pKal 항체(마우스 mAb 13G11) 및 검출 항체로서 α 2M에 대한 항체를 사용한다(도 8). 이 검정 포맷은 한자릿수 나노몰 범위 이하로 정량화의 하한을 가진다. 반대의 검정 포맷을 또한 조사하였고, 여기서 항- α 2M은 포획 항체이고, 항-pKal(13G11)은 검출 항체이다(도 9). 이 검정 포맷은 정량화의 유사한 하한을 가진다. 2개의 검정 포맷을 가지는 것은 C1INH-pKal 및 α 2M-pKal에 대한 멀티플렉스 검정법에 대한, 본 발명자들이 찾는, 부가적인 옵션을 제공한다.

[0206] 실시예 5: 활성화 혈장에서의 α 2M-pKal 및 C1INH-pKal의 검출.

[0207] 접촉 활성화를 유도하는 것으로 공지된 카울린 또는 황산텍스트란과 같은 시약에 의해 처리된 정상 인간 혈장에서 pKal 활성화를 검출하기 위해 ELISA를 사용하였다. 도 10에 도시된 것처럼, 이 검정법은 황산텍스트란에 의한 실험실내 활성화 후 혈장에서 형성된 복합체를 검출할 수 있다.

[0208] 실시예 6: 온전한 키니노겐 및 절단된 키니노겐

[0209] 공격 동안 얻어지고 항프로테아제 칵테일을 함유하는 시트르산염 첨가 혈장 관에 수집된 환자로부터의 혈장이 온전한 키니노겐(즉, 1-사슬)의 양의 감소를 나타낸다는 것을 보여주기 위해 웨스턴 블로트를 사용하였다(도 11). 절단된 키니노겐(즉, 2-사슬)의 증가가 관찰되었다(데이터 비도시).

[0210] 실시예 7: 예시적인 검정법 및 검정 데이터

(i) HMWK 생체외 활성화

[0212] 접촉 활성화에서 후보 pKa1 저해제의 저해 활성을 평가하기 위해 HMWK 생체외 활성화 검정법을 사용할 수 있다. 간단히 말하면, 정상 인간 혈장에서 접촉 시스템 활성화를 자극하거나, 1-사슬 HMWK의 수준을 대략 10-50% 감소시키기 위해(이것은 심플 웨스턴(SBHD) 또는 웨스턴 블롯(TGA)에 의해 검출될 수 있음) HAE 공격 샘플을 자극하기 위해 FXIIa(예를 들어, 5nM)를 사용하였다. 접촉 활성화의 감소는 DX-2930 치료된 샘플에서 관찰되었다.

[0213] 도 17에 도시된 것처럼, DX-2930의 최소 수준(예를 들어, 9-27nM)의 저해 활성이 프로테인 심플 웨스턴 또는 전통적인 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 본 명세서에 기재된 HMWK 생체외 활성화 검정법에서 검출되었다. 이 연구에 사용된 검정법 조건은 5% 혈장 중의 9-27nM DX-2930의 활성을 검출할 수 있다. 또한 하기 표 2를 참조한다:

표 2

DX-2930에 의한 혈장 활성화의 감소

샘플	MW(kDa)	면적	감소(%)
정상 인간 혈장	163	10643.89	해당 없음
XIIa 활성화 혈장 - 480nM DX2930	162	4799.214	54.9
XIIa 활성화 혈장 - 240nM DX2930	163	3843.905	63.9
XIIa 활성화 혈장 - 80nM DX2930	162	2234.369	79.0
XIIa 활성화 혈장 - 27nM DX2930	164	1025.635	90.4
XIIa 활성화 혈장 - 9nM DX2930	164	841.682	92.1
XIIa 활성화 혈장 - 0nM DX2930	165	389.155	96.3

[0214]

[0215] DX-2930 적정에 의한 XIIa 인자 활성화 혈장에 대한 원데이터가 도 18에 제공된다. 또한 하기 표 3을 참조한다:

표 3

다양한 농도에서 DX-2930에 의한 혈장 활성화의 감소

샘플	MW(kDa)	면적	감소(%)
정상 인간 혈장	163	10643.9	해당 없음
480nM DX2930	162	4799.2	54.9
240nM DX2930	163	3843.9	63.9
80nM DX2930	162	2234.4	79.0
27nM DX2930	164	1025.6	90.4
9nM DX2930	164	841.7	92.1
0nM DX2930	165	389.2	96.3

[0216]

[0217] 30분 동안 FXIIa에 의한 활성화 후 다양한 인간 순수한 혈장 샘플에서 1-사슬 HMWK의 감소를 조사하였다. 결과가 도 22 내지 도 26에 도시되어 있다. 또한 하기 표 4 내지 표 8을 참조한다:

표 4

순수한 혈장 샘플 BRH745047에서 30분 작용 후 1-사슬 HMWK의 감소(%)

샘플	피크 면적(약 160kDa)	감소(%)
BRH745047	19707	해당 없음
BRH745047 + 5nM FXIIa	7464	62.1
BRH745047 + 10nM FXIIa	2541	87.1

[0218]

표 5

순수한 혈장 샘플 BRH745048에서 30분 작용 후 1-사슬 HMWK의 감소(%)

샘플	피크 면적(약 160kDa)	감소(%)
BRH745048	19850	해당 없음
BRH745048 + 5nM FXIIa	11235	43.4
BRH745048 + 10nM FXIIa	4985	74.9

[0219]

표 6

순수한 혈장 샘플 BRH745064에서 30분 작용 후 1-사슬 HMWK의 감소(%)

샘플	피크 면적(약 160kDa)	감소(%)
BRH745064	22916	해당 없음
BRH745064 + 5nM FXIIa	15345	33.0
BRH745064 + 10nM FXIIa	8124	64.5

[0220]

표 7

순수한 혈장 샘플 BRH745062에서 30분 작용 후 1-사슬 HMWK의 감소(%)

샘플	피크 면적(약 160kDa)	감소(%)
BRH745062	22086	해당 없음
BRH745062 + 5nM FXIIa	7329	66.8
BRH745062 + 10nM FXIIa	3126	85.8

[0221]

표 8

순수한 혈장 샘플 BRH745049, BRH745062 및 BRH745063에서 30 분 작용 후 1-사슬 HMWK의 감소(%)

샘플	피크 면적(약 160kDa)	농도 (nM)
1uM 1 사슬 HMWK	37648	1000.0
BRH745049	21960	583.3
BRH745062	22086	586.6
BRH745063	18479	490.8

[0222]

[0223] 도 27에 도시된 것처럼, XIIa 인자 활성화는 용량 의존 방식으로 혈장 샘플에서 1-사슬 HMWK를 감소시켰다.

[0224] (ii) 내인성 절단된 키니노겐

[0225] 이 검정법에서, 혈장 샘플에서 절단된 키니노겐의 수준을 결정하기 위해 심풀 웨스턴(SBHD) 및 웨스턴 블롯(TGA)에 의해 SCAT 관 혈장을 분석하였다. 절단된 HMWK는 정상 인간 혈장과 비교하여 기준 및 공격 HAE 샘플에서 상승한 것으로 밝혀졌다. 절단된 HMWK가 DX-2930 치료된 HAE 환자, 및 DX-2930 치료된 건강한 지원자에서 감소한 것으로 예상된다.

[0226] 도 28에 도시된 것처럼, 기준 HAE 환자 샘플에서의 2-사슬 HMWK(절단된 HMWK)의 수준은 HAE 공격을 가지는 환자에서 이보다 적은 것으로 밝혀졌다. DX-2930 치료된 환자에서의 절단된 HMWK 수준은 정상 환자와 유사한 것으로 예상된다.

[0227] 도 29는 프로테인 심풀 웨스턴 블롯 분석 및 전통적인 웨스턴 블롯 분석에 의해 결정된 것처럼 기준 및 HAE 공격 환자에서 절단된 HMWK의 수준을 보여준다.

[0228] 4명의 개체에서 내인성 절단된 HMWK를 조사하였다. 결과가 도 30에 도시되어 있다. 적은 양의 절단된 HMWK가 시트르산염에 의해 수집된 정상 인간 혈장 샘플에서 발견되었다.

[0229] (iii) pKal 활성을 측정하기 위한 생체외 검정법

[0230] 정상 인간 혈장에서 접촉 시스템 활성화를 평가하고, HAE 공격 샘플을 자극하고(1-사슬 HMWK에서의 10-50% 감소를 목표), 접촉 시스템 활성화에서 pKal 저해제의 저해 활성을 평가하기 위해 이 효소 기반 검정법을 개발하였다. 접촉 활성화의 감소는 DX-2930 치료된 대상체에서 관찰되었다. 이 검정법은 치료된 대상체(예를 들어, 원숭이 또는 인간 환자)에서 pKal 저해제, 예컨대 DX-2930 생물활성을 평가하는 데 있어서 유용하다.

[0231] 이 검정법의 예가 도 12에 예시되어 있다. 간단히 말하면, 혈장 샘플을 96웰 마이크로플레이트에 위치시켰다. Dx-2930, 예시적인 pKal 저해제, FXIIa, 예시적인 접촉 시스템 활성화제를 혈장 샘플에 첨가하였다. 혼합물을 적합한 시간 기간(예를 들어, 2분) 동안 pKal의 라벨링된 웹타이드 기질의 존재 하에 얼음에서 항온처리하고, 옥수수 트립신 저해제(CTI)를 혼합물에 첨가하여 활성화 반응을 중지시켰다. 혼합물을 필요한 경우 흐석하고, 형광 웹타이드 기질의 수준을 측정함으로써 단백질분해 활성을 결정하였다.

[0232] 도 12에 도시된 것처럼, DX-2930 치료된 원숭이는 접촉 활성화의 수준 감소(pKal 활성의 감소)를 나타낸다.

[0233] (i) 절단된 HMWK를 결정하기 위한 웨스턴 블롯 검정법

[0234] 리코르(LiCor) 검출을 포함하는 웨스턴 블롯 검정법을 통해 절단된 HMWK의 수준을 측정하였다. 또한 하기 실시 예 8을 참조한다. 필요할 때, 시트르산염 또는 항프로테아제 칵테일을 이 검정법에서 항응고제로서 사용하였다. 절단된 HMWK의 상승이 정상 혈장과 비교하여 HAE 샘플에서 관찰되었다. 이 검정법은 치료된 대상체(예를 들어, 원숭이 또는 인간 환자)에서 pKal 저해제, 예컨대 DX-2930 생물활성을 평가하는 데 있어서 유용하다.

[0235] 항프로테아제 저해제 칵테일에서 HAE 환자로부터 수집된 혈장 샘플을 리코르 검출에 의한 웨스턴 블롯 검정법을 이용하여 조사하였고, 결과가 도 14에 도시되어 있다. 도 15에 도시된 것처럼, 온전한 키니노겐은 이전에 보고

된 것처럼 10%(리코르 검출에 의한 웨스턴 블롯 검정법) 내지 50% 감소하였다. DX-2930 치료된 사이노몰거스 원숭이는 용량 의존 방식으로 (카올린 또는 황산텍스트란에 의해) pKal 활성화의 수준 감소를 나타냈다. 도 16. 또한 하기 표 9를 참조한다:

표 9

DX-2930에 의해 절단된 HMWK의 감소

4 일 DX-2930 PK 농도		
용량 그룹	동물 번호	농도 ($\mu\text{g/mL}$)
비히클	6097	BLQ
5 mg/kg	6010	38.56
25 mg/kg	6070	177.42
50 mg/kg	6013	613.60

[0236]

[0237] 30분 활성화 후 다양한 혈장 샘플에서의 인간 HMWK가 도 19에 도시되어 있고, 본 명세서에 기재된 웨스턴 블롯 검정법에 의해 결정되었다. 감소한 샘플을 겔에 첨가 전에 5분 동안 비등시켰다. 샘플을 20배 희석하고, 90분 동안 150v에서 4-12% 비스-트리스 겔에서 실행하였다. 겔에서의 단백질을 7분 동안 iBlot를 사용하여 막으로 옮겼다. 마우스 항-인간 키니노겐(1:1,000 희석)을 사용하였다. 블롯 노출 시간은 5초였다.

[0238]

혈장 활성화를 검출하는 데 있어서 프로테인 심플 웨스턴을 전통적인 웨스턴 블롯 검정법과 비교하였다. 도 20 및 도 21에 도시된 것처럼, 전자(오른쪽 패널)는 후자(왼쪽 패널)보다 더 민감하다.

[0239]

실시예 8. 바이오마커로서의 pKal의 생체외 활성화

[0240]

혈장에서 혈장 칼리크레인(pKal)으로의 프리칼리크레인의 생체외 활성화는, 예를 들어 pKal의 치료학적 저해제, 예컨대 DX-2930의 생물활성의 증거를 제공하기 위한 약동학적(PD) 바이오마커 둘 다로서, 및 질환 샘플에서 활성화된 pKal의 검출을 위해 사용될 수 있다.

[0241]

제1 실험에서, DX-2930의 단일 SC 주사(5mg/kg)가 투약된 사이노몰거스 원숭이로부터의 혈장을 얻고 10nM FXIIa에 의해 활성화하여, 합성 기질(Pro-Phe-Arg-AMC)을 사용하여 모니터링된 활성 pKal을 생성하였다. 옥수수 트립신 저해제를 첨가하여 기질의 첨가 전에 FXIIa 활성화를 중단시켰다. 투약된 사이노몰거스 원숭이 샘플로부터의 혈장에서 관찰된 저해 백분율은 DX-2930 또는 에칼란타이드의 몰 당량이 스파이킹된 제조된 혈장 샘플의 것과 일치하였다(도 31). DX-2930의 혈장 농도가 FXIIa의 생체외 첨가에 의해 생성된 pKal 활성의 대략 80%를 저해하는 약물 수준(약 265nM)에 도달한다는 것이 명확하다. 도 31은 동일한 양의 pKal 저해가 에칼란타이드의 동등한 농도에 의해 관찰된다는 것을 또한 보여준다. 반대로, 혈장에 첨가된 동등한 농도의 C1-INH는 이 생체외 활성화 검정법에서 FXIIa에 의해 활성화된 pKal을 저해하지 않았다.

[0242]

제2 실험에서, 혈장은 DX-2930의 상이한 용량의 5회 주마다 SC 주사가 투약된 사이노몰거스 원숭이로부터 얻어지고, 시트르산염 첨가 혈장은 상이한 용량에서 DX-2930의 단일 SC 주사가 제공된 1a상 임상 연구에서 인간(n=6)으로부터 얻어진다. 혈장 샘플을 FXIIa에 의해 활성화하고, 생성된 pKal 활성을 합성 기질(Pro-Phe-Arg-AMC)을 사용하여 측정하였다. 옥수수 트립신 저해제를 첨가하여 기질의 첨가 전에 FXIIa 활성화를 중지시켰다. 기준선으로부터 각각의 개체로부터 투약 전 혈장 샘플에 존재하는 pKal 활성을 사용하여 저해 백분율을 결정하였다. 도 32는 저해 백분율이 DX-2930의 용량이 증가한 인간 및 원숭이 혈장 샘플 둘 다에서 증가한다는 것을 보여준다.

[0243]

이 2개의 실험으로부터의 결과는 생체외 활성화 검정법이 pKal의 치료학적 저해제의 생물활성에 대한 PD 바이오마커로서 유용하다는 것을 보여준다.

[0244]

실시예 9. DX-2930 1A상 연구 혈장 샘플에서의 pKal 활성의 생체외 저해

[0245] 이 연구에서 DX-2930이 피하로 투여된 인간 대상체로부터 유래한 혈장에서의 DX-2930의 생체외 저해 활성(생물활성)을 조사하였다.

재료

[0247] • DX-2930($106.7\text{mg}/\text{mL} = 732 \mu\text{M}$)

[0248] • 인간 FXIIa - ERL HFXIIa 2790P($1.72\text{mg}/\text{mL} = 25.3 \mu\text{M}$)

[0249] • 옥수수 트립신 저해제(CTI) - ERL CTI 360($1.54\text{mg}/\text{mL} = 123 \mu\text{M}$)

[0250] • 웨타이드 기질 = PFR-AMC, 시그마(Sigma) 카탈로그 99273호, 룻트 037K1207.

[0251] • 검정 완충제 = 20mM 트리스(Tris)(pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% 트리톤(Triton) X-100, 0.1% PEG-8000

[0252] • 코닝 96웰 화이트 폴리스타이렌 마이크로플레이트 카탈로그 3789호

[0253] • 스펙트라맥스(Spectramax) M2 플레이트 판독기

[0254] • DX-2930 1a상 연구에서 수집된 시트르산염 첨가 혈장

방법

[0256] 실온에서 2분 동안 10nM FXIIa의 첨가에 의해 1:40 희석된 혈장을 활성화하였다. FXIIa를 이후 100nM CTI를 첨가하여 급랭시키고, 혈장 칼리크레인(pKal)의 단백질분해 활성을 이후 샘플 혈장의 추가의 1:10 희석 및 $10 \mu\text{M}$ 형광 웨타이드 기질 PFR-AMC의 첨가에 의해 평가하였다. 각각의 혈장 샘플은 pKal 활성의 속도로서 보고되었고, 이것은 각각의 개체에 대해 투약 전 대조군에 기초하여 "저해(%)"로서 전환되었다.

결과

[0258] 시트르산염 첨가 혈장 샘플은 DX-2930 1a상 연구에서 건강한 대상체로부터 얻어지고, 혈장에서 생체외 생물활성 검정법을 이용하여 분석되었다. pKal 활성의 상당한 저해가 용량 그룹 3($1.0\text{mg}/\text{kg}$ 의 DX-2930) 및 4($3.0\text{mg}/\text{kg}$ 의 DX-2930)에서 관찰되어서, 각각 pKal 활성의 대략 19% 및 36% 최대 저해를 달성하였다(도 33). 그룹 3 및 4에서 달성된 저해가 지속하였고, 대략 20일의 겉보기 반감기와 일치하였다. 용량 그룹 1($0.1\text{mg}/\text{kg}$ 의 DX-2930) 및 2($0.3\text{mg}/\text{kg}$ 의 DX-2930)에서의 pKal 활성의 저해가 상당하지 않았다.

[0259] 이 결과는 생체외 활성화 검정법이 pKal의 치료학적 저해제의 생물활성에 대한 PD 바이오마커로서 유용하다는 것을 추가로 입증한다.

실시예 10. 웨스턴 블롯 검정법으로부터의 1a상 연구 샘플에서의 DX-2930 생물활성의 분석

[0261] DX-2930에 의해 치료된 인간 대상체의 혈장에서의 DX-2930의 생물활성은 본 명세서에 기재된 웨스턴 블롯 검정법을 이용하여 조사되었다.

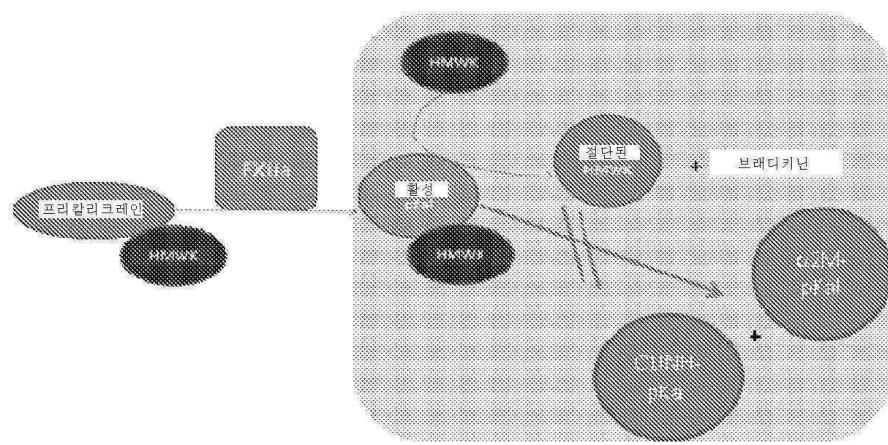
[0262] DX-2930 또는 위약에 의한 투약 후 1일(DX-2930 또는 위약 투약 전), 5일 또는 28일에 대상체로부터 얻어진 시트르산염 첨가 혈장 샘플을 사용하여 웨스턴 블롯 검정법을 수행하였다. DX-2930에 의해 저해된 표적 효소인, 활성 혈장 칼리크레인에 대한 기질인, 고분자량 키니노겐(HMWK)을 검출하는 항체를 사용하여 웨스턴 블롯에 의해 샘플을 분석하였다. 혈장 칼리크레인은 HMWK에서 작용하여 전염증성 웨타이드 브래디키닌 및 2-사슬(웨스턴 블롯 분석에 의해 검출된 HMWK의 절단된 형태로서 공지됨)을 생성한다. 활성화된 응고 XIIa 인자(FXIIa)에 의해 처리된 혈장 샘플 및 처리되지 않은 혈장 샘플을 분석하였다. FXIIa는 혈장에서 비활성 프리칼리크레인을 활성화 혈장 칼리크레인으로 전환시킨다.

[0263] 이 연구로부터 얻은 결과는 $3\text{mg}/\text{kg}$ 의 DX-2930이 투약된 대상체로부터 FXIIa 처리된 샘플(그룹 4)이 이 대상체로부터의 투약 전 샘플보다 5일($p = 0.0011$) 및 28일($p = 0.0028$)에 2-사슬 HMWK(절단된 HMWK)의 통계적으로 더 낮은 백분율을 나타낸다는 것을 보여준다. 이것은 내인성 기질(HMWK)의 혈장 칼리크레인 매개 단백질분해에 대한 DX-2930 생물활성의 증거이다(도 34). 그룹 4에서 관찰된 2-사슬 HMWK의 백분율의 감소는 다른 용량 그룹 또는 위약 치료된 그룹에서 관찰된 것보다 낮은 경향이 있다.

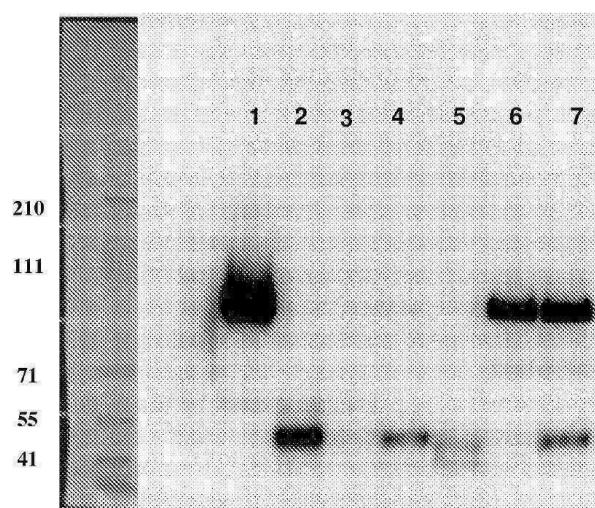
- [0264] 추가로, FXIIa에 의해 치료되지 않은, 0.3, 1 또는 3mg/kg의 DX-2930이 투약된 대상체로부터의 샘플은 위약 또는 0.1mg/kg의 용량에서 관찰된 것보다 2-사슬 HMWK의 더 낮은 백분율을 나타냈다(도 35).
- [0265] 종합하면, 이 결과는 웨스턴 블로트 검정법이 pKal의 치료학적 저해제의 생물활성에 대한 PD 바이오마커로서 유용하다는 것을 추가로 입증한다.
- [0266] **균등물 및 범위**
- [0267] 당해 분야의 당업자는 단지 일상적인 것에 지나지 않는 실험을 사용하여 본 명세서에 기재된 본 개시내용의 구체적인 실시형태에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확신할 수 있을 것이다. 본 개시내용의 범위는 상기 설명을 제한하는 것으로 의도되지 않고, 오히려 첨부된 청구범위에 기재되어 있다.
- [0268] 청구항에서 "일", "하나" 및 "이것"과 같은 관사는, 반대를 표시되지 않는 한 또는 그렇지 않으면 문맥으로부터 명확하지 않은 한, 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 그룹의 하나 이상의 구성원 사이의 "또는"을 포함하는 청구항 또는 설명은, 반대를 표시되지 않는 한 또는 그렇지 않으면 문맥으로부터 명확하지 않은 한, 그룹 구성원 중 하나, 하나 초과 또는 모두가 소정의 생성물 또는 방법에 존재하거나, 이들에서 사용되거나, 그렇지 않으면 이들과 관련되는 경우 충족되는 것으로 생각된다. 본 개시내용은 정확하게 그룹 구성원 중 하나가 소정의 생성물 또는 방법에 존재하거나, 이들에서 사용되거나, 그렇지 않으면 이들과 관련되는 실시형태를 포함한다. 본 개시내용은 그룹 구성원 중 하나 초과 또는 모두가 소정의 생성물 또는 방법에 존재하거나, 이들에서 사용되거나, 그렇지 않으면 이들과 관련되는 실시형태를 포함한다.
- [0269] 더욱이, 본 개시내용은 하나 이상의 기재된 청구항으로부터의 하나 이상의 제한, 부재, 조항 및 설명적 용어가 또 다른 청구항으로 도입되는 모든 변형, 조합 및 순열을 포함한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속하는 임의의 청구항은 동일한 기본 청구항에 종속하는 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 부재가 예를 들어 마쿠쉬 그룹 포맷으로 목록으로 제시되는 경우, 부재의 각각의 하위그룹이 또한 개시되고, 임의의 부재(들)는 그룹으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로 본 개시내용 또는 본 개시내용의 양상이 특정한 부재 및/또는 특징을 포함하는 것으로 언급되는 경우, 본 개시내용의 소정의 실시형태 또는 본 개시내용의 양상이 이러한 부재 및/또는 특징으로 이루어지거나, 본질적으로 이루어지는 것으로 이해되어야 한다. 단순함의 목적을 위해, 이 실시형태는 본 명세서에 다른 말로 구체적으로 기재되어 있지 않다. 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 개방적이고 부가적인 부재 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 의도된다는 것에 또한 주목한다. 범위가 제공되는 경우, 종점이 포함된다. 더욱이, 달리 표시되지 않는 한 또는 그렇지 않으면 문맥 및 당해 분야의 당업자의 이해로부터 명확하지 않은 한, 범위로서 표시된 값은, 문맥이 명확히 달리 기술하지 않는 한, 범위의 하한의 단위의 10/1까지, 본 개시내용의 상이한 실시형태에서 기술된 범위 내의 임의의 특정한 값 또는 하위범위를 취할 수 있다.
- [0270] 본원은 다양한 등록 특허, 공개 특허 출원, 저널 논문 및 다른 공보(이들 모두 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 관한 것이다. 임의의 도입된 참조와 본 명세서 사이에 상충이 있는 경우, 명세서가 우세해야 한다. 또한, 선행 기술 내에 해당하는 본 개시내용의 임의의 특정한 실시형태는 임의의 하나 이상의 청구항으로부터 명백히 배제될 수 있다. 이러한 실시형태가 당해 분야의 당업자에게 공지된 것으로 생각되므로, 이들은 배제가 본 명세서에 명백히 기재되지 않더라고 배제될 수 있다. 본 개시내용의 임의의 특정한 실시형태는 선행 기술의 존재와 관련되든 또는 관련되지 않든, 임의의 이유로, 임의의 청구항으로부터 배제될 수 있다.
- [0271] 당해 분야의 당업자는 단지 일상적인 것에 지나지 않는 실험을 사용하여 본 명세서에 기재된 특정한 실시형태에 대한 많은 균등물을 인식하거나 확신할 수 있을 것이다. 본 명세서에 기재된 본 실시형태의 범위는 상기 설명을 제한하는 것으로 의도되지 않고, 오히려 첨부된 청구범위에 기재되어 있다. 당해 분야의 당업자는 이 설명에 대한 다양한 변경 및 변형이 하기 청구항에 정의된 바대로 본 개시내용의 사상 또는 정신으로부터 벗어나지 않으면서 만들어질 있다는 것을 이해할 것이다.

도면

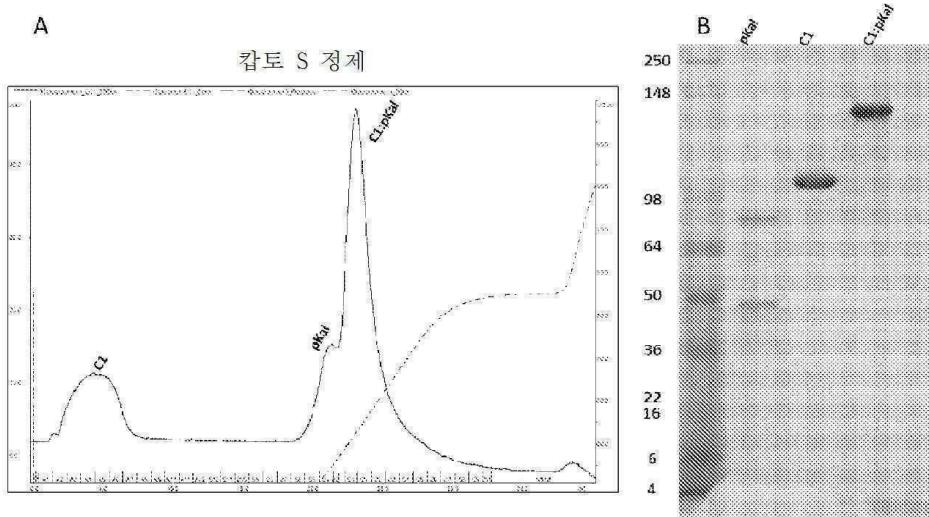
도면1



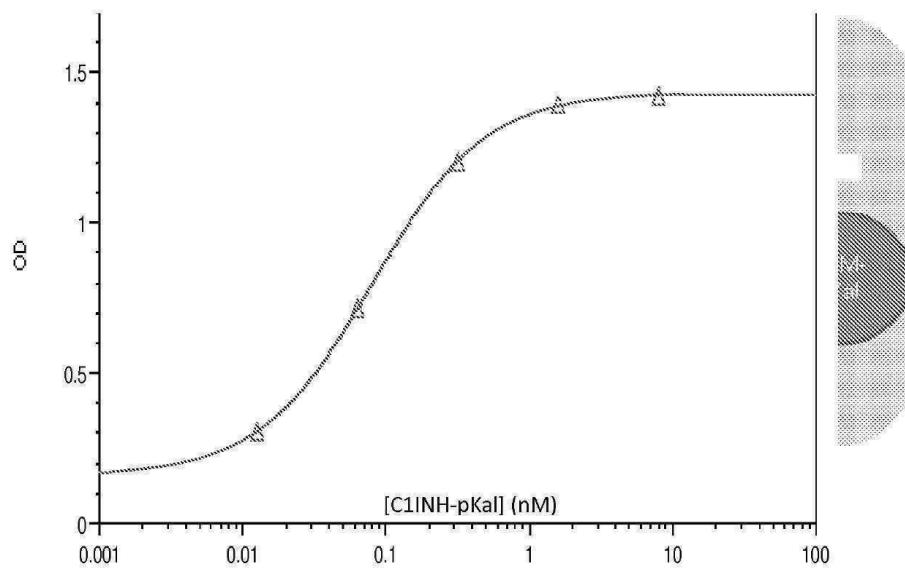
도면2



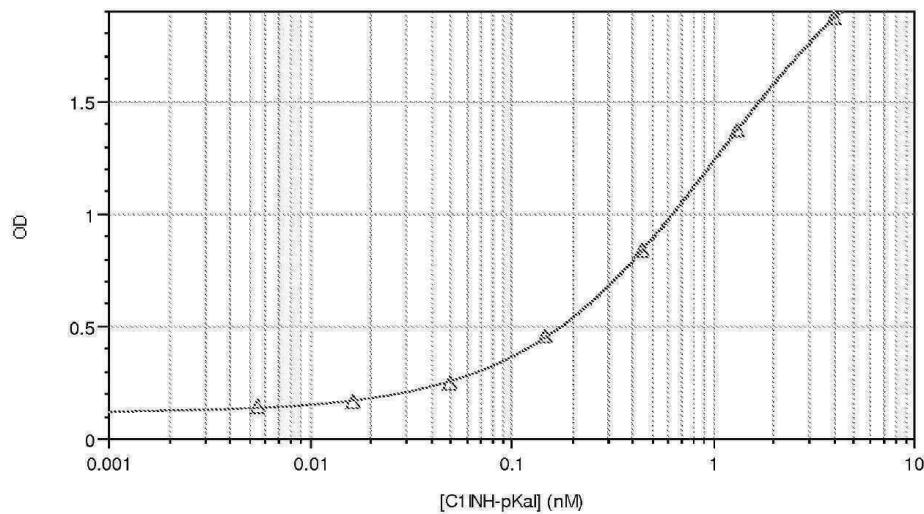
도면3



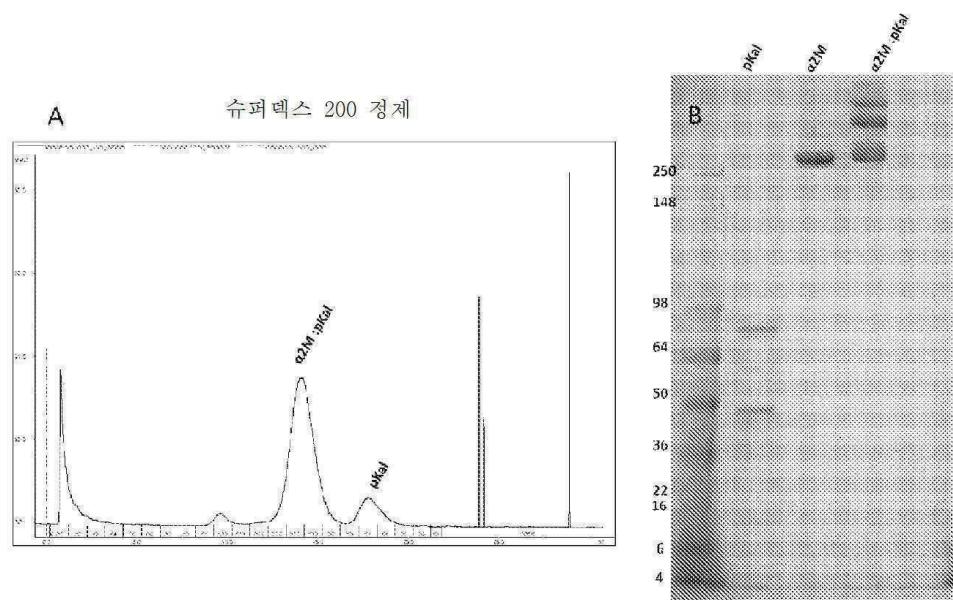
도면4



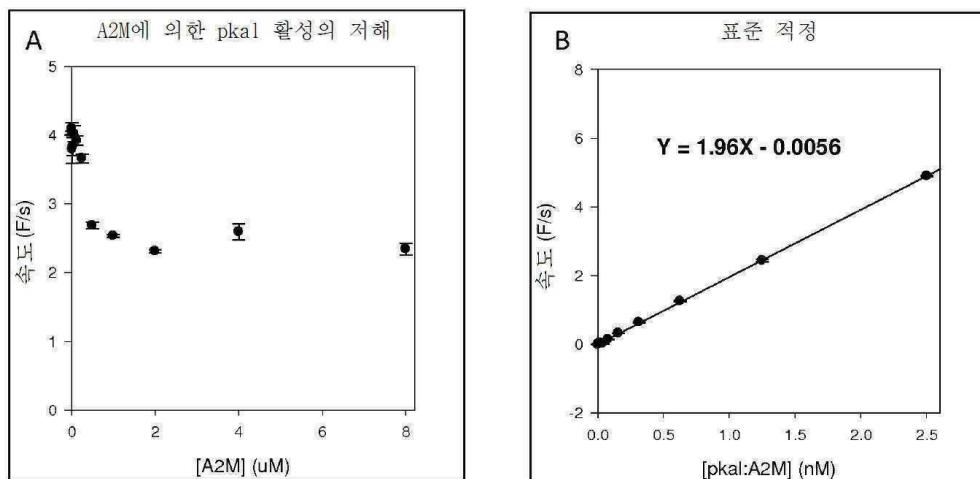
도면5



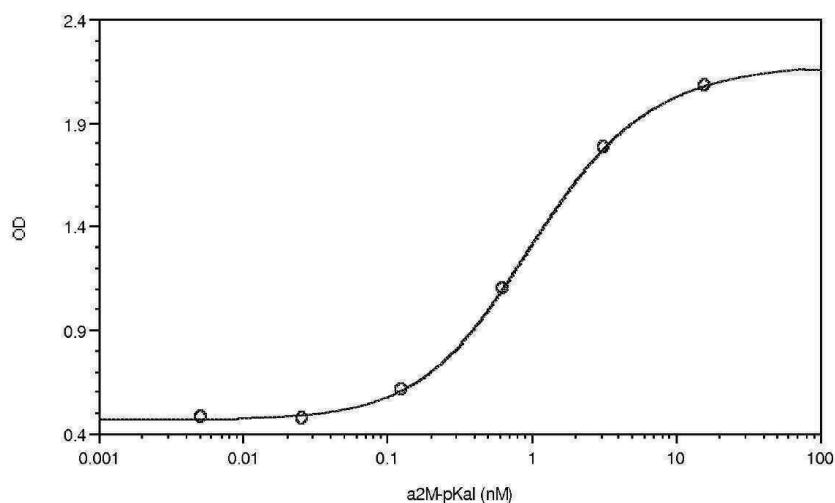
도면6



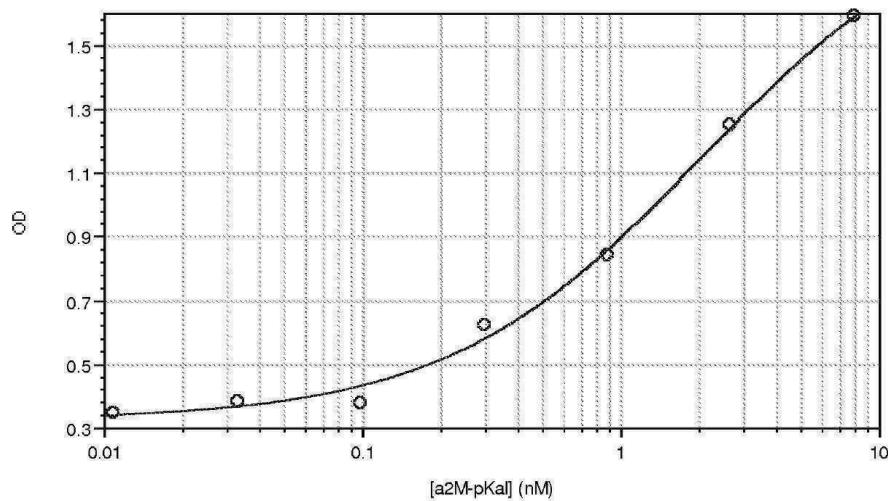
도면7



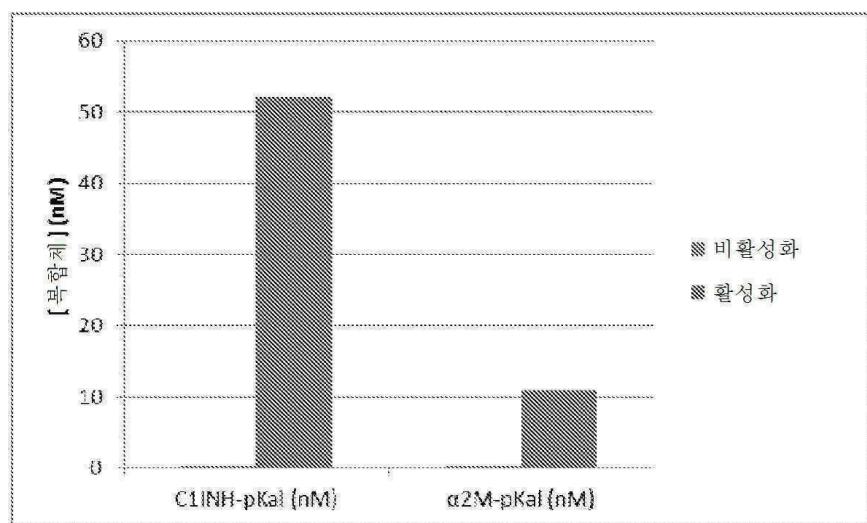
도면8



도면9

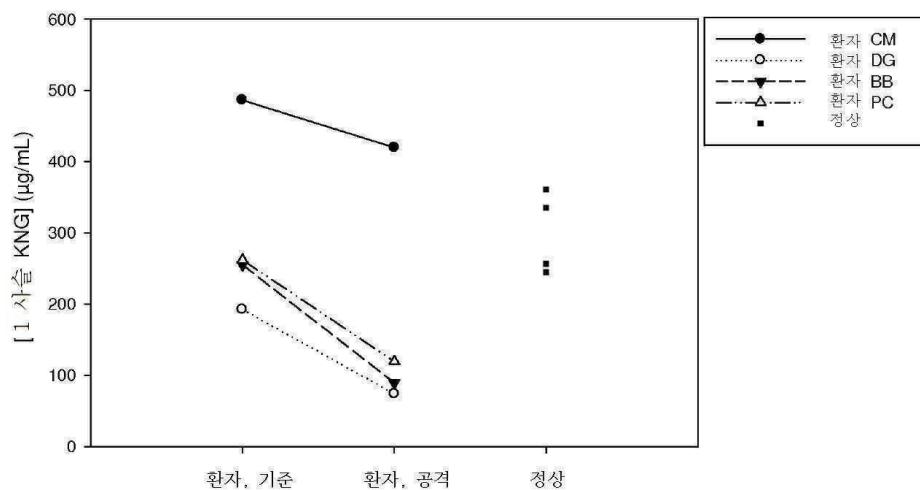


도면10

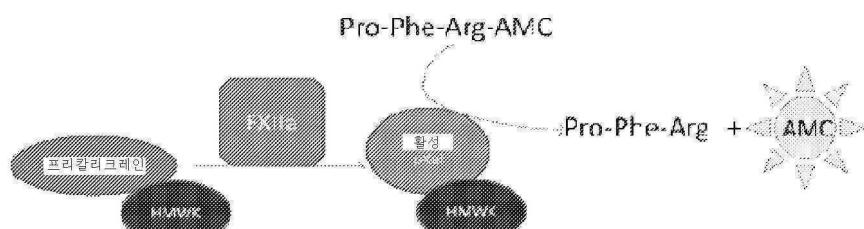


도면11

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

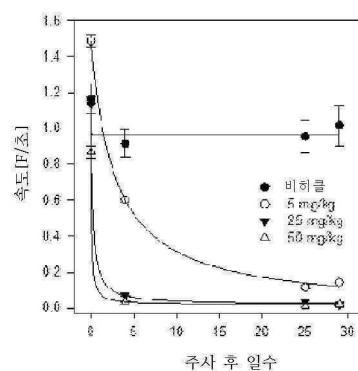


도면12

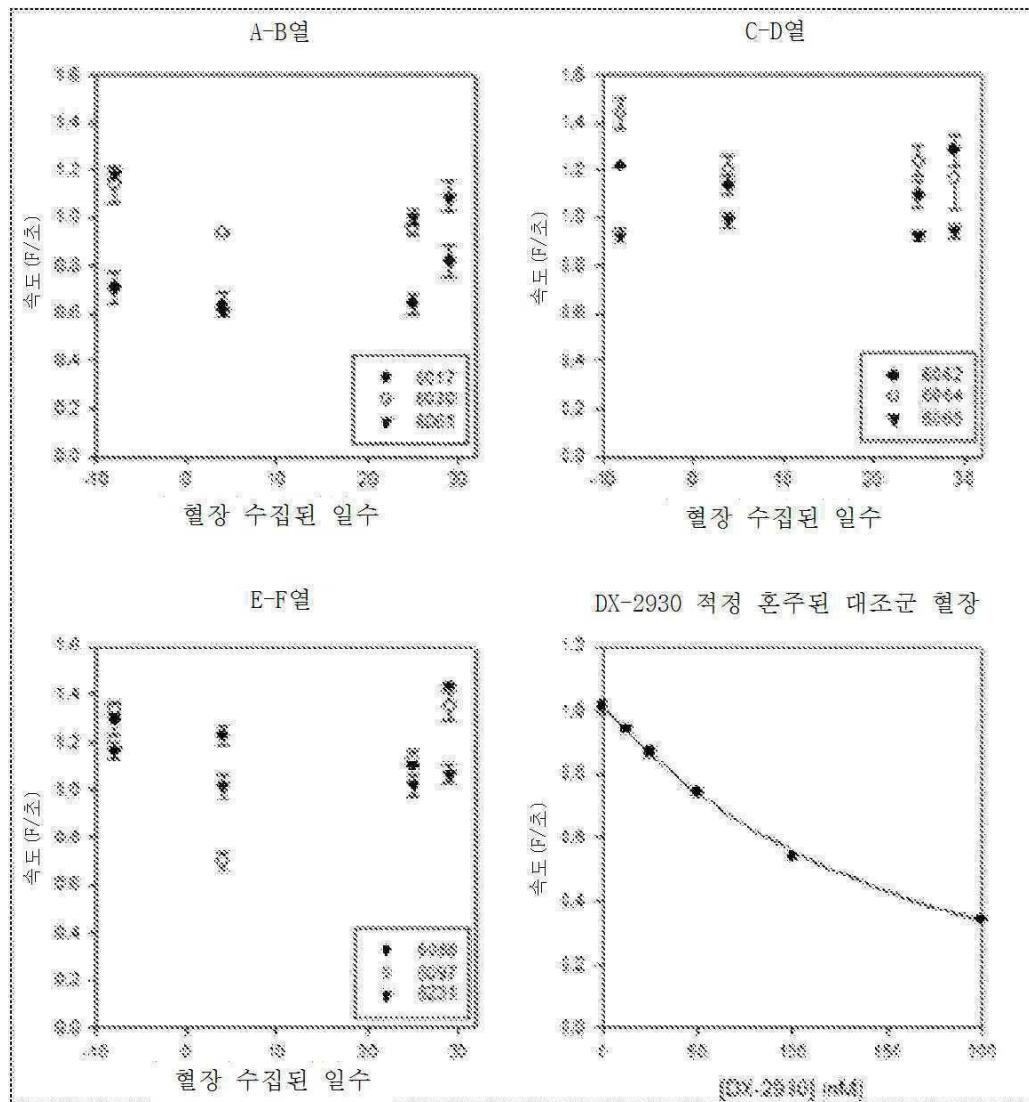


DX-2930 치료된 원숭이에서의
생체외 pKal 활성

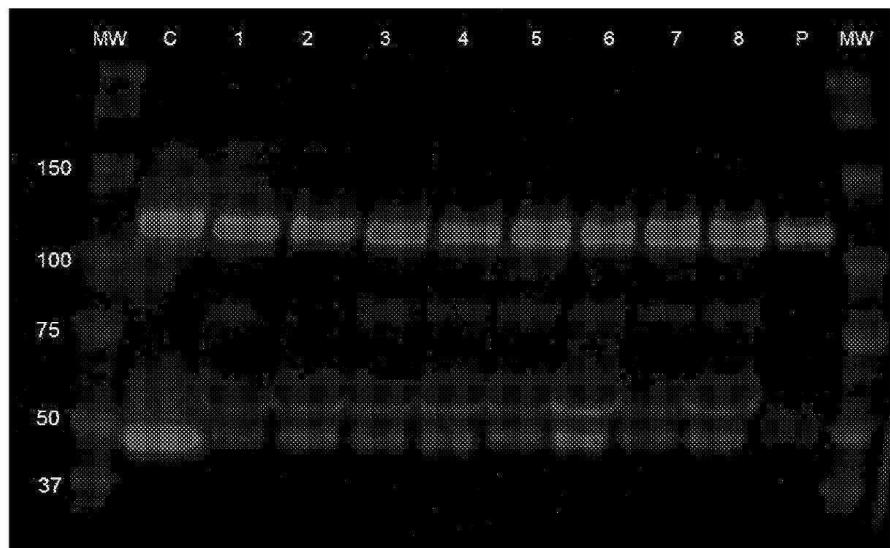
- 프로토콜**
- 2930을 순수한 혈장에 첨가한다
 - 원충제에 의해 1:40 희석하고, 96웰 마이크로플레이트에 첨가한다
 - 동축된 "활성화제"(FXIIIa)를 첨가한다
 - 염증에서 2분 동안 항온처리한다
 - 옥수수 트립신 저해제 (CTI)의 첨가에 의해 활성화를 중단시킨다
 - 형평 웹타이드 기질에 대한 단백질분해 활성의 측정을 위해 추가로 1:10 희석한다



도면13

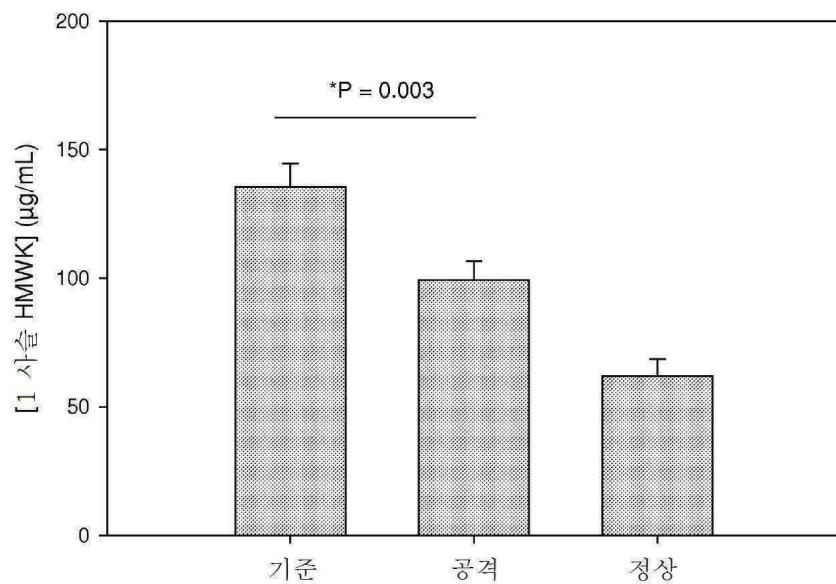
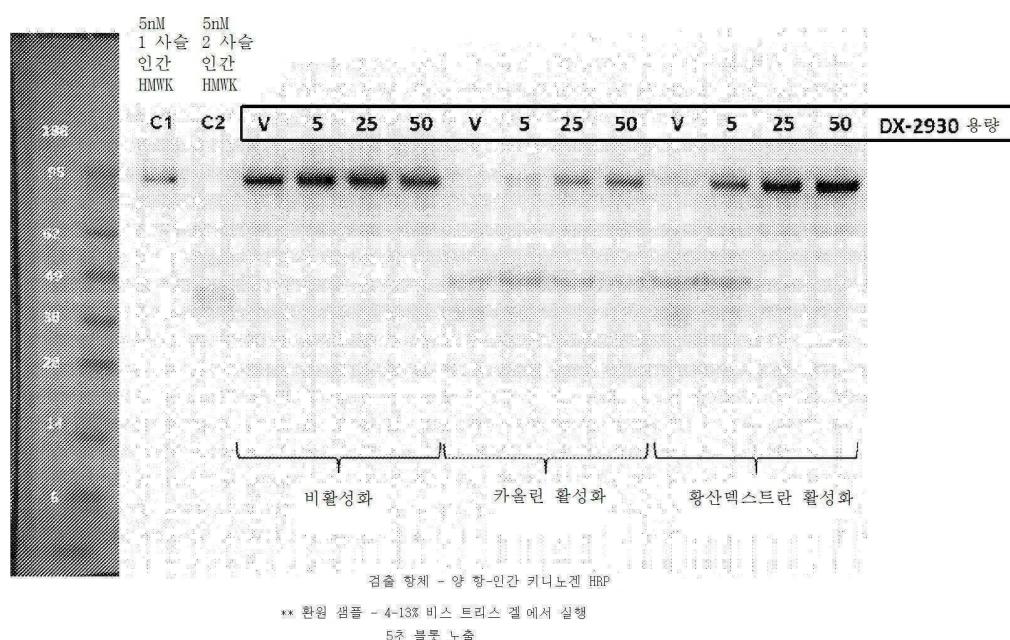


도면14

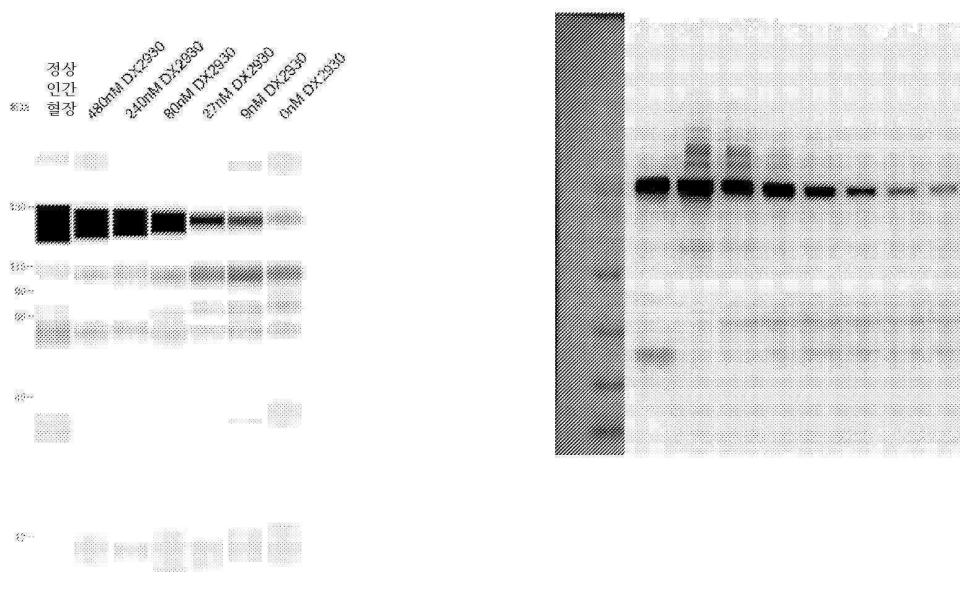


도면15

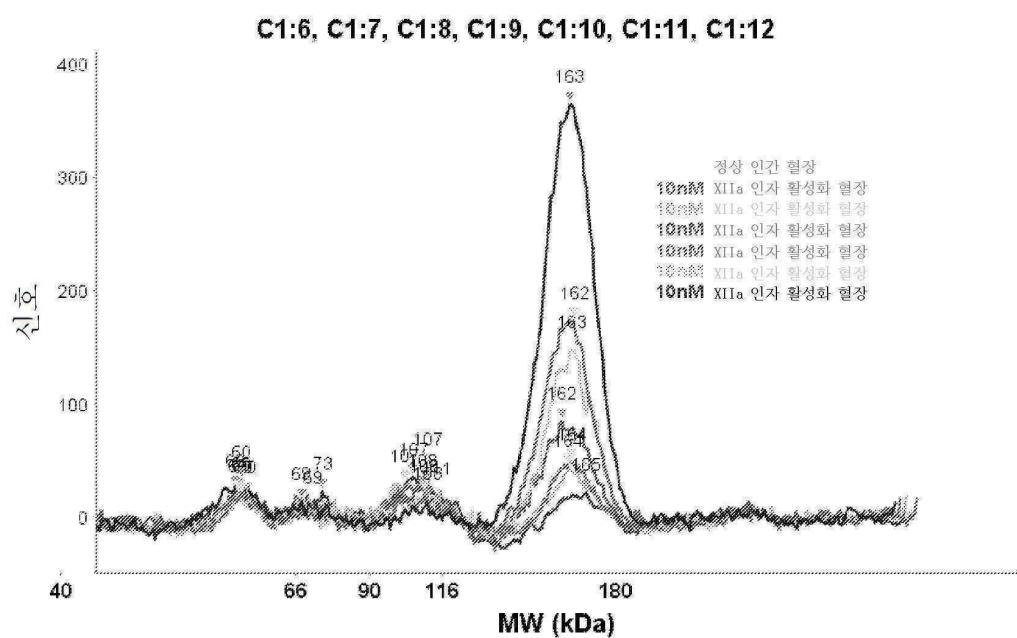
HAE 환자 혈장에서의 예측된 1 사슬 키니노겐 농도
 (공격 동안 10명의 환자 및 기준 상태 동안 15명의 환자로부터의 샘플)
 오차 = SEM

**도면16**

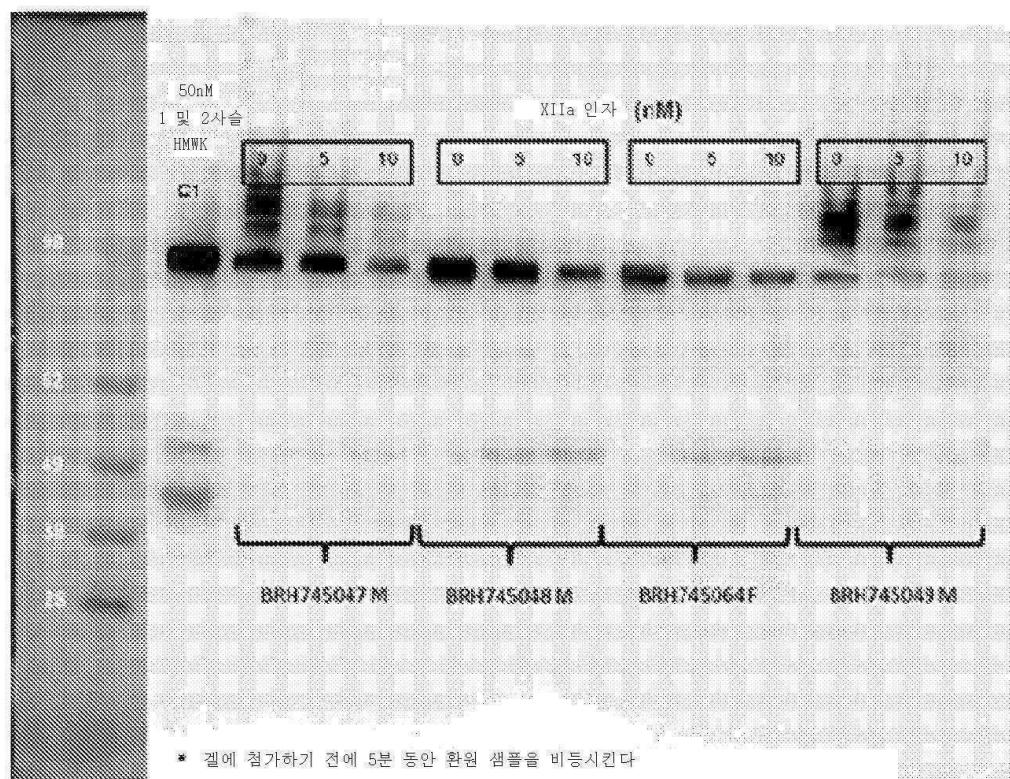
도면17



도면18

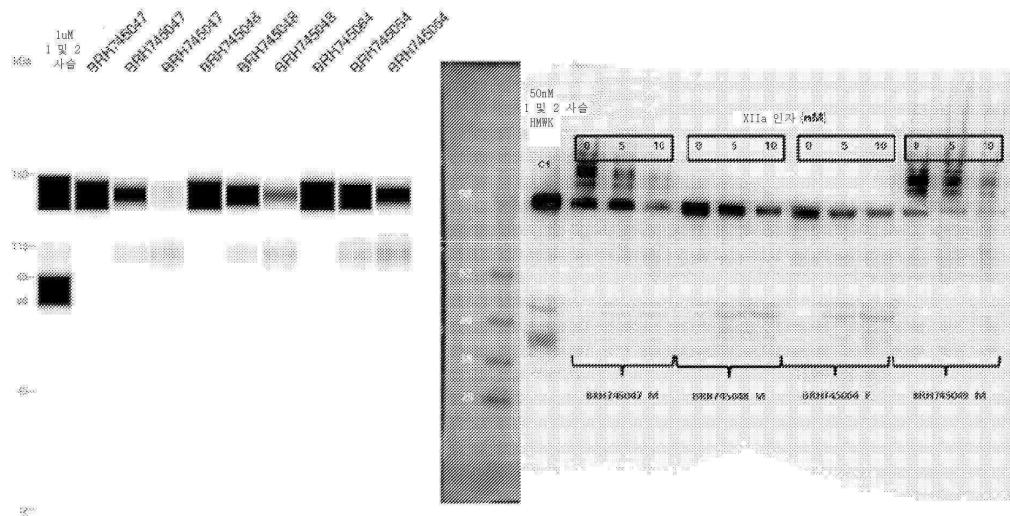


도면19

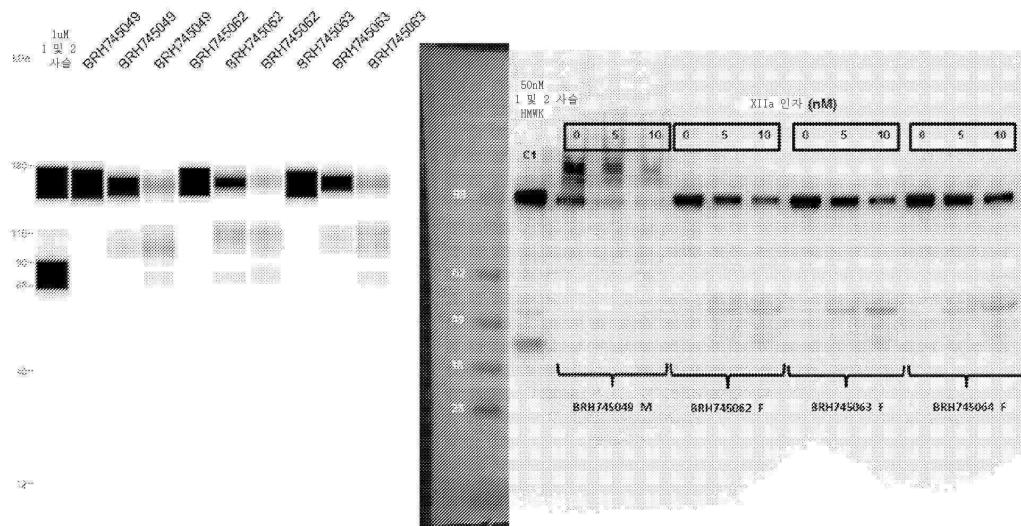


- * 절에 첨가하기 전에 5분 동안 환원 샘플을 비등시킨다
- * 샘플을 1:20 회석한다
- * 4-12% 비스-트리스 절에서 실행한다 (90분 동안 150V에서 실행)
- * iBlot 7분 블롯 이동 시간, P3
- * 1:1000 검출 항체: 마우스 항-인간 키니노겐 (mAB 16호)
- * 5초 블롯 노출 시간

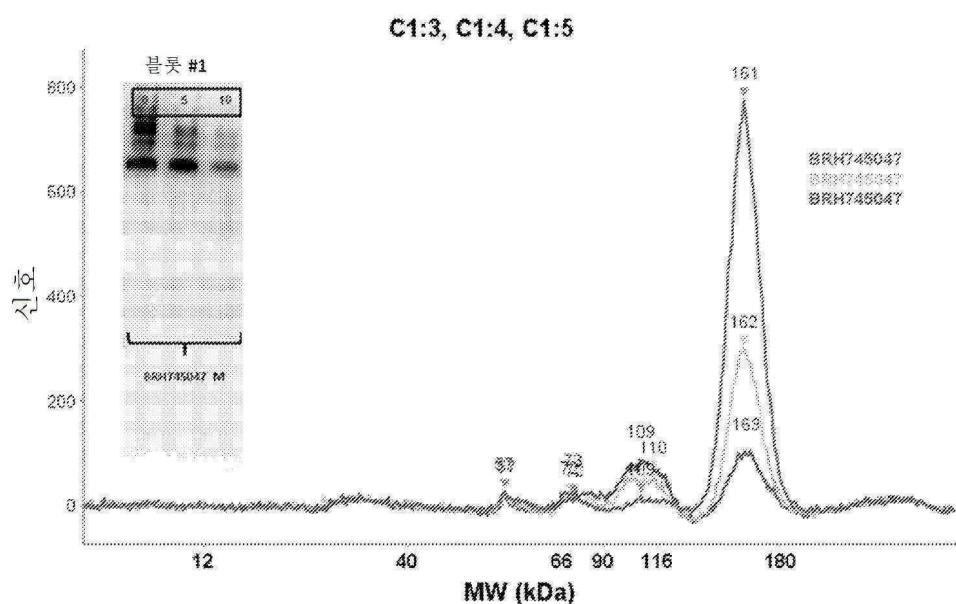
도면20



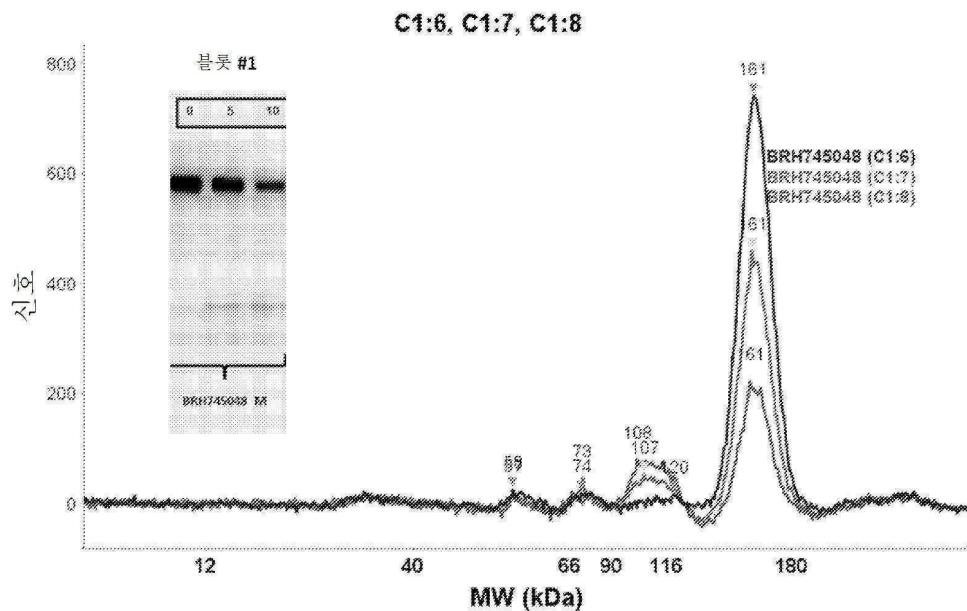
도면21



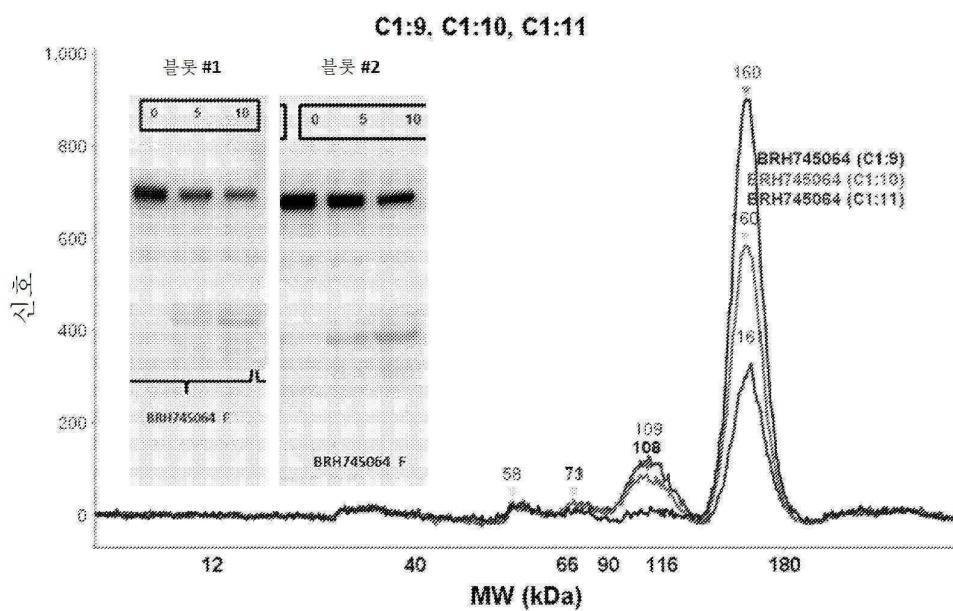
도면22



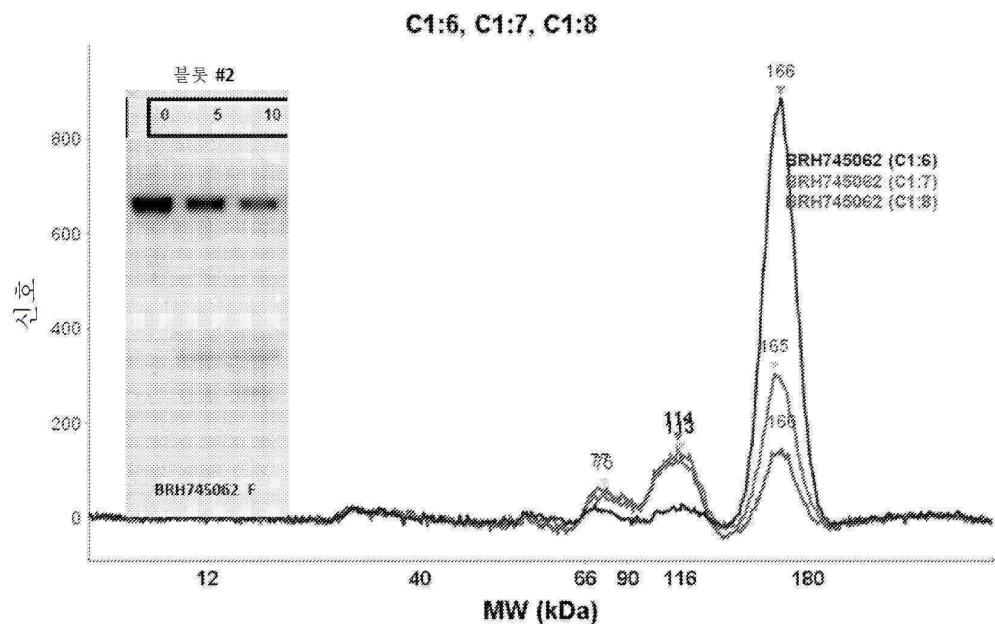
도면23



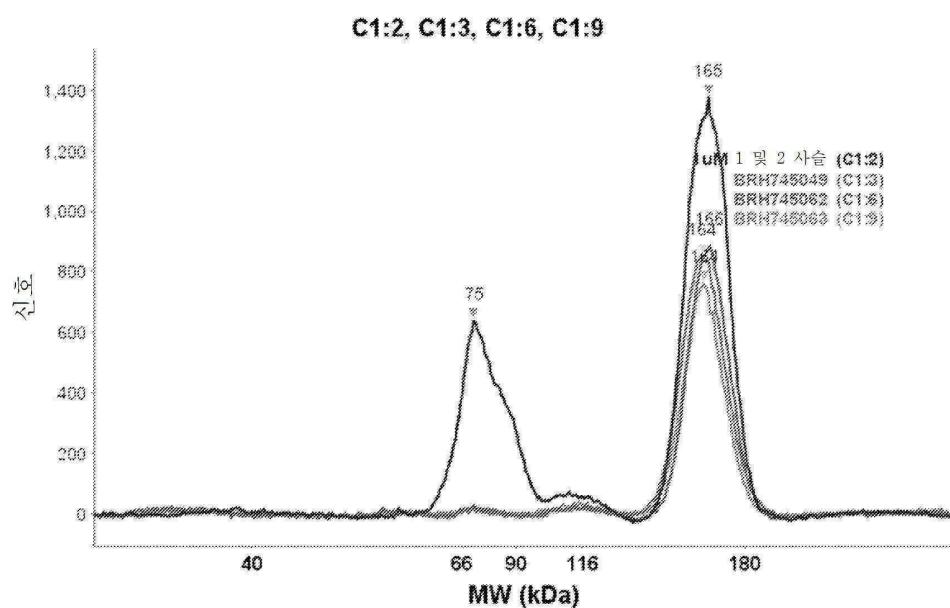
도면24



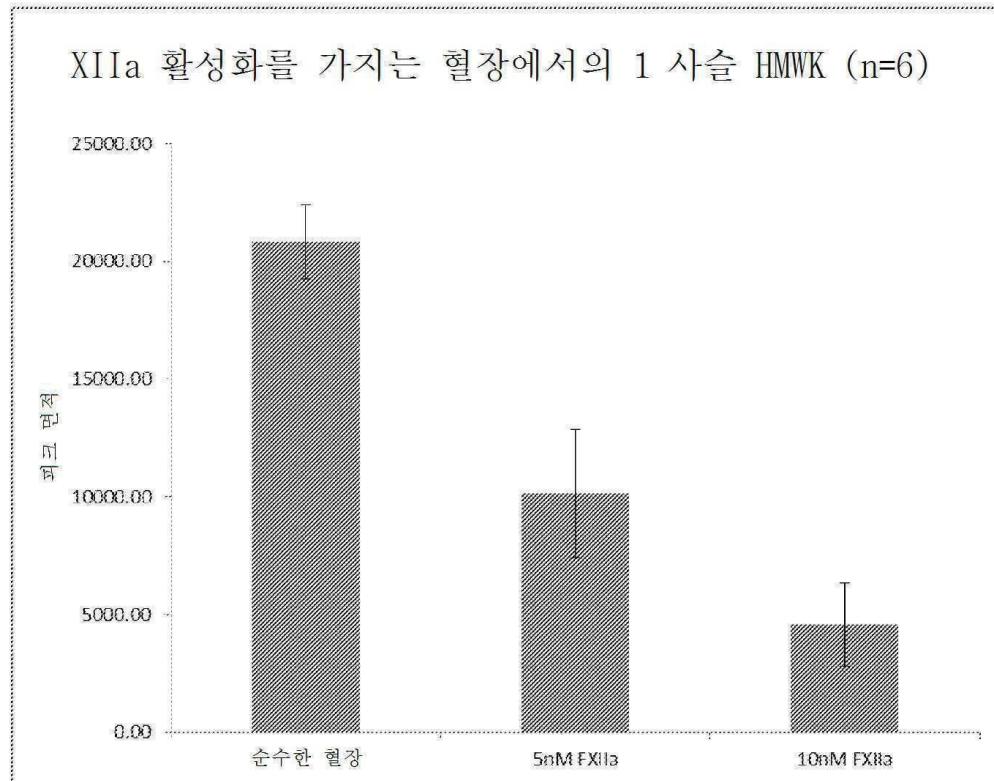
도면25



도면26

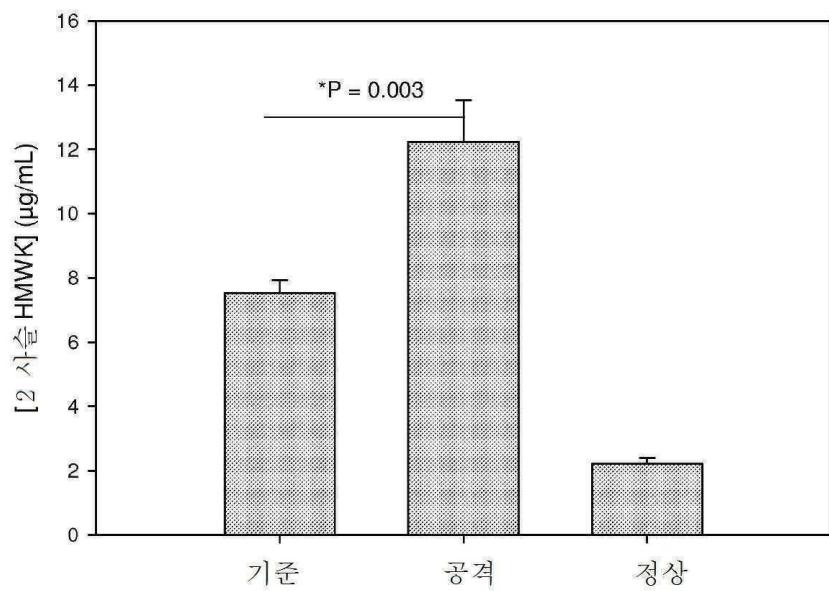


도면27

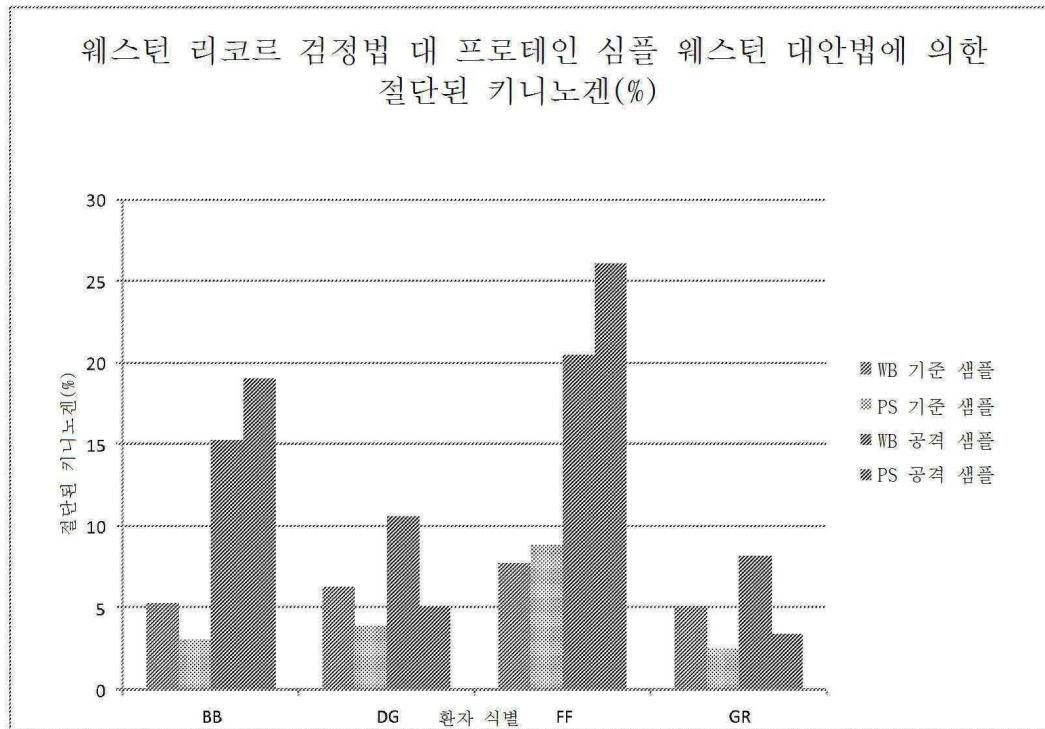


도면28

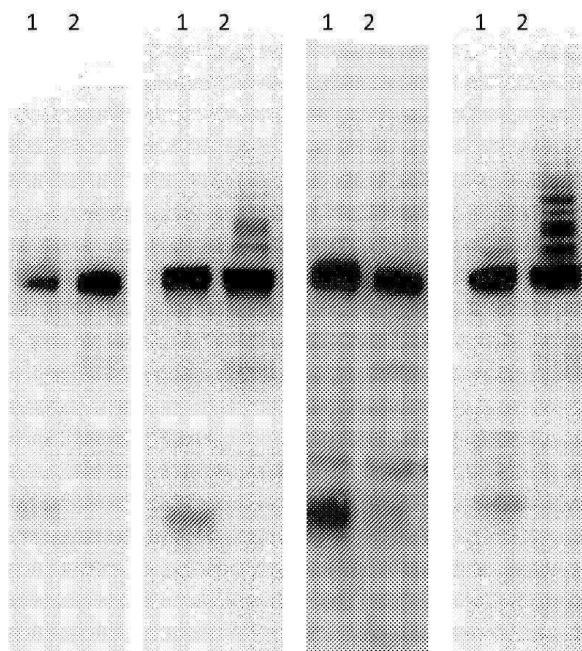
HAE 환자 혈장에서의 예측된 2 사슬 키니노겐 농도
(공격 동안 10명의 환자 및 기준 상태 동안 15명의 환자로부터의 샘플)



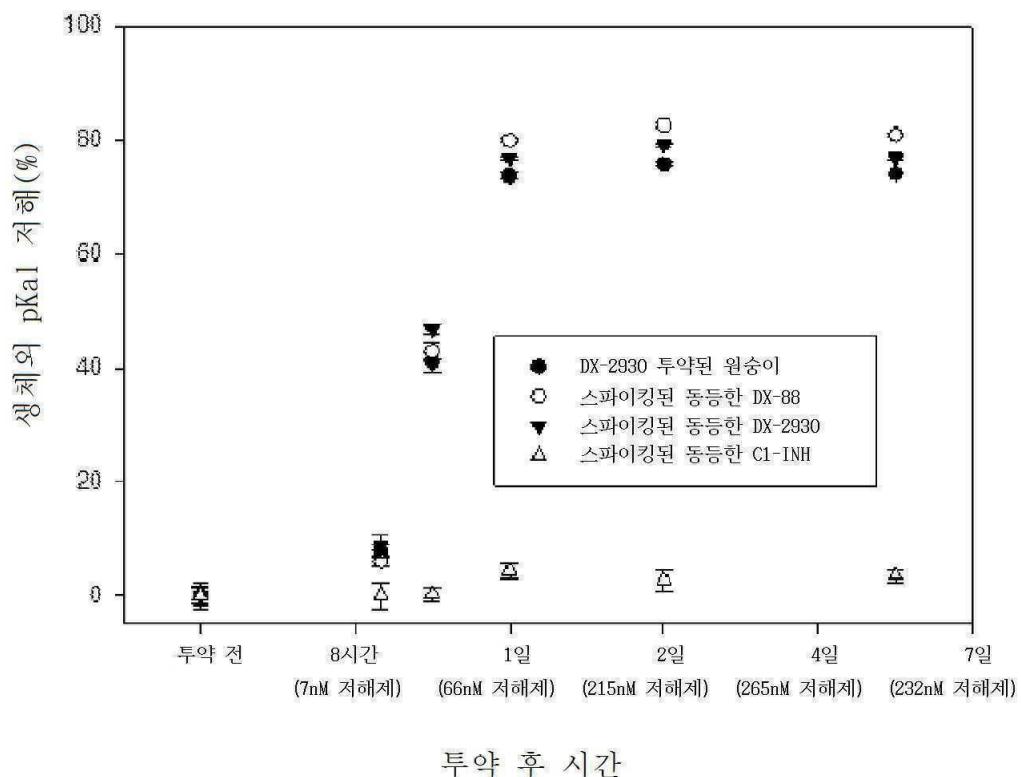
도면29



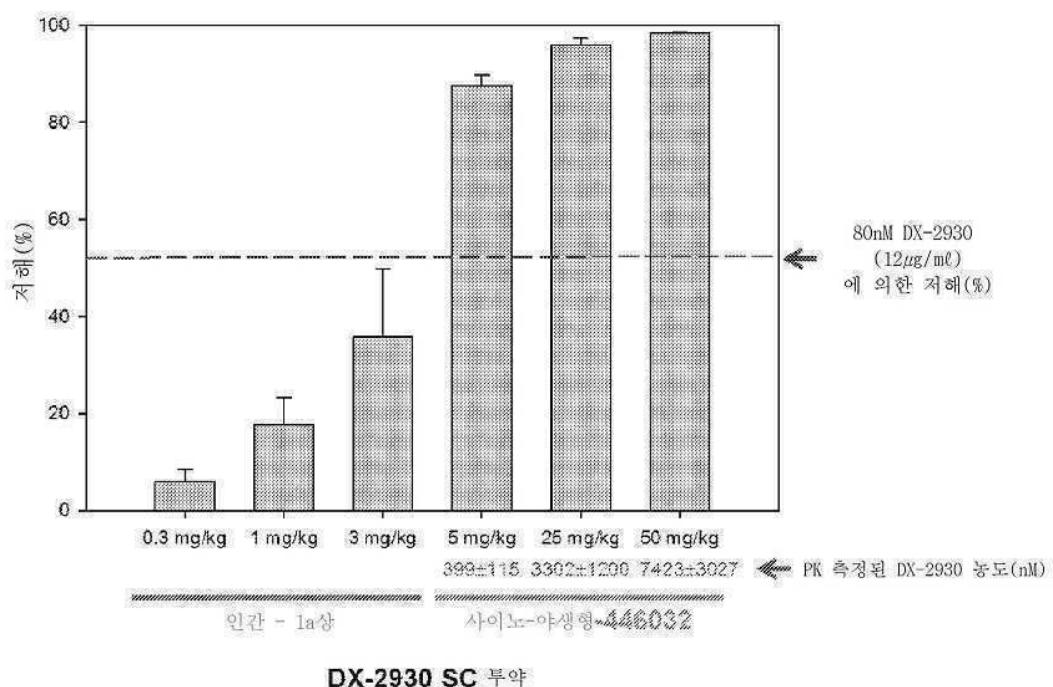
도면30



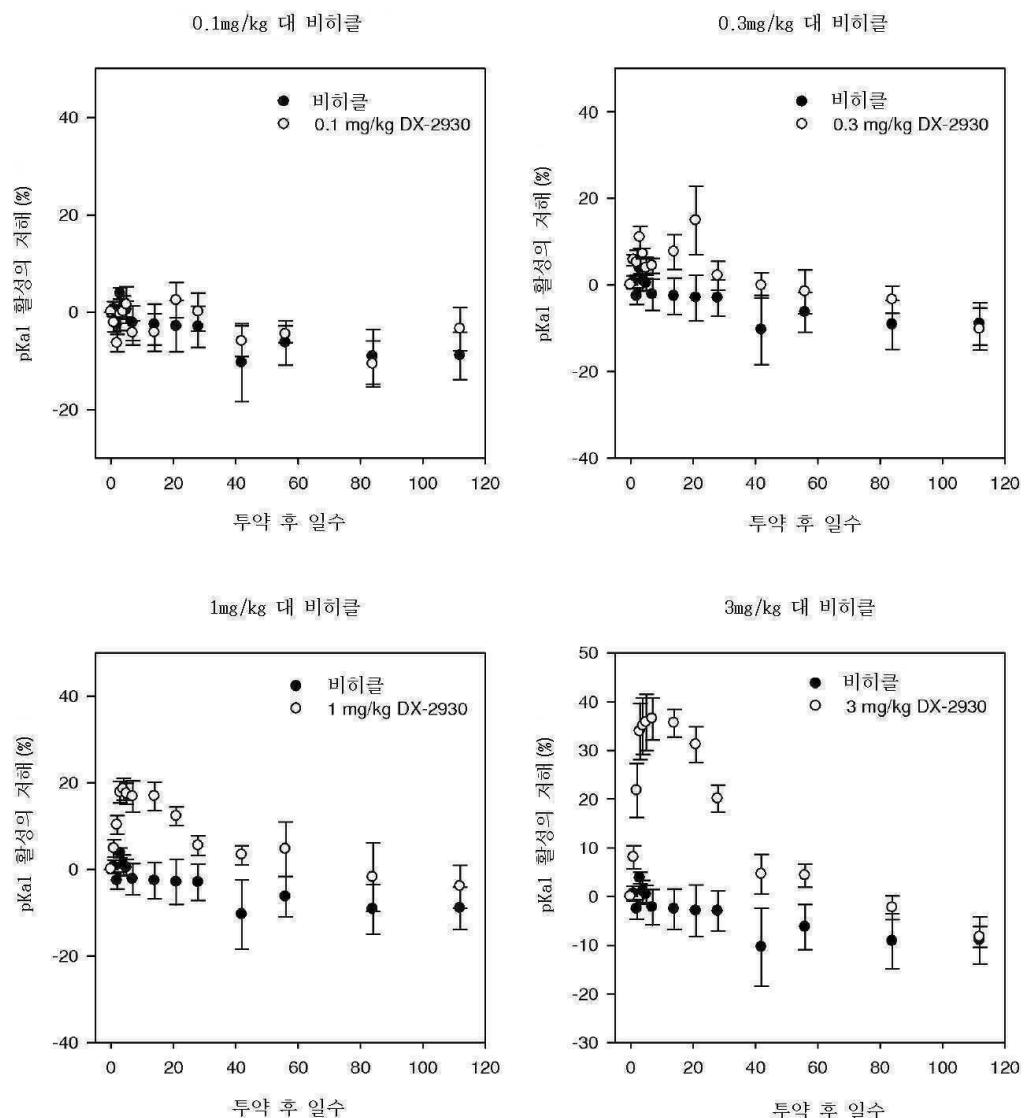
도면31



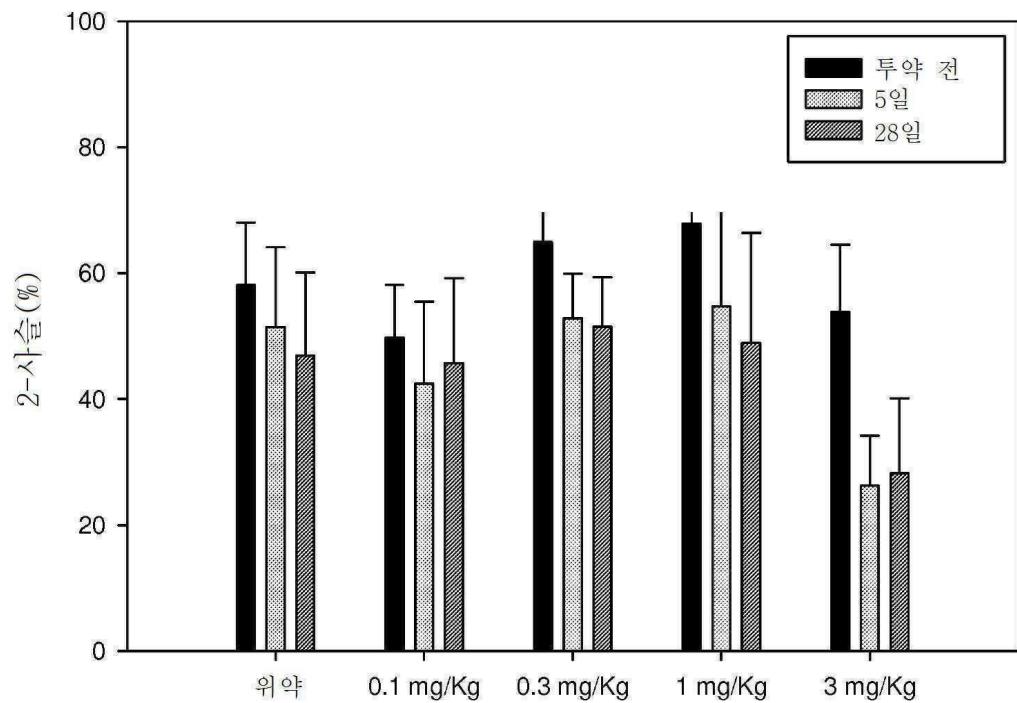
도면32



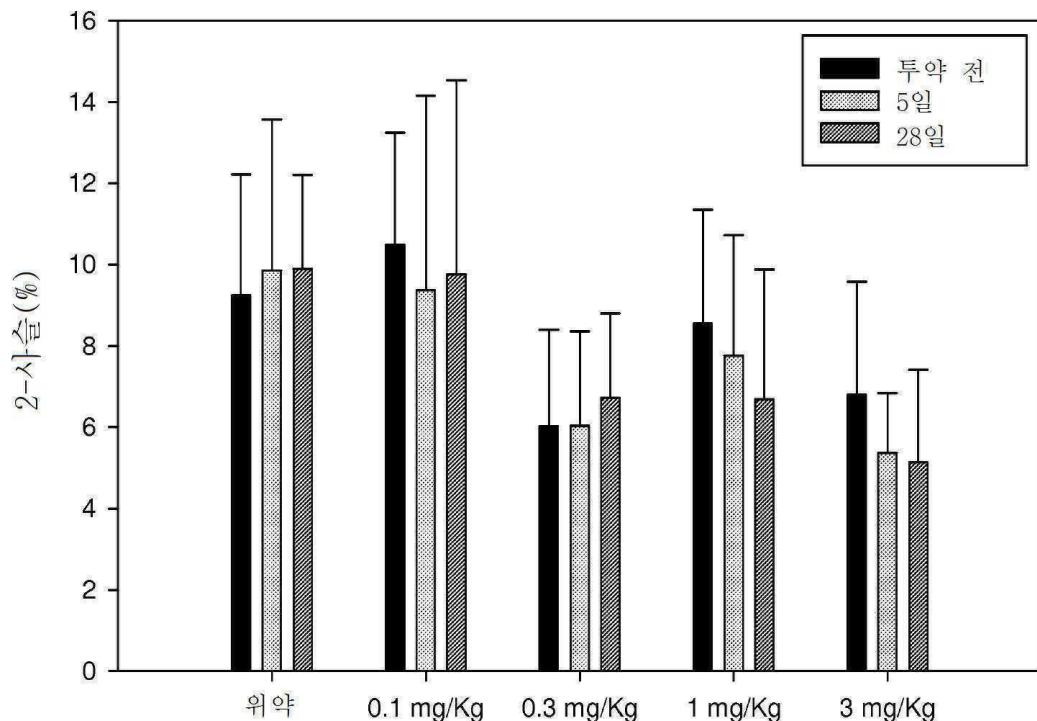
도면33



도면34



도면35



서 열 목 륙

<110> DYAX CORP.

<120> ASSAYS FOR DETERMINING PLASMA KALLIKREIN SYSTEM BIOMARKERS

<130> WO 2015/061183

<140> PCT/US2014/061247

<141> 2014-10-17

<150> US 61/939,837

<151> 2014-02-14

<150> US 61/893,505

<151> 2013-10-21

<160> 7

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 304

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 1

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu

20	25	30
----	----	----

Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys

35	40	45
----	----	----

Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys

50	55	60
----	----	----

Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu

65	70	75	80
----	----	----	----

Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser

85	90	95
----	----	----

Leu Glu Glu Cys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile

100	105	110
-----	-----	-----

Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu

115	120	125
-----	-----	-----

Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn

130	135	140
-----	-----	-----

Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly

Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu

Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn

Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu

195 200 205

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

Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly

225 230 235 240

Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn

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

Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys

Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met

295 300

<210> 2

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 2

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala

35 40 45

Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala

50 55

<210> 3

<211> 60

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 3

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys

1 5 10 15

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys

20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu

35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp

50 55 60

<210> 4

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 4

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Phe Ser Tyr Gly Gly Cys Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu

35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp

50 55

<210> 5

<211> 644

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser

1 5 10 15

Leu Thr Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp

20 25 30

Leu Phe Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn

35 40 45

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

50 55 60

Thr Val Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Asp Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly

100 105 110

Lys Arg Ser Ser Thr Lys Phe Ser Val Ala Thr Gln Thr Cys Gln Ile

115 120 125

Thr Pro Ala Glu Gly Pro Val Val Thr Ala Gln Tyr Asp Cys Leu Gly

130 135 140

Cys Val His Pro Ile Ser Thr Gln Ser Pro Asp Leu Glu Pro Ile Leu

145 150 155 160

Arg His Gly Ile Gln Tyr Phe Asn Asn Asn Thr Gln His Ser Ser Leu

165 170 175

Phe Met Leu Asn Glu Val Lys Arg Ala Gln Arg Gln Val Val Ala Gly

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

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

Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys

485 490 495

His Lys His Gly His Gly His Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys

500 505 510

Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr

625 630 635 640

Asp Gly Leu Ser

<210> 6

<211> 362

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 6

Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp Leu Phe

1 5 10 15

Lys Ala Val Asp Ala Ala Leu Lys Lys Tyr Asn Ser Gln Asn Gln Ser

20 25 30

Asn Asn Gln Phe Val Leu Tyr Arg Ile Thr Glu Ala Thr Lys Thr Val
 35 40 45
 Gly Ser Asp Thr Phe Tyr Ser Phe Lys Tyr Glu Ile Lys Glu Gly Asp
 50 55 60
 Cys Pro Val Gln Ser Gly Lys Thr Trp Gln Asp Cys Glu Tyr Lys Asp
 65 70 75 80
 Ala Ala Lys Ala Ala Thr Gly Glu Cys Thr Ala Thr Val Gly Lys Arg
 85 90 95

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

165 170 175

Phe Arg Ile Thr Tyr Ser Ile Val Gln Thr Asn Cys Ser Lys Glu Asn
 180 185 190
 Phe Leu Phe Leu Thr Pro Asp Cys Lys Ser Leu Trp Asn Gly Asp Thr
 195 200 205
 Gly Glu Cys Thr Asp Asn Ala Tyr Ile Asp Ile Gln Leu Arg Ile Ala
 210 215 220

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

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

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

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

Ala Arg Val Gln Val Val Ala Gly Lys Lys Tyr Phe Ile Asp Phe Val

290 295 300

Ala Arg Glu Thr Thr Cys Ser Lys Glu Ser Asn Glu Glu Leu Thr Glu

305 310 315 320

Ser Cys Glu Thr Lys Lys Leu Gly Gln Ser Leu Asp Cys Asn Ala Glu

325 330 335

Val Tyr Val Val Pro Trp Glu Lys Lys Ile Tyr Pro Thr Val Asn Cys

340 345 350

Gln Pro Leu Gly Met Ile Ser Leu Met Lys

355 360

<210> 7

<211> 255

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 7

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro

1 5 10 15

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

20 25 30

Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg

35 40 45

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His

50 55 60

Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His

65 70 75 80

Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His

85 90 95

Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His

100 105 110

Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn

115 120 125

Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser Glu Asp Ser Thr Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln Ile Asp Pro Asn Gly

195 200 205

Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp Thr Thr Ser Pro Lys

210 215 220

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

225 230 235 240

Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser

245 250 255