



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 857 552**

⑮ Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2016 PCT/US2016/057640**

⑦ Fecha y número de publicación internacional: **27.04.2017 WO17070170**

⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2016 E 16791171 (8)**

⑩ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 3365685**

④ Título: **Inmunoensayo para detectar cininógenos de alto peso molecular escindido**

⑩ Prioridad:

**19.10.2015 US 201562243505 P
12.05.2016 US 201662335311 P**

⑤ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2021

⑦ Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (100.0%)
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka, JP**

⑧ Inventor/es:

**SEXTON, DANIEL, J.;
FAUCETTE, RYAN y
COSIC, JANJA**

⑨ Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 857 552 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inmunoensayo para detectar cininógenos de alto peso molecular escindido

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE DESCRIPCIÓN

Los cininógenos son precursores de cinina, tales como bradicinina y calidina. Hay dos tipos de cininógenos humanos, cininógeno de alto peso molecular (HMWK) y cininógeno de bajo peso molecular (LMWK), que son variantes de ayuste. El HMWK actúa principalmente como cofactor en la coagulación e inflamación, y es el sustrato preferido para la generación de bradicinina mediada por calicreína plasmática (pKal).

La calicreína plasmática (pKal) es la principal enzima generadora de bradicinina en la circulación. La activación de pKal se produce a través del sistema de contacto que se ha relacionado con la patología de la enfermedad asociada con el angioedema hereditario (HAE). pKal escinde HMWK (un polipéptido monocatenario) para producir bradicinina y HMWK en forma escindida, que contiene dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace de disulfuro. Cugno et al., Blood (1997) 89:3213-3218.

El HMWK escindido aumentó hasta alrededor de 47% del cininógeno total durante un ataque de angioedema hereditario (HAE). Cugno et al., Blood (1997) 89:3213-3218, haciendo un biomarcador para monitorizar el ataque de HAE. Por lo tanto, es de interés desarrollar ensayos sensibles y fiables para detectar el nivel del HMWK escindido en muestras biológicas.

El documento WO 2014/113712 describe métodos para evaluar a un sujeto basados en valores de cininógeno intacto y/o escindido en una muestra del sujeto.

El documento WO 2015/061183 describe métodos y ensayos para determinar el nivel de activación del sistema de pKal.

El documento US 5.047.323 describe dos nuevas líneas celulares, ATCC #HB-8963 y ATCC #HB-8964, que producen anticuerpos monoclonales contra cininógeno humano.

Berrettini et al. (1986, Blood, 68 (2), 455-62) describen la detección de la escisión *in vitro* e *in vivo* de HMWK en plasma humano mediante immunotransferencia con anticuerpos monoclonales.

El documento WO 2015/061182 describe métodos, kits y composiciones para diagnosticar y tratar enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, y colitis ulcerosa.

SUMARIO DE LA PRESENTE INVENCIÓN

La invención proporciona un método de inmunoensayo para detectar un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, comprendiendo el método:

(i) proporcionar un elemento de soporte, sobre el cual se inmoviliza un primer agente que se une específicamente a un HMWK escindido;

(ii) poner en contacto al elemento de soporte de (i) con una muestra biológica sospechosa de contener un HMWK escindido;

(iii) poner en contacto el elemento de soporte obtenido en (ii) con un segundo agente que se une a HMWK, en el que el segundo agente está conjugado con un marcador; y

(iv) detectar una señal liberada del marcador del segundo agente que está unido al elemento de soporte, directa o indirectamente, para determinar el nivel del HMWK escindido en la muestra biológica,

en el que el primer agente es un anticuerpo que comprende una secuencia de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada FSFYVMV, una secuencia de CDR2 de cadena pesada GISPSGGNTAYADSVK, y una secuencia de CDR3 de cadena pesada KLFYYDDTKGYFDF, y una secuencia de CDR1 de cadena ligera SGSSSNIGSNVY, una secuencia de CDR2 de cadena ligera RNNQRPS, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera AWDDSLNGRV.

La invención proporciona además un anticuerpo aislado, que se une específicamente a un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, en la que el anticuerpo comprende una secuencia de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada FSFYVMV, una secuencia de CDR2 de cadena pesada GISPSGGNTAYADSVK, y una secuencia de CDR3 de cadena pesada KLFYYDDTKGYFDF, y una secuencia de CDR1 de cadena ligera SGSSSNIGSNVY, una secuencia de CDR2 de cadena ligera RNNQRPS, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera AWDDSLNGRV.

La invención proporciona además un anticuerpo aislado que se une tanto a cininógeno intacto de alto peso molecular (HMWK) como a un HMWK escindido, en la que:

(a) el anticuerpo no se une al cininógeno de bajo peso molecular (LMWK),
en la que el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

- 5 i) SEQ ID NOs: 6 y 7;
- ii) SEQ ID NOs: 8 y 9;
- iii) SEQ ID NOs: 10 y 11;
- iv) SEQ ID NOs: 12 y 13;
- v) SEQ ID NOs: 14 y 15;
- vi) SEQ ID NOs: 16 y 17;
- 10 vii) SEQ ID NOs: 18 y 19;
- viii) SEQ ID NOs: 20 y 21;
- ix) SEQ ID NOs: 22 y 23;
- x) SEQ ID NOs: 24 y 25;
- xi) SEQ ID NOs: 26 y 27;
- 15 xii) SEC ID NOs: 28 y 29;
- xiii) SEC ID NOs: 30 y 31; o
- xiv) SEQ ID NOs: 32 y 33,

o compite contra un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

- 20 i) SEQ ID NOs: 6 y 7;
- ii) SEQ ID NOs: 8 y 9;
- iii) SEQ ID NOs: 10 y 11;
- iv) SEQ ID NOs: 12 y 13;
- v) SEQ ID NOs: 14 y 15;
- vi) SEQ ID NOs: 16 y 17;
- 25 vii) SEQ ID NOs: 18 y 19;
- viii) SEQ ID NOs: 20 y 21;
- ix) SEQ ID NOs: 22 y 23;
- x) SEQ ID NOs: 24 y 25;
- xi) SEQ ID NOs: 26 y 27;
- 30 xii) SEC ID NOs: 28 y 29;
- xiii) SEC ID NOs: 30 y 31; o
- xiv) SEQ ID NOs: 32 y 33

por la unión al HMWK intacto y/o el HMWK escindido,

35 por ejemplo, en la que el anticuerpo comprende las mismas CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

- i) SEQ ID NOs: 6 y 7;
- ii) SEQ ID NOs: 8 y 9;

- iii) SEQ ID NOs: 10 y 11;
- iv) SEQ ID NOs: 12 y 13;
- v) SEQ ID NOs: 14 y 15;
- vi) SEQ ID NOs: 16 y 17;
- 5 vii) SEQ ID NOs: 18 y 19;
- viii) SEQ ID NOs: 20 y 21;
- ix) SEQ ID NOs: 22 y 23;
- x) SEQ ID NOs: 24 y 25;
- xi) SEQ ID NOs: 26 y 27;
- 10 xii) SEC ID NOs: 28 y 29;
- xiii) SEC ID NOs: 30 y 31; o
- xiv) SEC ID NOs: 32 y 33; o
- (b) el anticuerpo también se une a LMWK,
 15 en la que el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:
- i) SEQ ID NOs: 34 y 35;
- ii) SEQ ID NOs: 36 y 37;
- iii) SEQ ID NOs: 38 y 39;
- iv) SEQ ID NOs: 40 y 41;
- 20 v) SEQ ID NOs: 42 y 43;
- vi) SEQ ID NOs: 44 y 45;
- vii) SEQ ID NOs: 46 y 47;
- viii) SEQ ID NOs: 48 y 49;
- ix) SEC ID NOs: 50 y 51;
- 25 x) SEQ ID NOs: 52 y 53;
- xi) SEC ID NOs: 54 y 55;
- xii) SEC ID NOs: 56 y 57;
- xiii) SEC ID NOs: 58 y 59;
- xiv) SEQ ID NOs: 60 y 61;
- 30 xv) SEC ID NOs: 62 y 63;
- xvi) SEC ID NOs: 64 y 65;
- xvii) SEQ ID NOs: 66 y 67; o
- xviii) SEQ ID NOs: 76 y 77;
- o compite contra un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:
- 35 i) SEQ ID NOs: 34 y 35;
- ii) SEQ ID NOs: 36 y 37;
- iii) SEQ ID NOs: 38 y 39;

- iv) SEQ ID NOs: 40 y 41;
- v) SEQ ID NOs: 42 y 43;
- vi) SEQ ID NOs: 44 y 45;
- vii) SEQ ID NOs: 46 y 47;
- 5 viii) SEQ ID NOs: 48 y 49;
- ix) SEC ID NOs: 50 y 51;
- x) SEQ ID NOs: 52 y 53;
- xi) SEC ID NOs: 54 y 55;
- xii) SEC ID NOs: 56 y 57;
- 10 xiii) SEC ID NOs: 58 y 59;
- xiv) SEQ ID NOs: 60 y 61;
- xv) SEC ID NOs: 62 y 63;
- xvi) SEC ID NOs: 64 y 65;
- xvii) SEQ ID NOs: 66 y 67; o
- 15 xviii) SEQ ID NOs: 76 y 77,

por la unión al HMWK intacto, el HMWK escindido y/o el LMWK.

La invención proporciona además un método para detectar en una muestra un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, comprendiendo el método:

- (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un HMWK escindido con un anticuerpo de la invención;
- 20 (ii) medir un complejo del HMWK escindido y el anticuerpo formado en la etapa (i); y
- (iii) determinar en la muestra el nivel del HMWK escindido basándose en el resultado de la etapa (ii).

SUMARIO DE LA PRESENTE DESCRIPCIÓN

Algunos aspectos de la presente descripción proporcionan un inmunoensayo para detectar un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, con alta sensibilidad y especificidad. El método de la invención, como se define en las 25 reivindicaciones, comprende (i) proporcionar un elemento de soporte sobre el cual está unido un primer agente (por ejemplo, un anticuerpo tal como 559B-M004-B04) que se une específicamente a un HMWK escindido; (ii) poner en contacto el elemento de soporte de (i) con una muestra biológica sospechosa de contener un HMWK escindido; (iii) poner en contacto el elemento de soporte obtenido en (ii) con un segundo agente que se une a HMWK, en el que el 30 segundo agente está conjugado con un marcador; y (iv) detectar una señal liberada del marcador del segundo agente que está unido al elemento de soporte, directa o indirectamente, para determinar en la muestra biológica el nivel del HMWK escindido. En algunos casos, la etapa (ii) se puede realizar en presencia de ZnCl₂.

En algunas realizaciones, antes de la etapa (ii), el elemento de soporte de (i) se incuba con un amortiguador de bloqueo.

35 En algunas realizaciones, el segundo agente es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, o una mezcla de dos o más anticuerpos monoclonales que se unen a HMWK. Los dos o más anticuerpos monoclonales en la mezcla pueden unirse a diferentes epítopos en HMWK. En algunas realizaciones, el marcador es un agente que libera una señal. En algunas realizaciones, el marcador es un miembro de un par receptor-ligando. En ese caso, el inmunoensayo 40 puede comprender, además, antes de la etapa (iv), poner en contacto el segundo agente en (iii), que está inmovilizado en el elemento de soporte, con el otro miembro del par receptor-ligando, en el que el otro miembro está conjugado con un agente que libera una señal. En un ejemplo, el par receptor-ligando es biotina y estreptavidina.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona métodos para detectar en una muestra un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, comprendiendo el método (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un HMWK escindido con cualquiera de los anticuerpos descritos aquí (por ejemplo, 559B-M004-B04); (ii) medir un complejo del HMWK escindido y el anticuerpo formado en la etapa (i); y (iii) determinar en la muestra el nivel 45 del HMWK escindido basándose en el resultado de la etapa (ii). En algunas realizaciones, la etapa (i) se realiza en

- 5 presencia de $ZnCl_2$. En algunas realizaciones, la etapa (i) se realiza usando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) o un ensayo de inmunotransferencia.
- 10 En cualquiera de los métodos descritos aquí, la muestra puede ser una muestra biológica obtenida de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano), tal como una muestra de suero de una muestra de plasma. En algunas realizaciones, el método comprende además recoger la muestra en un tubo de recogida de sangre a vacío, que comprende uno o más inhibidores de proteasas.
- 15 Cualquiera de los métodos de ensayo (por ejemplo, inmunoensayos) descritos aquí pueden ser un ensayo ELISA, un ensayo de transferencia Western, o un ensayo de flujo lateral.
- 20 En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un sujeto (por ejemplo, un paciente humano) que tiene una enfermedad. El método de ensayo puede comprender además determinar si la enfermedad está mediada por calicreína plasmática basándose en el nivel del HMWK escindido, siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra, con respecto al de una muestra de control, indicativa de que la enfermedad está mediada por calicreína plasmática.
- 25 Cualquiera de los métodos de ensayo descritos aquí puede comprender además identificar pacientes con enfermedades o trastornos mediados por calicreína plasmática, o evaluar la eficacia de un tratamiento de la enfermedad o trastorno basándose en los niveles de HMWK escindido. En algunos casos, el método puede comprender además administrar al sujeto una cantidad eficaz de un agente terapéutico, tal como un inhibidor de calicreína plasmática (pKal), un inhibidor del receptor de bradicinina 2 (B2R), y/o un inhibidor de la C1 esterasa, para tratar el trastorno, si se identifica que el sujeto tiene el trastorno. En algunos casos, el inhibidor de pKal es un anticuerpo anti-pKal. En algunos casos, el agente terapéutico es lanadelumab, ecallantida, icatibant, o inhibidor de la C1 esterasa derivada del plasma humano.
- 30 En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente humano que está en tratamiento para el trastorno, y en el que el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento basándose en el nivel del HMWK escindido que se determina en la etapa (iii), siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra del sujeto, con respecto al de una muestra de control, indicativa de la eficacia del tratamiento. En algunas realizaciones, el método comprende además identificar un tratamiento adecuado para el sujeto basándose en el nivel del HMWK escindido. En algunas realizaciones, el método comprende además identificar al sujeto como candidato para un tratamiento de la enfermedad basándose en el nivel del HMWK escindido.
- 35 En algunas realizaciones, el paciente humano tiene antecedentes de la enfermedad (por ejemplo, HAE). En algunas realizaciones, el método comprende además evaluar el riesgo de ataque de la enfermedad en el sujeto basándose en el nivel del HMWK escindido, siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra del sujeto, con respecto al de una muestra de control, indicativa del riesgo de ataque de la enfermedad. En algunos casos, el método comprende además administrar un agente terapéutico al sujeto, si el sujeto está en riesgo de un ataque de la enfermedad.
- 40 En otro aspecto, se proporciona un kit para detectar un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, comprendiendo el kit un primer agente (como se define en las reivindicaciones) que se une específicamente a un HMWK escindido. En algunas realizaciones, el kit comprende además un segundo agente que se une a HMWK, un elemento de soporte, o ambos, y opcionalmente instrucciones para detectar el HMWK escindido. En algunos ejemplos, el elemento de soporte es una placa de 96 pocos.
- 45 En otro aspecto de la descripción, se proporciona un anticuerpo aislado, que se une específicamente a un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une al mismo epítopo que 559B-M004-B04, o compite contra 559B-M004-B04 por unirse al HMWK escindido. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende las mismas regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada y de cadena ligera que 559B-M004-B04, por ejemplo, las mismas regiones variables de cadena pesada y ligera que 559B-M004-B04. En un ejemplo, el anticuerpo es 559B-M004-B04.
- 50 Cualquiera de los anticuerpos específicos para un HMWK escindido, según se define en las reivindicaciones, puede usarse en un método de la invención para detectar en una muestra un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido. Tal método puede comprender (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un HMWK escindido con el anticuerpo; (ii) medir un complejo del HMWK escindido y el anticuerpo formado en la etapa (i); y determinar en la muestra el nivel del HMWK escindido basándose en el resultado de la etapa (ii). En algunas realizaciones, la muestra es una muestra biológica tal como una muestra de suero o una muestra de plasma obtenida de un sujeto humano. Se puede confiar en el resultado obtenido con este método para determinar el riesgo de que un sujeto del que se obtiene la muestra desarrolle un trastorno mediado por calicreína plasmática, tal como HAE. En algunos casos, la etapa (i) se puede realizar en presencia de $ZnCl_2$.
- 55 Cualquiera de los métodos de inmunoensayo descritos aquí puede estar en formato de transferencia Western o formato ELISA.

En aún otro aspecto, se proporciona un anticuerpo aislado que se une tanto a un cininógeno intacto de alto peso molecular (HMWK) como a un HMWK escindido, como se define en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une a HMWK tanto intacto como escindido no se une al cininógeno de bajo peso molecular (LMWK). En algunas realizaciones, el anticuerpo se une al mismo epítopo que 559B-M0067-E02,

5 559B-M0039-G07, 559B-M0044-E09, 559B-M0003-C08, 559B-M0039-H06, 559B-M0039-D08, 559B-M0068-C07, 559B-M0021-G11, 559B-M0061-G06, 559B-M0036-G12, 559B-M0042-E06, 559B-M0070-H10, 559B-M0068-D01, o 559B-M0004-E08. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite contra 559B-M0067-E02, 559B-M0039-G07, 559B-M0044-E09, 559B-M0003-C08, 559B-M0039-H06, 559B-M0039-D08, 559B-M0068-C07, 559B-M0021-G11, 559B-M0061-G06, 559B-M0036-G12, 559B-M0042-E06, 559B-M0070-H10, 559B-M0068-D01, o 559B-M0004-E08 por la unión al HMWK intacto y/o al HMWK escindido.

10 Como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo puede comprender las mismas CDR de cadena pesada y de cadena ligera que 559B-M0067-E02, 559B-M0039-G07, 559B-M0044-E09, 559B-M0003-C08, 559B-M0039-H06, 559B-M0039-D08, 559B-M0068-C07, 559B-M0021-G11, 559B-M0061-G06, 559B-M0036-G12, 559B-M0042-E06, 559B-M0070-H10, 559B-M0068-D01, o 559B-M0004-E08. En algunos ejemplos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en 559B-M0067-E02, 559B-M0039-G07, 559B-M0044-E09, 559B-M0003-C08, 559B-M0039-H06, 559B-M0039-D08, 559B-M0068-C07, 559B-M0021-G11, 559B-M0061-G06, 559B-M0036-G12, 559B-M0042-E06, 559B-M0070-H10, 559B-M0068-D01, y 559B-M0004-E08.

15 En otras realizaciones, el anticuerpo que se une al HMWK tanto intacto como escindido también se une al LMWK, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une al mismo epítopo que 559B-

20 M0069-C09, 559B-M0038-F04, 559B-M0044-C05, 559B-M0047-H01, 559B-M0019-E12, 559B-X0004-B05, 559B-M0048-D12, 559B-M0053-G01, 559B-M0038-H03, 559B-M0017-H08, 559B-M0035-F05, 559B-M0035-H09, 559B-M0043-C06, 559B-M0003-A08, 559B-M0054-B11, 559B-M0067-G11, 559B-M0064-H02, o 559B-M0065-B10. En algunas realizaciones, el anticuerpo compite contra 559B-M0069-C09, 559B-M0038-F04, 559B-M0044-C05, 559B-M0047-H01, 559B-M0019-E12, 559B-X0004-B05, 559B-M0048-D12, 559B-M0053-G01, 559B-M0038-H03, 559B-M0043-C06, 559B-M0003-A08, 559B-M0054-B11, 559B-M0067-G11, 559B-M0064-H02, o 559B-M0065-B10 por la unión al HMWK intacto, al HMWK escindido, y/o al LMWK.

25 En algunas realizaciones como se define en las reivindicaciones, el anticuerpo comprende las mismas CDR de cadena pesada y de cadena ligera que 559B-M0069-C09, 559B-M0038-F04, 559B-M0044-C05, 559B-M0047-H01, 559B-M0019-E12, 559B-X0004-B05, 559B-M0048-D12, 559B-M0053-G01, 559B-M0038-H03, 559B-M0017-H08, 559B-M0035-F05, 559B-M0035-H09, 559B-M0043-C06, 559B-M0003-A08, 559B-M0054-B11, 559B-M0067-G11, 559B-M0064-H02, o 559B-M0065-B10. En algunos ejemplos, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en 559B-M0069-C09, 559B-M0038-F04, 559B-M0044-C05, 559B-M0047-H01, 559B-M0019-E12, 559B-X0004-B05, 559B-M0048-D12, 559B-M0053-G01, 559B-M0038-H03, 559B-M0017-H08, 559B-M0035-F05, 559B-M0035-H09, 559B-M0043-C06, 559B-M0003-A08, 559B-M0054-B11, 559B-M0067-G11, 559B-M0064-H02, y 559B-M0065-B10.

30 35 Los detalles de una o más realizaciones de la descripción se exponen en la descripción a continuación. Otras características o ventajas de la presente descripción resultarán evidentes a partir de los siguientes dibujos y la descripción detallada de varias realizaciones, y también de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

40 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva, y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente descripción, que pueden entenderse mejor con referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas aquí.

45 La FIG. 1 es un gráfico que muestra la unión de 559B-M0004-B04 a HMWK intacto (barras de color gris oscuro) o HMWK escindido (barras de color gris claro) en las condiciones de ELISA indicadas.

50 La FIG. 2 presenta gráficos que muestran la unión de diversos clones de Fab a HMWK de 1 cadena intacto (intacto), HMWK de 2 cadenas (escindido), o LMWK. A: Clones de Fab identificados usando los métodos de selección de presentación en fagos descritos aquí. El HMWK intacto se muestra en barras de color gris oscuro, el HMWK escindido en barras de color gris claro, y el LMWK en barras de color gris medio. B: unión para varios clones de Fab ejemplares. LMWK se muestra en barras de color gris oscuro, HMWK intacto en barras de color gris claro, y HMWK escindido en barras de color gris medio.

55 La FIG. 3 es un gráfico que muestra la especificidad de 559B-M0004-B04 por HMWK intacto, HMWK escindido, o LMWK. HMWK escindido purificado se añadió a amortiguador de ensayo de SBT (círculos) o plasma deficiente en HMWK (cuadrados). HMWK intacto purificado se añadió a amortiguador de ensayo de SBT (triángulos). LMWK purificado se añadió a amortiguador de ensayo de SBT (diamantes). El eje y presenta la señal de ELISA en unidades de absorbancia, y el eje x presenta la concentración de cininógeno en $\mu\text{g/ml}$.

55 La FIG. 4 es un gráfico que muestra la detección de HMWK de 2 cadenas (HMWK escindido) en plasma o amortiguador de ensayo. HMWK escindido purificado se añadió a amortiguador de ensayo de SBT (círculos en blanco), a amortiguador de ensayo de SBT y se analizó en presencia de plasma al 10% (cuadrados), o a plasma

deficiente en HMWK y se analizó en presencia de plasma al 10% (triángulos). HMWK escindido purificado se añadió también a amortiguador de ensayo y se analizó en presencia de plasma al 2,5% (diamantes), o a plasma deficiente en HMWK y se analizó en presencia de plasma al 2,5% (círculos en negro). El eje y presenta la señal de ELISA en unidades de absorbancia, y el eje x presenta la concentración de cininógeno en μ g/ml.

5 La FIG. 5 es un gráfico que muestra los niveles de HMWK escindido en las muestras de plasma humano indicadas, antes y después de la activación del sistema de contacto. A: antes y después de la activación del sistema de contacto con FXIIa o ácido elágico. B: antes y después de la activación del sistema de contacto con FXIIa, pKal, o ácido elágico.

10 La FIG. 6 es un gráfico que muestra los niveles de HMWK escindido en muestras de plasma de 12 donantes humanos normales antes y después de la activación del sistema de contacto con ácido elágico.

La FIG. 7 presenta gráficos que muestran los niveles de HMWK escindido después de la inhibición con un inhibidor de pKal. A: inhibición con landadelumab/DX-2930 o C1-INH antes de la activación del sistema de contacto con ácido elágico. B: inhibición de muestras de plasma con citrato de sodio reunidas con landadelumab/DX-2930 antes de la activación del sistema de contacto con FXIIa 10 nM.

15 La FIG. 8 es un gráfico que muestra la generación de HMWK escindido en los puntos de tiempo indicados después de la activación del sistema de contacto con FXIIa o ácido elágico.

La FIG. 9 es un gráfico que muestra los niveles de HMWK de 2 cadenas en muestras de plasma de sujetos normales y sujetos con HAE.

20 La FIG. 10 es una foto que muestra los resultados obtenidos de un análisis de transferencia Western de HMWK, que son consistentes con los resultados obtenidos del ensayo ELISA de HMWK de 2 cadenas descrito aquí. Las muestras de plasma humano citrado (plasma normal, plasma deficiente en FXII, y plasma deficiente en precalicreína) se sondaron con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-cadena ligera de HMWK, seguido de un anticuerpo de detección de cabra anti-ratón. Las muestras de plasma analizadas no se trataron o se activaron con pKal 100 nM, FXIIa 10 nM, o ácido elágico al 10%.

25 La FIG. 11 es un gráfico que muestra que la adición de $ZnCl_2$ a las muestras de plasma citrado o con EDTA aumentó la señal del HMWK de 2 cadenas en un ensayo ELISA. El eje x muestra la concentración de $ZnCl_2$ en el pocillo de ensayo después de una dilución de 40 veces.

30 La FIG. 12 presenta esquemas del descubrimiento y desarrollo de ensayos que utilizan los anticuerpos descritos aquí. A: esquema de los métodos de presentación en fagos utilizados para descubrir anticuerpos que se unen a HMWK de 2 cadenas. B: un ensayo ELISA tipo sándwich ejemplar en el que el anticuerpo/Fab específico de HMWK de 2 cadenas (por ejemplo, 559B-M0004-B04) se inmoviliza en placas de 96 pocillos para capturar HMWK de 2 cadenas en plasma citrado, seguido de lavado y detección con un anticuerpo anti-HMWK conjugado con un marcador (anti-HMWK-HRP).

35 La FIG. 13 es un gráfico que muestra los resultados de una curva estándar de ELISA tipo sándwich de HMWK de 2 cadenas, en la que las muestras de plasma citrado se enriquecieron con HMWK de 2 cadenas (dilución final al 10%).

40 La FIG. 14 muestra la identificación de anticuerpos específicos de HMWK de 2 cadenas mediante selección y cribado de presentación en fagos. A: representa gráficamente la relación del resultado de un ensayo de unión de HMWK de 2 cadenas a un ensayo de unión de LMWK en el eje y en comparación con la relación del resultado de un ensayo de unión de HMWK de 2 cadenas a un ensayo de unión de HMWK de 1 cadena en el eje x para cada anticuerpo (Fab) analizado. Los fragmentos Fab recombinantes se inmovilizaron pasivamente sobre placas de 384 pocillos antes de la adición de HMWK de 2 cadenas, HMWK de 1 cadena, o LMWK biotinilados, seguido de estreptavidina-HRP. B: muestra la unión a HMWK de 1 cadena, HMWK de 2 cadenas, o LMWK para los fragmentos Fab aislados indicados.

45 La FIG. 15 es un gráfico que muestra la competición de HMWK de 2 cadenas y péptidos de cininógeno (HKH20 y GCP28) por la unión a 559B-M0004-B04.

La FIG. 16 es un gráfico que muestra una curva estándar para un ELISA de tipo sándwich optimizado para la detección de HMWK de 2 cadenas en muestras de plasma humano.

50 La FIG. 17 presenta gráficos de análisis de transferencia Western que comparan el nivel de HMWK de 2 cadenas en muestras de plasma citrado de sujetos sanos y pacientes con HAE. A: gráfico de dispersión que compara el porcentaje de HMWK de 2 cadenas en muestras de sujetos sanos ("HV") y pacientes con HAE entre ataques de HAE ("Basal") y durante un ataque de HAE ("Ataque"). B: análisis de ROC (característica operativa del receptor) que compara la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras basales de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 0,977). C: análisis de ROC que compara la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 1).

D: análisis de ROC que compara la sensibilidad y especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras basales de HAE (AUC = 0,625).

5 La FIG. 18 presenta gráficos de análisis de transferencia Western que comparan el nivel de HMWK de 2 cadenas en muestras de plasma SCAT169 de sujetos sanos y pacientes con HAE. A: gráfico de dispersión que compara el porcentaje de HMWK de 2 cadenas en muestras de sujetos sanos ("HV") y pacientes con HAE entre ataques de HAE ("Basal") y durante un ataque de HAE ("Ataque"). B: análisis de ROC que compara la sensibilidad y especificidad para la detección de muestras basales de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 0,915). C: análisis de ROC que compara la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 0,967). D: análisis de ROC que compara la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras basales de HAE (AUC = 0,597).

10 15 La FIG. 19 presenta gráficos de análisis ELISA que comparan el nivel de HMWK de 2 cadenas en muestras de plasma citrado de sujetos sanos y pacientes con HAE. A: gráfico de dispersión que compara el porcentaje de HMWK de 2 cadenas en muestras de sujetos sanos ("HV") y pacientes con HAE entre ataques de HAE ("Basal") y durante un ataque de HAE ("Ataque"). B: análisis de ROC que compara la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras basales de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 0,795). C: análisis de ROC que compara la sensibilidad y especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 0,866). D: análisis de ROC que compara la sensibilidad y especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras basales de HAE (AUC = 0,709).

20 25 La FIG. 20 presenta gráficos de análisis ELISA que comparan el nivel de HMWK de 2 cadenas en muestras SCAT169 de sujetos sanos y pacientes con HAE. A: gráfico de dispersión que compara el porcentaje de HMWK de 2 cadenas en muestras de sujetos sanos ("HV") y pacientes con HAE entre ataques de HAE ("Basal") y durante un ataque de HAE ("Ataque"). B: análisis de ROC que compara la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras basales de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 0,999). C: análisis de ROC que compara la sensibilidad y la especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras de sujetos sanos (AUC = 1). D: análisis de ROC que compara la sensibilidad y especificidad para la detección de muestras de ataque de HAE frente a muestras basales de HAE (AUC = 0,8176).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE DESCRIPCIÓN

30 La calicreína plasmática (PKal) es un componente de serina proteasa del sistema de contacto, y es la principal enzima generadora de bradicinina en la circulación. El sistema de contacto es activado por el factor XIIa (la forma activa del factor XII o FXII) tras la exposición a superficies extrañas o cargadas negativamente, o en las superficies de las células endoteliales por las prolílcarboxipeptidasas (Sainz I.M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007). La activación de la calicreína plasmática amplifica la coagulación intrínseca a través de su activación por retroalimentación del factor XII y escinde proteolíticamente el precursor del cininógeno, el cininógeno de alto peso molecular (HMWK), liberando el no péptido proinflamatorio bradicinina y un HMWK escindido, que contiene dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace de disulfuro (también conocido como HMWK de 2 cadenas).

35 40 Como la quininogenasa primaria en la circulación, la calicreína plasmática es en gran parte responsable de la generación de bradicinina en la vasculatura. Una deficiencia genética en la proteína del inhibidor de C1 (C1-INH) conduce a angioedema hereditario (HAE). Los pacientes con HAE sufren ataques agudos de edema doloroso, a menudo precipitados por desencadenantes desconocidos (Zuraw B.L. et al., N Engl J Med 359, 1027-1036, 2008). Mediante el uso de agentes farmacológicos o estudios genéticos en modelos animales, el sistema plasmático calicreína-cinina (KKS plasmático) se ha implicado en diversas enfermedades.

45 50 Se encontró que el nivel de HMWK escindido está elevado en el ataque de HAE, así como en otros trastornos asociados a pKal. De este modo, el HMWK escindido puede servir como un biomarcador para monitorizar el desarrollo de la enfermedad y/o la eficacia del tratamiento. Sin embargo, la técnica carece de agentes adecuados y/o ensayos adecuados que puedan distinguir eficazmente el HMWK intacto de su versión escindida.

55 La presente descripción se basa, al menos en parte, en el desarrollo de inmunoensayos específicos que permiten la detección de HMWK escindido con alta especificidad y sensibilidad. Se observó que un ELISA de tipo sándwich, en el que un agente que se une específicamente al HMWK escindido se inmoviliza en un elemento de soporte (por ejemplo, una placa de múltiples pocillos), mejoró inesperadamente la eficacia de detección en comparación con el montaje de ELISA en el que el antígeno (en este caso, el HMWK escindido) se inmoviliza sobre el elemento de soporte. Además, se observó, inesperadamente, que el uso del amortiguador de bloqueo LowCross (que contiene caseína), en lugar de un amortiguador de bloqueo que contiene seroalbúmina bovina (BSA), mejoró la especificidad y sensibilidad la de detección durante el cribado inicial para descubrir anticuerpos específicos para HMWK escindido. Además, la especificidad y la sensibilidad de la detección se mejoraron aún más cuando se utilizó una placa de 96 pocillos, en comparación con una placa de 384 pocillos. La presente descripción también se basa, al menos en parte, en el aislamiento de anticuerpos que se unen específicamente a un HMWK escindido.

En consecuencia, se proporcionan aquí (y se definen en las reivindicaciones) inmunoensayos para detectar la presencia o medir el nivel de un HMWK escindido en una muestra biológica sospechosa de contener especies de HMWK, usando un agente (por ejemplo, un anticuerpo) que se une específicamente a un HMWK escindido (por ejemplo, el HMWK escindido que tiene un peso molecular de 46 kDa). Dada la correlación entre el nivel del HMWK escindido y los trastornos asociados o mediados por pKal (por ejemplo, HAE), los inmunoensayos descritos aquí se pueden aplicar para identificar pacientes que están en riesgo de padecer tales enfermedades, para monitorizar la progresión de la enfermedad, y/o para monitorizar la eficacia de un tratamiento contra tal trastorno.

5 I. Inmunoensayos para la detección específica de HMWK escindido

10 Un aspecto de la presente descripción se refiere a inmunoensayos para detectar HMWK escindido con alta sensibilidad y especificidad. Dichos inmunoensayos pueden implicar un ELISA de tipo sándwich en el que un agente que se une específicamente a un HMWK escindido se inmoviliza en un elemento de soporte, que puede ser una placa de 96 pocillos. Los inmunoensayos descritos aquí permiten la detección selectiva de HMWK escindido en muestras biológicas, por ejemplo, muestras de suero o muestras de plasma, que pueden contener HMWK tanto intacto como escindido, así como LMWK.

15 (I) Cininógeno de alto peso molecular

20 El cininógeno de alto peso molecular (HMWK) existe en el plasma como una proteína de un solo polipéptido (1 cadena) de múltiples dominios (dominios 1-6) con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa, denominada aquí HMWK intacto. El gen humano que codifica HMWK es el cininógeno 1 (KNG1). KNG1 se transcribe y se empalma alternativamente para formar los ARNm que codifican HMWK o cininógeno de bajo peso molecular (LMWK). A continuación, se proporciona una secuencia de proteína ejemplar de HMWK:

>gi|156231037|ref|NP_001095886.1| precursor de isoforma 1 del cininógeno-1 [Homo sapiens]

```

MKLITILFLCSRLLLSTQESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNQNQSNQFVLYRITEATKTVGSDFY
FYSFKYEIKEGDCPVQSGKTVQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQY
DCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVAGLNFRITYSIVQTNCSEK
FLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQQLRIASFQSNCIDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDPTNSPELEE
TLTHHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAAGKKYFIDFVARETTCSESNEELTESCETKKLGQSL
CNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISLMKRPPGFSPFRSSRIGEIKEETTVSPPPHTSMAQDEERDSG
KEQGHTRRRHDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGEQOHGLGHHKFKLDDDLLEHQGGHV
LDHGKHKKHGKGKHKNGKNGKHNGWKTEHLLASSSEDSTTPSAQTOKEKTEGPTPIPSSLAKPGVTVTF
SDFQDSLDLIATMMPPISPAPIQSDDWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVEINPTTQ
MKESEYYFDLTDGLS (SEQ ID NO: 1)

```

25 El HMWK intacto, también denominado aquí como "cininógeno intacto", puede ensayarse, por ejemplo, usando métodos coagulantes o inmunológicos, por ejemplo, radioinmunoensayo (véase, por ejemplo, Kerbiriou-Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2):2734-86). Se conoce un anticuerpo monoclonal contra la cadena ligera de HMWK humano. Véase, por ejemplo, Reddigiari, S.R. y Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74:695-702. También se puede usar un ensayo para HMWK que se basa en un sustrato cromogénico. Véanse, por ejemplo, Scott, C.F. et al. Thromb Res, 1987, 48(6):685-700; Gallimore, M.J. et al. Thromb Res, 2004, 114(2):91-96.

30 El HMWK es escindido por pKal dentro del dominio 4 para liberar el péptido proinflamatorio de 9 aminoácidos bradicinina, y una forma de 2 cadenas de HMWK, denominada aquí HMWK escindido. Las 2 cadenas de HMWK son la cadena pesada, que contiene los dominios 1-3, y la cadena ligera, que contiene los dominios 5 y 6, unidos por un enlace de disulfuro. Tras la escisión inicial del HMWK intacto, las cadenas pesada y ligera tienen un peso molecular de aproximadamente 65 kDa y 56 kDa, respectivamente. El procesamiento proteolítico adicional da como resultado la generación de una cadena ligera de 46 kDa.

35 A continuación, se proporcionan ejemplos de secuencias de las cadenas pesada y ligera del cininógeno escindido.

> cadena pesada de cininógeno-1 escindido

```

QESQSEEIDCNDKDLFKAVDAALKKYNQNQSNQFVLYRITEATKTVGSDFY
KEGDCPVQSGKTVQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTA
QYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVAGLNFRIT
YSIVQTNCSEKFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQQLRIASFQSNCIDIYPGKDFVQ
PTTKICVGCPRDPTNSPELEEITLTHHTITKLNAENNATFYFKIDNVKKARVQVVAAGKKYF
IDFVARETTCSESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVYVVPWEKKIYPTVNCQPLGMISL
MK (SEQ ID NO: 2)

```

> cadena ligera de cininógeno-1 escindido

SSRIGEIKEETTVSPPHTSMAPAQDEERDSGKEQGHTRRH DWGHEKQRKHN LGHGHKHER
DQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGKFLDDLEH QGGHVLDHGHKHKHGKGKHNK
GKKNGKHNGWKT EHLASSSEDSTTPSAQTOEKTEGTPIPSLAKPGVTVTFSDFQDSLDI
ATMMPPISPAPIQSDDDWWIPDIQIDPNGLSFNPISDFPDTTSPKCPGRPWKSVEINPTT
QMKE SYYFDLTDGLS (SEQ ID NO: 3)

(ii) Anticuerpos específicos para HMWK escindido

Los inmunoensayos descritos aquí pueden usar cualquier agente que pueda unirse específicamente a un HMWK escindido, por ejemplo, un agente que reconoce un neocítopo en HMWK escindido que no está presente en HMWK intacto. En algunos aspectos, el agente que se une a HMWK escindido es un anticuerpo.

Un anticuerpo (usado indistintamente en forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Como se usa aquí, el término "anticuerpo" abarca no solo anticuerpos policlónicos o monoclonales intactos (es decir, de longitud completa) sino también sus fragmentos de unión a antígeno (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv) monocatenarios (scFv), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos químicos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprenda un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida, incluyendo variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencias de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos modificados covalentemente. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgD, IgE, IgG, IgA o IgM (o subclase de las mismas), y el anticuerpo no necesita ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de ellas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Cualquiera de los anticuerpos descritos aquí puede ser monoclonal o policlónico. Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea, y un "anticuerpo policlónico" se refiere a una población de anticuerpos heterogénea. Estos dos términos no limitan la fuente de un anticuerpo o la forma en que se obtiene.

Un anticuerpo que "se une específicamente" a un HMWK escindido o un epítopo del mismo es un término bien conocido en la técnica, y los métodos para determinar dicha unión específica también son bien conocidos en la técnica. Se afirma que una molécula exhibe "unión específica" si reacciona o se asocia con más frecuencia, más rápidamente, con mayor duración, y/o con mayor afinidad con un antígeno diana particular (en este caso, un HMWK escindido) que con dianas alternativas (por ejemplo, HMWK intacto y/o LMWK). Un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que con la que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une de forma específica (o preferentemente) a HMWK escindido, o un epítopo en el mismo, es un anticuerpo que se une a este antígeno diana con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración que con la que se une a otros antígenos (por ejemplo, HMWK intacto o LMWK) u otros epítopos en el mismo antígeno. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno diana puede o no unirse específica o preferentemente a un segundo antígeno diana. Como tal, la "unión específica" o la "unión preferente" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) la unión exclusiva. Generalmente, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferente.

En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen específicamente a HMWK escindido (así como los otros anticuerpos que se unen tanto a escindido como a intacto, y opcionalmente a LMWK) descritos aquí tienen una afinidad de unión adecuada por un HMWK escindido (u otro antígeno diana como se describe aquí). Como se usa aquí, "afinidad de unión" se refiere a la constante de asociación aparente o K_A . La K_A es la inversa de la constante de disociación (K_D). El anticuerpo descrito aquí puede tener una afinidad de unión (K_D) de al menos 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M, o menor. Una mayor afinidad de unión corresponde a una menor K_D . La unión de mayor afinidad de un anticuerpo a una primera diana con respecto a una segunda diana puede indicarse mediante una mayor K_A (o un valor numérico menor de K_D) para la unión a la primera diana que la K_A (o valor numérico K_D) para la unión a la segunda diana. En tales casos, el anticuerpo tiene especificidad para la primera diana (por ejemplo, una proteína en una primera conformación o imitación de la misma) con respecto a la segunda diana (por ejemplo, la misma proteína en una segunda conformación o imitación de la misma; o una segunda proteína). Las diferencias en la afinidad de unión (por ejemplo, para especificidad u otras comparaciones) pueden ser al menos 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 37,5, 50, 70, 80, 91, 100, 500, 1000, 10.000 o 10^5 veces. Por ejemplo, la afinidad de unión de un anticuerpo que se une específicamente a un HMWK escindido como se describe aquí puede ser 10 veces, 100 veces, 10.000 veces, o 10^5 veces mayor que la afinidad de unión de ese anticuerpo por HMWK intacto y/o LMWK.

La afinidad de unión se puede determinar mediante una variedad de métodos, incluyendo diálisis en equilibrio, unión en equilibrio, filtración en gel, ELISA, resonancia de plasmiones superficiales, o espectroscopía (por ejemplo, usando

un ensayo de fluorescencia). Las condiciones ejemplares para evaluar la afinidad de unión son en amortiguador de HBS-P (HEPES 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, tensioactivo P20 al 0,005% (v/v)). Estas técnicas pueden usarse para medir la concentración de proteína de unión unida en función de la concentración de proteína diana. La concentración de proteína de unión unida ([Unida]) está relacionada con la concentración de proteína diana libre ([Libre]) y la concentración de sitios de unión para la proteína de unión en la diana, en la que (N) es el número de sitios de unión por molécula diana, mediante la siguiente ecuación:

$$[Unida] = [N][Libre]/(Kd+[Libre])$$

No siempre es necesario realizar una determinación exacta de K_A , aunque, puesto que algunas veces es suficiente para obtener una medida cuantitativa de la afinidad, por ejemplo, determinada mediante un método tal como ELISA o análisis de FACS, es proporcional a K_A , y de este modo se puede utilizar para comparaciones, tal como determinar si una afinidad mayor es, por ejemplo, 2 veces mayor, para obtener una medida cualitativa de la afinidad, o para obtener una inferencia de la afinidad, por ejemplo, por actividad en un ensayo funcional, por ejemplo, un ensayo *in vitro* o *in vivo*.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HMWK escindido (también denominado anticuerpo anti-HMWK escindido) se une al mismo epítopo de un HMWK escindido que 559B-M004-B04, como se define en las reivindicaciones. Un "epítopo" se refiere al sitio en un antígeno diana que está unido por una proteína de unión (por ejemplo, un anticuerpo tal como un Fab o un anticuerpo de longitud completa). El sitio puede estar compuesto completamente por componentes de aminoácidos, compuesto completamente por modificaciones químicas de aminoácidos de la proteína (por ejemplo, restos de glicosilo), o compuesto por combinaciones de los mismos. Los epítopos solapantes incluyen al menos un resto de aminoácido común, grupo glicosilo, grupo fosfato, grupo sulfato, u otra característica molecular. En algunos casos, el epítopo es lineal; en otros casos, el epítopo es conformacional.

Un primer anticuerpo "se une al mismo epítopo" que un segundo anticuerpo si el primer anticuerpo se une al mismo sitio en un antígeno diana que al que se une el segundo anticuerpo, o se une a un sitio que se solapa (por ejemplo, que se solapa 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%, por ejemplo, en términos de secuencia de aminoácidos u otra característica molecular (por ejemplo, grupo glicosilo, grupo fosfato o grupo sulfato) con el sitio al que se une el segundo antígeno.

En algunas realizaciones, el anticuerpo que se une específicamente a HMWK escindido compite contra 559B-M004-B04 por la unión a HMWK, como se define en las reivindicaciones. Un primer anticuerpo "compite por la unión" con un segundo anticuerpo si la unión del primer anticuerpo a su epítopo disminuye (por ejemplo, en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o más) la cantidad del segundo anticuerpo que se une a su epítopo. La competencia puede ser directa (por ejemplo, el primer anticuerpo se une a un epítopo que es el mismo que, o solapa con, el epítopo unido por el segundo anticuerpo), o indirecta (por ejemplo, la unión del primer anticuerpo a su epítopo provoca un cambio estérico en el antígeno diana que disminuye la capacidad del segundo anticuerpo para unirse a su epítopo).

En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente a HMWK escindido comprende una cadena V_H que incluye una V_H CDR1, una V_H CDR2, y/o V_H CDR3 al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idénticas a las V_H CDR correspondientes de 559B-M004-B04. Alternativamente, o además, el anticuerpo que se une específicamente a HMWK escindido comprende una V_L CDR1, una V_L CDR2, y/o una V_L CDR3 al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idénticas a las V_L CDR correspondiente de 559B-M004-B04. En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente a HMWK escindido tiene las mismas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y/o cadena ligera que 559B-M004-B04.

Las "regiones determinantes de la complementariedad" o "CDR" se conocen en la técnica por referirse a secuencias no contiguas de aminoácidos dentro de regiones variables de anticuerpos, que confieren especificidad antigenica y afinidad de unión. En general, hay tres (3) CDR en cada región variable de cadena pesada, y tres (3) CDR en cada región variable de cadena ligera. Los límites precisos de la secuencia de aminoácidos de una CDR dada se pueden determinar fácilmente usando cualquiera de varios esquemas bien conocidos, incluyendo los descritos por Kabat et al. (1991), 5^a Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (el esquema de numeración de Kabat Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273, 927-948 (el esquema de numeración de Chothia), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) (el esquema de numeración de Contact), Lefranc M P et al., Dev Comp Immunol, enero 2003; 27(1):55-77 (el esquema de numeración de IMGT), y Honegger A y Pluckthun A, J Mol Biol, 8 de junio de 2001; 309(3):657-70 (el esquema de numeración AHO).

Los límites de una CDR dada pueden variar según el esquema utilizado para la identificación. Por ejemplo, el esquema de Kabat se basa en alineamientos estructurales, mientras que el esquema de Chothia se basa en información estructural. El esquema de Contact se basa en el análisis de estructuras cristalinas complejas, y es similar en muchos aspectos al esquema de numeración de Chothia. De este modo, a menos que se especifique lo contrario, la expresión "región determinante de la complementariedad" o "CDR" de un anticuerpo dado debe entenderse que abarca la región determinante de la complementariedad como se define por cualquiera de los esquemas conocidos descritos aquí anteriormente.

Si, determinado por el mismo esquema de numeración, un anticuerpo tiene las mismas V_H y/o V_L CDR que 559B-M004-B04 (así como otros anticuerpos ejemplares descritos aquí), se considera que dicho anticuerpo tiene las mismas CDR que 559B-M004-B04 (o los otros anticuerpos ejemplares descritos aquí) y está dentro del alcance de la presente descripción. Por ejemplo, tal anticuerpo puede tener las mismas V_H y/o V_L CDR que el clon 559B-M004-B04 según lo determinado por el esquema de numeración de Chothia. En otro ejemplo, un anticuerpo anti-HMWK escindido, dentro del alcance de la presente descripción, puede tener las mismas V_H y/o V_L CDR que el clon 559B-M004-B04, según lo determinado por el esquema de numeración de Kabat.

Alternativamente o además, el anticuerpo anti-HMWK escindido descrito comprende una cadena V_H al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idéntica a la cadena V_H de 559B-M004-B04, y/o una cadena V_L al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idéntica a la cadena V_L de 559B-M004-B04. En algunas realizaciones, el anticuerpo es 559B-M004-B04.

El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, modificado como en Karlin y Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de interés. Cuando existen espacios entre dos secuencias, se puede utilizar Gapped BLAST, como se describe en Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Las secuencias de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de 559B-M004-B04 se muestran a continuación. Las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada y las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera están subrayadas y en negrita (identificadas por un esquema como ejemplo).

>Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-A01 (559B-M0004-B04) (SEQ ID NO: 4)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT**FSFYVMV**WVRQAPGKGLEWVS**GISP****SGGN****TAYADSV**
25 **K**GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**KLFYYDDT****KGYFDF**WGQGTLVTVSS

>Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-A01 (559B-M0004-B04) (SEQ ID NO: 5)

QYELTQPPSASGTPGQRVTLSC**SGSSSNIGSNYVY**WYQQLPGTAPKLLIY**RNNQRPS****GVPDRF**S
GSKSGTSASLAI**SGLQSE****DEADYYCA****AWDDSLN****GRV**FGGGTKLTVL

En algunos casos, el anticuerpo que se une específicamente a un HMWK escindido puede contener una o más (por ejemplo, hasta 5, hasta 3, o hasta 1) mutaciones conservativas en una o más de las CDR de cadena pesada, o una o más de las CDR de cadena ligera en 559B-M0004-B04, por ejemplo, en posiciones en las que no es probable que los restos estén implicados en la interacción con el HMWK escindido. Como se usa aquí, una "sustitución conservativa de aminoácidos" se refiere a una sustitución de aminoácidos que no altera la carga relativa o las características de tamaño de la proteína en la que se realiza la sustitución de aminoácidos. Las variantes se pueden preparar de acuerdo con métodos para alterar la secuencia polipeptídica conocidos por un experto en la técnica, tal como se encuentran en referencias que compilan tales métodos, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

40 Los anticuerpos capaces de unirse a HMWK escindido (así como los anticuerpos capaces de unirse a HMWK intacto y/o LMWK) como se describe aquí se pueden obtener mediante cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York.

En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para un antígeno diana (un HMWK escindido, el HMWK intacto, y/o LMWK) se pueden obtener mediante la tecnología de hibridoma convencional. El antígeno diana de longitud completa o un fragmento del mismo, opcionalmente acoplado a una proteína portadora tal como KLH, se puede usar para inmunizar a un animal hospedante para generar anticuerpos que se unan a ese antígeno. La ruta y el programa de inmunización del animal hospedante generalmente están de acuerdo con las técnicas establecidas y convencionales para la estimulación y producción de anticuerpos, como se describe adicionalmente aquí. Las técnicas generales para la producción de anticuerpos de ratón, humanizados y humanos se conocen en la técnica, y se describen aquí. Se contempla que cualquier sujeto mamífero, incluyendo los seres humanos, o las células productoras de anticuerpos del mismo, puede manipularse para que sirva como base para la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero, incluyendo las humanas. Normalmente, el animal hospedante se inocula por vía intraperitoneal, intramuscular, oral, subcutánea, intraplantar y/o intradérmica con una cantidad de inmunógeno, incluyendo como se describe aquí.

- Los hibridomas se pueden preparar a partir de linfocitos y células de mieloma inmortalizadas utilizando la técnica general de hibridación de células somáticas de Kohler, B. y Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497, o según se modifica por Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982). Las líneas de mieloma disponibles, que incluyen, pero no se limitan a, X63-Ag8.653, y las del Salk Institute, Cell Distribution Center, San Diego, Calif., USA, pueden usarse en la hibridación. Generalmente, la técnica implica fusionar células de mieloma y células linfoides usando un fusógeno tal como polietilenglicol, o por medios eléctricos bien conocidos por los expertos en la técnica. Después de la fusión, las células se separan del medio de fusión y se hacen crecer en un medio de crecimiento selectivo, tal como medio de hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), para eliminar las células parentales no hibridadas. Cualquiera de los medios descritos aquí, suplementado con o sin suero, puede usarse para cultivar hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales. Como otra alternativa a la técnica de fusión celular, se pueden usar células B inmortalizadas con EBV para producir los anticuerpos monoclonales anti-PKal descritos aquí. Los hibridomas se expanden y subclonian, si se desea, y los sobrenadantes se analizan para determinar la actividad antiinmunógena mediante procedimientos de inmunoensayo convencionales (por ejemplo, radioinmunoensayo, inmunoensayo enzimático, o inmunoensayo de fluorescencia).
- Los hibridomas que pueden usarse como fuente de anticuerpos abarcan todos los derivados, células progenitoras de los hibridomas parentales que producen anticuerpos monoclonales capaces de interferir con la actividad de PKal. Los hibridomas que producen tales anticuerpos pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo* usando procedimientos conocidos. Los anticuerpos monoclonales pueden aislarse de los medios de cultivo o fluidos corporales, mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como precipitación con sulfato de amonio, electroforesis en gel, diálisis, cromatografía, y ultrafiltración, si se desea. La actividad no deseada, si está presente, puede eliminarse, por ejemplo, haciendo pasar la preparación sobre adsorbentes hechos del inmunógeno unido a una fase sólida, y eluyendo o liberando los anticuerpos deseados del inmunógeno. La inmunización de un animal hospedante con un antígeno diana o un fragmento que contiene la secuencia de aminoácidos diana conjugada con una proteína que es inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina, o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl, o R1N=C=NR, en la que R y R1 son grupos alquilo diferentes, puede producir una población de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales).
- Si se desea, un anticuerpo (monoclonal o policlonal) de interés (por ejemplo, producido por un hibridoma) puede secuenciarse, y la secuencia polinucleotídica se puede clonar entonces en un vector para la expresión o propagación. La secuencia que codifica el anticuerpo de interés puede mantenerse en un vector en una célula hospedante, y la célula hospedante se puede entonces expandir y congelar para uso futuro. Como alternativa, la secuencia polinucleotídica puede usarse para manipulación genética para mejorar la afinidad (maduración por afinidad), u otras características del anticuerpo. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia del anticuerpo para obtener una mayor afinidad y/o especificidad por el antígeno diana. Será evidente para un experto en la técnica que se pueden realizar uno o más cambios de polinucleótidos en el anticuerpo, y aún mantener su especificidad de unión para el antígeno diana.
- En otras realizaciones, pueden obtenerse anticuerpos completamente humanos usando ratones disponibles comercialmente que han sido manipulados para expresar proteínas inmunoglobulínicas humanas específicas. Para la generación de anticuerpos humanizados o humanos, también se pueden usar animales transgénicos que se diseñan para producir una respuesta inmune más deseable (por ejemplo, anticuerpos completamente humanos) o más robusta. Ejemplos de tal tecnología son Xenomouse^{RTM} de Amgen, Inc. (Fremont, Calif.) y HuMAB-Mouse^{RTM} y TC MouseTM de Medarex, Inc. (Princeton, N.J.). En otra alternativa, los anticuerpos se pueden producir de forma recombinante mediante tecnología de presentación en fagos o tecnología de levadura. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n°s 5.565.332; 5.580.717; 5.733.743; y 6.265.150; y Winter et al., (1994) *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455, y . Alternativamente, la tecnología de presentación en fagos (McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-553) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados.
- Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo intacto (anticuerpo de longitud completa) se pueden preparar mediante métodos de rutina. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')2 se pueden producir mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab se pueden generar reduciendo los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')2.
- Un anticuerpo monocatenario se puede preparar mediante tecnología recombinante uniendo una secuencia nucleotídica que codifica una región variable de cadena pesada y una secuencia nucleotídica que codifica una región variable de cadena ligera. Preferiblemente, se incorpora un enlazador flexible entre las dos regiones variables. Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patentes U.S. n°s 4.946.778 y 4.704.692) pueden adaptarse para producir una biblioteca scFv en fagos o por levaduras, y los clones de scFv específicos para una PKal pueden identificarse a partir de la biblioteca siguiendo procedimientos de rutina. Los clones positivos pueden someterse a un cribado adicional para identificar aquellos que se unen específicamente a un antígeno diana, tal como un HMWK escindido.

En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para un HMWK escindido (o para HMWK intacto o LMWK) pueden aislarse de una biblioteca de anticuerpos, que puede ser una biblioteca sintética o una biblioteca natural. Una biblioteca de anticuerpos natural se refiere a una biblioteca derivada de una fuente natural (por ejemplo, un donante humano) siguiendo la práctica habitual. Una biblioteca de anticuerpos sintética se refiere a una biblioteca cuyos 5 miembros están diseñados siguiendo reglas predeterminadas (por ejemplo, que tienen una región CDR aleatorizada completa, tales como las CDR, o una región CDR semi aleatorizada, tales como CDR1 o CDR2 de la cadena pesada, de la cadena ligera, o de ambas).

En algunos casos, la biblioteca de anticuerpos es una biblioteca de presentación (por ejemplo, una biblioteca de 10 presentación en fagos o una biblioteca de presentación por levaduras). Una biblioteca de presentación es una colección de entidades; cada entidad incluye un componente polipeptídico accesible y un componente recuperable que codifica o identifica el componente polipeptídico. El componente polipeptídico se varía de modo que se representen diferentes secuencias de aminoácidos. El componente polipeptídico puede tener cualquier longitud, por ejemplo, desde tres aminoácidos hasta alrededor de 300 aminoácidos. Una entidad de biblioteca de presentación 15 puede incluir más de un componente polipeptídico, por ejemplo, las dos cadenas polipeptídicas de un sFab. En una implementación ejemplar, se puede usar una biblioteca de presentación para identificar proteínas que se unen a un HMWK escindido (así como a otros antígenos diana descritos aquí). En una selección, el componente polipeptídico de cada miembro de la biblioteca se sonda con un HMWK escindido (o un fragmento del mismo), y si el componente polipeptídico se une al HMWK escindido, se identifica el miembro de la biblioteca de presentación, típicamente por 20 retención en un soporte. En la Figura 12 se proporciona una ilustración ejemplar para identificar anticuerpos específicos para HMWK escindido usando una biblioteca de anticuerpos de presentación en fagos.

Los miembros de la biblioteca de presentación retenidos se recuperan del soporte y se analizan. El análisis puede incluir amplificación y una selección posterior en condiciones similares o diferentes. Por ejemplo, se pueden alternar selecciones positivas y negativas. El análisis también puede incluir determinar la secuencia de aminoácidos del componente polipeptídico y la purificación del componente polipeptídico para una caracterización detallada.

- 25 Los anticuerpos obtenidos siguiendo un método conocido en la técnica y descrito aquí pueden caracterizarse usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un método es identificar el epítopo al que se une el antígeno, o "cartografiado epítópico". Hay muchos métodos conocidos en la técnica para cartografiar y caracterizar la ubicación de epítopos en proteínas, incluyendo la resolución de la estructura cristalina de un complejo anticuerpo-antígeno, 30 ensayos de competición, ensayos de expresión de fragmentos génicos, y ensayos basados en péptidos sintéticos, como se describe, por ejemplo, en el Capítulo 11 de Harlow y Lane, *Using Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. En un ejemplo adicional, el cartografiado epítópico se puede usar para determinar la secuencia a la que se une un anticuerpo. El epítopo puede ser un epítopo lineal, es decir, contenido en un solo tramo de aminoácidos, o un epítopo conformacional formado por una interacción 35 tridimensional de aminoácidos que puede no estar necesariamente contenido en un solo tramo (secuencia lineal de estructura primaria). Péptidos de diferentes longitudes (por ejemplo, al menos 4-6 aminoácidos de longitud) se pueden aislar o sintetizar (por ejemplo, de forma recombinante), y se pueden usar para ensayos de unión con un anticuerpo. En otro ejemplo, el epítopo al que se une el anticuerpo puede determinarse en un cribado sistemático utilizando 40 péptidos solapantes derivados de la secuencia del antígeno diana y determinando la unión por el anticuerpo. Según los ensayos de expresión de fragmentos génicos, el marco de lectura abierto que codifica el antígeno diana se fragmenta aleatoriamente o mediante construcciones genéticas específicas, y se determina la reactividad de los fragmentos expresados del antígeno con el anticuerpo que se va a analizar. Los fragmentos de genes pueden producirse, por ejemplo, mediante PCR, y después se pueden transcribir y traducir en proteína in vitro, en presencia de aminoácidos radiactivos. La unión del anticuerpo a los fragmentos de antígeno marcados radiactivamente se 45 determina entonces mediante inmunoprecipitación y electroforesis en gel.
- 50 Ciertos epítopos también pueden identificarse usando grandes bibliotecas de secuencias peptídicas aleatorias presentadas sobre la superficie de las partículas de fagos (bibliotecas de fagos). Alternativamente, una biblioteca definida de fragmentos peptídicos solapantes se puede estudiar para determinar la unión al anticuerpo de ensayo en 55 ensayos de unión simples. En un ejemplo adicional, la mutagénesis de un dominio de unión a antígeno, los experimentos de intercambio de dominios y la mutagénesis por barrido de alanina se pueden llevar a cabo para identificar los restos requeridos, suficientes y/o necesarios para la unión del epítopo. Por ejemplo, se pueden realizar experimentos de intercambio de dominios usando un mutante de un antígeno diana en el que se han reemplazado (intercambiado) diversos fragmentos del polipéptido HMWK por secuencias de una proteína estrechamente relacionada, pero antigenéticamente distinta. Al evaluar la unión del anticuerpo al HMWK mutante, se puede evaluar la importancia del fragmento de antígeno particular para la unión del anticuerpo.
- 55 Alternativamente, se pueden realizar ensayos de competición usando otros anticuerpos que se sabe que se unen al mismo antígeno para determinar si un anticuerpo se une al mismo epítopo que los otros anticuerpos. Los expertos en la técnica conocen bien los ensayos de competición.

Cualquiera de los anticuerpos anti-HMWK escindido también está dentro del alcance de la presente descripción.

(iii) Inmunoensayos

Se proporcionan aquí inmunoensayos para detectar un HMWK escindido. Como se usa aquí, el término "inmunoensayo" puede denominarse indistintamente como un ensayo de base inmunitaria o un ensayo de base inmunológica. En general, un inmunoensayo detecta la presencia y/o concentración (nivel) de una molécula (por ejemplo, HMWK) en una muestra utilizando un agente que se une a la molécula, tal como un anticuerpo. Los ejemplos de inmunoensayos incluyen transferencias Western, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), ensayo de flujo lateral, radioinmunoensayos, ensayos de detección basados en electroquimiluminiscencia, inmunoensayos magnéticos, y técnicas relacionadas. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un ensayo ELISA. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un ensayo ELISA de tipo sándwich. En algunas realizaciones, el inmunoensayo es un ensayo de flujo lateral.

Los ELISA son conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Crowther, John R (2009) "The ELISA Guidebook." 2^a ed. Humana Press y Lequin R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". Clin. Chem. 51 (12): 2415-8), y se describen aquí ELISA ejemplares. Los kits para realizar ELISA también se conocen en la técnica, y están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, los kits de ELISA de Life Technologies y BD Biosciences).

Para realizar el inmunoensayo descrito aquí, se puede obtener una muestra de un sujeto. Como se usa aquí, una "muestra" se refiere a una composición que comprende tejido, por ejemplo, sangre, plasma o proteína, de un sujeto. Una muestra incluye tanto una muestra inicial no procesada tomada de un sujeto como posteriormente procesada, por ejemplo, formas parcialmente purificadas o conservadas. Las muestras ejemplares incluyen sangre, plasma, lágrimas, o moco. En algunas realizaciones, la muestra es una muestra de fluido corporal, tal como una muestra de suero o plasma. Una muestra que se analizará mediante el inmunoensayo descrito aquí puede ser una muestra inicial no procesada tomada de un sujeto o procesada posteriormente, por ejemplo, formas parcialmente purificadas o conservadas. En algunas realizaciones, se pueden recoger múltiples muestras (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, o más) del sujeto, a lo largo del tiempo o en intervalos de tiempo particulares, por ejemplo, para evaluar la progresión de una enfermedad o trastorno, o evaluar la eficacia de un tratamiento. Las múltiples muestras se pueden obtener antes y después de un tratamiento, o durante el curso de un tratamiento.

Una muestra se puede obtener de un sujeto utilizando cualquier medio conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la muestra se obtiene del sujeto recogiendo la muestra (por ejemplo, una muestra de sangre) en un tubo de recogida a vacío (por ejemplo, un tubo de extracción de sangre a vacío). En algunas realizaciones, el tubo de recogida a vacío contiene uno o más inhibidores de proteasas, por ejemplo, para reducir o prevenir la activación *ex vivo* del sistema de contacto durante la recogida de muestras. Dichos inhibidores de proteasas pueden estar contenidos en una formulación líquida. En algunas realizaciones, los inhibidores de proteasas comprenden al menos un inhibidor de serina proteasa y al menos un inhibidor de cisteína proteasa. Estos tubos de recogida a vacío son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Solicitud PCT nº US2016/046681. Opcionalmente, un tubo de recogida de sangre a vacío puede comprender además uno o más anticoagulantes.

Un "paciente", "sujeto" u "hospedante" (estos términos se usan indistintamente) a tratar por el método en cuestión puede significar un animal humano o no humano. En algunas realizaciones, se sospecha que un sujeto es sospechoso de padecer o está en riesgo de padecer o sufre un trastorno mediado por calicreína, por ejemplo, un trastorno mediado por bradicinina, tal como angioedema hereditario (HAE), angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, quemaduras, isquemia cerebral/lesión por reperfusión, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis, trombosis arterial o venosa, trombosis asociada con dispositivos de asistencia ventricular o stents, trombocitopenia con trombosis inducida por heparina, enfermedad tromboembólica, y enfermedad coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal del intestino, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, estenosis espinal-enfermedad de la columna vertebral degenerativa, ileo postoperatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolia pulmonar, accidente cerebrovascular, traumatismo craneoencefálico o edema cerebral peritumoral, septicemia, evento isquémico agudo de la arteria cerebral media (ACM) (accidente cerebrovascular), restenosis (por ejemplo, después de angioplastia), lupus eritematoso sistémico, nefritis, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el plegamiento incorrecto de proteínas, una enfermedad asociada con angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (por ejemplo, anafilaxia, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome disneico agudo, fibrosis quística, rinitis persistente), y lesiones tisulares (por ejemplo, lesión por quemaduras o por sustancias químicas).

Alternativamente o además, el sujeto que necesita el análisis descrito aquí puede ser un paciente de la enfermedad o trastorno. Tal sujeto puede estar bajo el ataque de la enfermedad (por ejemplo, HAE) actualmente, o pudo sufrir la enfermedad en el pasado (por ejemplo, durante la inactividad de la enfermedad actualmente). En algunos ejemplos, el sujeto es un paciente humano que puede estar en tratamiento de la enfermedad, por ejemplo, un tratamiento que implica un inhibidor de C1 esterasa (C1-INH), un inhibidor de calicreína plasmática, o un inhibidor de bradicinina. En otros casos, tal paciente humano puede estar libre de tal tratamiento.

- La muestra descrita aquí puede someterse a análisis usando un agente que se une específicamente a un HMWK escindido para determinar el nivel del HMWK escindido en la muestra. En algunas realizaciones como se define en las reivindicaciones, los inmunoensayos descritos aquí pueden tener el formato de un ELISA de tipo sándwich, en el que un primer agente (por ejemplo, el anticuerpo descrito aquí) que se une específicamente al HMWK escindido se inmoviliza en un elemento de soporte. El elemento de soporte puede entonces incubarse con una muestra como se describe aquí durante un período de tiempo adecuado en condiciones que permitan la formación del complejo de HMWK escindido/primer agente (por ejemplo, anticuerpo). Tal complejo puede detectarse entonces usando un segundo agente que se une a HMWK. El segundo agente puede conjugarse con un marcador, que puede liberar una señal directa o indirectamente. La intensidad de la señal representa el nivel del HMWK escindido en la muestra.
- 10 En el método se puede usar cualquier elemento de soporte conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, una membrana, una perla, un portaobjetos, o una placa de múltiples pocillos. La selección de un elemento de soporte apropiado para el inmunoensayo dependerá de diversos factores, tales como el número de muestras y el método de detección de la señal liberada del marcador conjugado con el segundo agente.
- 15 En algunas realizaciones, el elemento de soporte es una membrana, tal como una membrana de nitrocelulosa, una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), o una membrana de acetato de celulosa. En algunos ejemplos, el inmunoensayo puede tener un formato de ensayo de transferencia Western o un formato de ensayo de flujo lateral.
- 20 En algunas realizaciones, el elemento de soporte es una placa de múltiples pocillos, tal como una placa de ELISA. En algunas realizaciones, los inmunoensayos descritos aquí se pueden llevar a cabo en plataformas de alto rendimiento. En algunas realizaciones, pueden usarse placas de múltiples pocillos, por ejemplo, placas de 24-, 48-, 96-, 384-pocillos o más, para inmunoensayos de alto rendimiento. Pueden realizarse inmunoensayos individuales en cada pocillo en paralelo. Por lo tanto, generalmente es deseable usar un lector de placas para medir múltiples pocillos en paralelo para aumentar el rendimiento del ensayo. En algunas realizaciones, para esta plataforma se pueden utilizar lectores de placas que son capaces de obtener imágenes de múltiples pocillos (por ejemplo, 4, 16, 24, 48, 96, 384 o más pocillos) en paralelo. Por ejemplo, se puede utilizar un lector de placas disponible comercialmente (por ejemplo, el sistema plate:vision disponible de Perkin Elmer, Waltham, MA). Este lector de placas es capaz de realizar análisis de fluorescencia cinéticos. El sistema plate:vision tiene una óptica de alta eficiencia de recolección, y tiene una óptica especial diseñada para el análisis de 96 pocillos en paralelo. Los lectores de placas en paralelo adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a, SAFIRE (Tecan, San Jose, CA), el FLIPRTETRA® (Molecular Devices, Union City, CA), el FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ), y el CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA).
- 25 30 Como se describe en el Ejemplo 1, se descubrió inesperadamente que el área superficial y/o el volumen de los pocillos de la placa de múltiples pocillos pueden afectar los resultados del inmunoensayo. En algunas realizaciones, los inmunoensayos descritos se realizan en placas de 96 pocillos, tal como una placa de ELISA de 96 pocillos.
- 35 En otras realizaciones, los inmunoensayos de cribado de alto rendimiento de la presente descripción pueden automatizarse (por ejemplo, adaptados a ensayos robóticos).
- 40 45 50 55 En algunas realizaciones, los inmunoensayos se pueden realizar en plataformas de bajo rendimiento, incluyendo el formato de inmunoensayo único. Por ejemplo, se puede utilizar una plataforma de bajo rendimiento para medir la presencia y la cantidad de HMWK escindido en muestras biológicas (por ejemplo, tejidos biológicos, extractos de tejido) para métodos de diagnóstico, monitorización de la enfermedad y/o progresión del tratamiento, y/o predicción de si una enfermedad o trastorno puede beneficiarse de un tratamiento particular.
- Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para inmovilizar un agente que se une específicamente a un HMWK escindido, tal como los anticuerpos descritos aquí, sobre un elemento de soporte como también se describe aquí. En algunas realizaciones como se define en las reivindicaciones, la inmovilización implica la unión del agente (por ejemplo, el anticuerpo) al elemento de soporte. En otras realizaciones, la inmovilización implica adsorber el anticuerpo al elemento de soporte. Tales métodos de adsorción se pueden realizar, por ejemplo, incubando el anticuerpo en un amortiguador en los pocillos de una placa de múltiples pocillos. En algunas realizaciones, el agente, tal como el anticuerpo, se proporciona en un amortiguador de revestimiento, y se incuba en los pocillos de una placa de múltiples pocillos. Los amortiguadores de revestimiento serán evidentes para un experto en la técnica, y se pueden preparar u obtener de una fuente comercial. Los ejemplos no limitantes de amortiguadores de revestimiento incluyen bicarbonato de sodio 50 mM, pH 9,6; bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 9,4; disolución amortiguada con fosfato (fosfato 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,15 M); disolución de carbonato-bicarbonato; y TBS (TRIS 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,15 M).
- En algunas realizaciones, el primer agente se inmoviliza sobre el elemento de soporte mediante interacciones hidrófobas entre el primer agente y el elemento de soporte. En algunas realizaciones, el primer agente se inmoviliza sobre el elemento de soporte usando transferencia electroforética.
- Ya sea antes o después de la inmovilización, o ambos, el elemento de soporte puede incubarse con un amortiguador de bloqueo. En general, los amortiguadores de bloqueo se utilizan para bloquear cualquier superficie expuesta de la membrana de soporte (por ejemplo, sitios de la membrana de soporte desocupados por el primer agente). El uso de un amortiguador de bloqueo puede reducir la señal de línea de base detectada (es decir, "interferencia de fondo") y/o mejorar la sensibilidad del inmunoensayo y/o reducir la unión no específica de los componentes de la muestra a la

- membrana de soporte. Como se describe en el Ejemplo 1, la selección del amortiguador de bloqueo afectó los resultados del inmunoensayo. En algunas realizaciones, el amortiguador de bloqueo contiene albúmina de suero, tal como seroalbúmina bovina o seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, el amortiguador de bloqueo es un amortiguador de BSA (por ejemplo, BSA al 2% en amortiguador de PBS). En algunas realizaciones, el amortiguador de bloqueo está libre de albúmina de suero, tal como seroalbúmina bovina o seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, el amortiguador de bloqueo comprende fragmentos de caseína, y opcionalmente NaCl y Tween, y puede tener un pH 7,0-7,4. En algunas realizaciones, los fragmentos de caseína son fragmentos de caseína de alta pureza. Dicho amortiguador de bloqueo se puede preparar u obtener de una fuente comercial (por ejemplo, The Blocking Solution LowCross de CANDOR Bioscience).
- 10 El elemento de soporte, en el que se une el agente específico para un HMWK escindido, se puede poner en contacto (incubar) con una muestra como se describe aquí, que se sospecha que contiene el HMWK escindido. En general, el término “contacto” se refiere a una exposición del elemento de soporte con la muestra o agente biológico durante un período adecuado suficiente para la formación de complejos entre el agente, tal como un anticuerpo, y el HMWK escindido en la muestra, si la hay. Posteriormente, la muestra puede retirarse del elemento de soporte, que entonces 15 puede lavarse varias veces para eliminar cualquier HMWK escindido no unido. En algunas realizaciones, la puesta en contacto se realiza por acción capilar, en la que una muestra o agente biológico se mueve a través de una superficie de la membrana de soporte.
- El elemento de soporte puede incubarse entonces con un segundo agente que se une a HMWK durante un período adecuado que permite la unión del segundo agente a HMWK unido al elemento de soporte.
- 20 El segundo agente puede ser cualquier agente capaz de unirse a HMWK, tal como un anticuerpo capaz de unirse a HMWK (ya sea específico para la forma escindida de HMWK, o puede reaccionar de forma cruzada tanto con HMWK escindido como con HMWK intacto). En algunas realizaciones, el segundo agente comprende uno o más anticuerpos que se unen a HMWK (escindido y/o intacto). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal de ratón o un anticuerpo monoclonal de oveja. Está conjugado con un marcador, que es un compuesto capaz de liberar 25 una señal directa o indirectamente (por ejemplo, vía interacción con uno o más compuestos adicionales).
- En algunas realizaciones, el marcador es un agente que libera una señal, que es un agente que libera directamente una señal (por ejemplo, un tinte o fluoróforo) o libera una señal al interactuar con un sustrato (por ejemplo, una enzima tal como HRP o β -galactosidasa, que puede convertir un sustrato incoloro en un producto coloreado). Como se usa aquí, el término “fluoróforo” (también denominado “marcador fluorescente” o “tinte fluorescente”) se refiere a restos 30 que absorben energía luminosa a una longitud de onda de excitación definida y emiten energía luminosa a una longitud de onda diferente.
- En otras realizaciones, el marcador puede ser un miembro de un par receptor-ligando. Como se usa aquí, un “par ligando-receptor” se refiere a un par de moléculas (por ejemplo, moléculas biológicas) que tienen una afinidad específica entre sí, por ejemplo, biotina-estreptavidina. En este caso, el elemento de soporte que porta el primer agente-HMWK escindido-segundo agente puede incubarse adicionalmente con el otro miembro del par ligando-receptor durante un período adecuado de modo que los dos miembros del par receptor-ligando interactúen. El otro miembro del par receptor-ligando se conjuga con un agente que libera una señal como se describe aquí. En un ejemplo, el segundo agente se conjuga con biotina, y se usa estreptavidina conjugada con HRP para la detección.
- 35 Después de lavar cualquier conjugado no unido, se puede añadir una disolución de sustrato para ayudar en la detección. Por ejemplo, después de un intervalo establecido, la reacción puede detenerse (por ejemplo, añadiendo NaOH 1 N), y la concentración de producto coloreado formado puede medirse en un espectrofotómetro. La intensidad del color es proporcional a la concentración de antígeno unido.
- 40 A continuación, la señal liberada del marcador como se describe aquí puede detectarse/medirse mediante metodología de rutina, que dependería del formato específico de un inmunoensayo y del agente que libera una señal utilizado en el mismo. Como se usa aquí, los términos “medir” o “medida”, o alternativamente “detectar” o “detección”, significan evaluar la presencia, ausencia, cuantía o cantidad (que puede ser una cantidad eficaz) de una sustancia dentro de una muestra, incluyendo la derivación de niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de tales sustancias, o evaluar de otro modo los valores o la categorización de un sujeto.
- 45 Los ensayos, por ejemplo, ensayos de transferencia Western, pueden implicar además el uso de un sistema de formación de imágenes cuantitativo, por ejemplo, la tecnología de formación de imágenes LICOR, que está disponible comercialmente (véase, por ejemplo, el sistema infrarrojo de formación de imágenes Odyssey® CLx de LICOR Biosciences). En algunas realizaciones, se usa un ensayo de detección de electroquimioluminiscencia o un ensayo que se basa en una combinación de electroquimioluminiscencia y tecnología de matriz de patrones (por ejemplo, un ensayo de tecnología ECL o MULTI-ARRAY de Meso Scale Discovery (MSD)).
- 50 55 Cualquiera de los inmunoensayos descritos aquí, por ejemplo, una o más etapas de los inmunoensayos, se puede llevar a cabo en un amortiguador de ensayo adecuado, lo que resultará evidente para un experto en la técnica. En algunas realizaciones, el amortiguador de ensayo contiene o se ha suplementado con ZnCl₂. En algunas realizaciones, el amortiguador de ensayo contiene ZnCl₂ al menos alrededor de 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M, 70 μ M,

80 μ M, 90 μ M, 100 μ M, 150 μ M, 200 μ M, 250 μ M, 300 μ M, 350 μ M, 400 μ M, 450 μ M, 500 μ M, o más. En algunas realizaciones, tal amortiguador de ensayo que contiene ZnCl₂ se usa en la etapa en la que el agente específico para HMWK escindido (por ejemplo, un anticuerpo específico para HMWK escindido) se une a un HMWK escindido. ZnCl₂ mejora la actividad de unión del agente (por ejemplo, anticuerpo) al HMWK escindido.

- 5 En algunas realizaciones, el amortiguador de ensayo contiene albúmina de suero, tal como seroalbúmina bovina o seroalbúmina humana. En algunas realizaciones, el amortiguador de ensayo contiene al menos alrededor de 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,1%, 0,12%, 0,014%, 0,16%, 0,18%, 0,2%, 0,25%, 0,3%, 0,4%, o más de BSA. En algunas realizaciones, el amortiguador de ensayo contiene un tensioactivo, tal como Tween-20. En algunas realizaciones, el amortiguador de ensayo contiene 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04%, 0,05%, 0,06%, 0,07%, 10 0,08%, 0,09%, 0,1%, o más de un tensioactivo. En un ejemplo, el amortiguador de ensayo contiene 0,1% de BSA y 0,05% de Tween-20 en PBS.

(iv) Aplicaciones de diagnóstico y de pronóstico

15 Los métodos y kits de ensayo descritos aquí se pueden aplicar para la evaluación de una enfermedad o trastorno asociado con la calicreína plasmática, tales como los descritos aquí (por ejemplo, HAE), dada la correlación entre el nivel del HMWK escindido y tales enfermedades o trastornos (por ejemplo, como biomarcador). Alternativamente o además, los métodos de ensayo y kits descritos aquí pueden usarse para monitorizar el progreso de dicha enfermedad, evaluar la eficacia de un tratamiento para la enfermedad, identificar pacientes adecuados para un tratamiento particular, y/o predecir el estado de la enfermedad (por ejemplo, ataque frente a quiescencia) en un sujeto.

20 En algunas realizaciones, se puede confiar en el nivel del HMWK escindido determinado por el inmunoensayo descrito aquí para evaluar si un sujeto (por ejemplo, un paciente humano), de quien se obtiene la muestra biológica, tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad o trastorno asociado con calicreína plasmática, tal como HAE o enfermedad autoinmune (tal como RA, UC, y enfermedad de Crohn). El nivel de cininógeno escindido se puede comparar entonces con el cininógeno intacto o con la cantidad total de cininógeno en la muestra para determinar un valor (por ejemplo, porcentaje) de cininógeno escindido, un valor de cininógeno intacto, o ambos, en la muestra. El valor de cininógeno escindido y/o cininógeno intacto se puede comparar con un valor de referencia para determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de padecer el trastorno mediado por pKal, por ejemplo, HAE o una enfermedad autoinmune, tal como RA, UC, y enfermedad de Crohn. Por ejemplo, si el porcentaje de cininógeno escindido es igual o superior a un número de referencia, se puede identificar que el sujeto tiene o está en riesgo de tener un trastorno mediado por pKal tal como HAE, RA, UC, y enfermedad de Crohn. Alternativamente, si el porcentaje de cininógeno intacto es igual o inferior a un número de referencia, se puede identificar que el sujeto tiene o está en riesgo de tener un trastorno mediado por pKal, tal como HAE, RA, UC, y enfermedad de Crohn.

25 En algunas realizaciones, la muestra para el análisis de los métodos descritos aquí deriva de un sujeto humano que tiene o está en riesgo de tener angioedema hereditario (HAE). El HAE también se conoce como “edema de Quincke”, deficiencia del inhibidor de la C1 esterasa, deficiencia del inhibidor de C1, y edema angioneurótico hereditario (HANE). 30 El HAE se caracteriza por episodios recurrentes de hinchazón grave (angioedema), que pueden afectar, por ejemplo, las extremidades, la cara, los genitales, el tubo digestivo, y las vías respiratorias. Los síntomas del HAE incluyen, por ejemplo, hinchazón en los brazos, piernas, labios, ojos, lengua, y/o garganta; obstrucción de las vías respiratorias, que puede implicar inflamación de la garganta y ronquera repentina; episodios repetidos de calambres abdominales sin una causa obvia; y/o hinchazón de los intestinos, que puede ser grave y provocar calambres abdominales, vómitos, deshidratación, diarrea, dolor, y/o choque. Alrededor de un tercio de las personas con este HAE desarrollan una erupción que no produce picazón y que se denomina eritema marginatum durante un ataque.

35 La inflamación de las vías respiratorias puede ser potencialmente mortal, y provoca la muerte en algunos pacientes. Las tasas de mortalidad se estiman entre el 15% y el 33%. HAE conduce a alrededor de 15.000-30.000 visitas al servicio de urgencias por año.

40 45 El trauma o el estrés, por ejemplo, procedimientos dentales, enfermedad (por ejemplo, enfermedades virales tales como resfriados y gripe), la menstruación, y la cirugía pueden desencadenar un ataque de angioedema. Para prevenir ataques agudos de HAE, los pacientes pueden intentar evitar estímulos específicos que hayan causado ataques previamente. Sin embargo, en muchos casos, se produce un ataque sin un desencadenante conocido. Por lo general, los síntomas del HAE aparecen por primera vez en la infancia y empeoran durante la pubertad. En promedio, las 50 personas que no reciben tratamiento tienen un ataque cada 1 o 2 semanas, y la mayoría de los episodios duran entre 3 y 4 días (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema). La frecuencia y duración de los ataques varían mucho entre las personas con angioedema hereditario, incluso entre personas de la misma familia.

55 Hay tres tipos de HAE, conocidos como tipos I, II y III. Se estima que el HAE afecta a 1 de cada 50.000 personas, que el tipo I da cuenta de alrededor del 85 por ciento de los casos, el tipo II da cuenta de alrededor del 15 por ciento de los casos, y el tipo III es muy raro. El tipo III es la forma descrita más recientemente, y originalmente se pensó que ocurría solo en mujeres, pero se han identificado familias con varones afectados.

El HAE se hereda con un patrón autosómico dominante, de modo que una persona afectada puede heredar la mutación de uno de los padres afectados. También pueden ocurrir nuevas mutaciones en el gen, y de este modo el HAE también

puede ocurrir en personas sin antecedentes familiares del trastorno. Se estima que el 20-25% de los casos son el resultado de una nueva mutación espontánea.

Las mutaciones en el gen SERPING1 causan angioedema hereditario tipo I y tipo II. El gen SERPING1 proporciona instrucciones para producir la proteína inhibidor de C1, que es importante para controlar la inflamación. El inhibidor de C1 bloquea la actividad de ciertas proteínas que promueven la inflamación. Las mutaciones que causan angioedema hereditario tipo I conducen a niveles reducidos del inhibidor de C1 en la sangre. En contraste, las mutaciones que causan el tipo II dan como resultado la producción de un inhibidor de C1 que funciona de manera anormal. Sin los niveles adecuados de inhibidor de C1 funcional, se generan cantidades excesivas de bradicinina. La bradicinina promueve la inflamación al aumentar la fuga de líquido a través de las paredes de los vasos sanguíneos hacia los tejidos corporales. La acumulación excesiva de líquidos en los tejidos corporales provoca los episodios de hinchazón que se observan en personas con angioedema hereditario tipo I y tipo II.

Las mutaciones en el gen F12 se asocian con algunos casos de angioedema hereditario tipo III. El gen F12 proporciona instrucciones para producir el factor XII de coagulación. Además de desempeñar un papel fundamental en la coagulación de la sangre (coagulación), el factor XII también es un estimulador importante de la inflamación y está implicado en la producción de bradicinina. Ciertas mutaciones en el gen F12 dan como resultado la producción de factor XII con mayor actividad. Como resultado, se genera más bradicinina, y las paredes de los vasos sanguíneos se vuelven más permeables, lo que conduce a episodios de hinchazón. Se desconoce la causa de otros casos de angioedema hereditario tipo III. Las mutaciones en uno o más genes aún no identificados pueden ser responsables del trastorno en estos casos.

El HAE puede presentarse de manera similar a otras formas de angioedema como resultado de alergias u otras afecciones médicas, pero difiere significativamente en la causa y el tratamiento. Cuando el HAE se diagnostica erróneamente como una alergia, se trata más comúnmente con antihistamínicos, esteroides y/o epinefrina, que generalmente son ineficaces en el HAE, aunque la epinefrina se puede usar para las reacciones potencialmente mortales. Los diagnósticos erróneos también han dado lugar a una cirugía exploratoria innecesaria para los pacientes con hinchazón abdominal, y en algunos pacientes con HAE, el dolor abdominal se ha diagnosticado incorrectamente como psicosomático.

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

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

El inhibidor de C1 purificado, derivado de sangre humana, se ha utilizado en Europa desde 1979. En la actualidad, varios tratamientos con inhibidor de C1 están disponibles en los Estados Unidos de América, y actualmente hay disponibles en Canadá dos productos de inhibidor de C1. Berinert P® (CSL Behring), que está pasteurizado, fue aprobado por la F.D.A. en 2009 para ataques agudos. CINRYZE®, que está nanofiltrado, fue aprobado por la F.D.A. en 2008 para la profilaxis. Rhucin/Ruconest® (Pharming) es un inhibidor de C1 recombinante en desarrollo que no conlleva el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas debido a patógenos transmitidos por la sangre humana.

El tratamiento de un ataque agudo de HAE también puede incluir medicamentos para aliviar el dolor y/o líquidos intravenosos.

Otras modalidades de tratamiento pueden estimular la síntesis del inhibidor de C1, o reducir el consumo de inhibidor de C1. Los medicamentos andrógenos, tal como el danazol, pueden reducir la frecuencia y la gravedad de los ataques al estimular la producción del inhibidor de C1.

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

Los tratamientos más nuevos atacan a la cascada del sistema de contacto. Ecallantide (KALBITOR®) inhibe la calicreína plasmática, y ha sido aprobado en los Estados Unidos de América. Icatibant (FIRAZYR®, Shire) inhibe el receptor de bradicinina B2, y ha sido aprobado en Europa y en los Estados Unidos de América.

El diagnóstico de HAE puede basarse en, por ejemplo, antecedentes familiares y/o análisis de sangre. Los hallazgos de laboratorio asociados con HAE tipos I, II y III se describen, por ejemplo, en Kaplan, A.P., J Allergy Clin Immunol, 2010, 126(5):918-925. En el HAE de tipo I, el nivel de inhibidor de C1 disminuye, al igual que el nivel de C4, mientras que el nivel de C1q es normal. En HAE de tipo II, el nivel de inhibidor de C1 es normal o está aumentado; sin embargo, la función del inhibidor de C1 es anormal. El nivel de C4 está disminuido, y el nivel de C1q es normal. En el tipo III, los niveles de inhibidor de C1, C4, y C1q pueden ser todos normales. La presente descripción se basa, al menos en parte, en la identificación de proteínas adicionales que tienen niveles diferenciales en muestras de pacientes con HAE en comparación con individuos sanos (Tabla 1). La medida del nivel o la presencia de 2-HMWK se puede usar para

identificar si un sujeto tiene una enfermedad, tal como HAE. En algunas realizaciones, los métodos pueden usarse para determinar si un paciente ha tenido o está teniendo un ataque de HAE.

Los síntomas del HAE se pueden evaluar, por ejemplo, mediante cuestionarios, por ejemplo, cuestionarios que completan los pacientes, los médicos, o los familiares. Dichos cuestionarios son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, escalas analógicas visuales. Véase, por ejemplo, McMillan, C.V. et al. Patient. 2012; 5(2): 113-26.

El valor de cininógeno escindido y/o cininógeno intacto detectado en una muestra de un sujeto se puede comparar con un valor de referencia para determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de padecer el trastorno mediado por PKal (por ejemplo, HAE). Alternativamente o además, el nivel de cininógeno escindido y/o cininógeno intacto detectado en una muestra del sujeto se puede comparar con un valor de referencia para evaluar la eficacia de un tratamiento para el trastorno, el pronóstico o la gravedad del trastorno, y/o identificar a un sujeto como candidato para el tratamiento.

El valor de referencia puede ser un nivel de control del porcentaje de cininógeno escindido. En algunas realizaciones, el nivel de control es el porcentaje de cininógeno escindido en una muestra de control, tal como una muestra (por ejemplo, muestra de sangre o plasma) obtenida de un sujeto sano o una población de sujetos sanos, que preferiblemente son de la misma especie que el sujeto candidato. Como se usa aquí, un sujeto sano es un sujeto que aparentemente está libre de la enfermedad diana (por ejemplo, un trastorno mediado por PKal tal como HAE, o enfermedades autoinmunes tales como AR, UC, y enfermedad de Crohn) en el momento en que se mide el nivel de cininógeno escindido y/o intacto, o no tiene antecedentes de la enfermedad.

El nivel de control también puede ser un nivel predeterminado o umbral. Dicho nivel predeterminado puede representar el porcentaje de cininógeno escindido en una población de sujetos que no tienen o no tienen riesgo de padecer la enfermedad diana. También puede representar el porcentaje de cininógeno escindido en una población de sujetos que tienen la enfermedad diana.

El nivel predeterminado puede adoptar diversas formas. Por ejemplo, puede ser un valor de corte único, tal como una mediana o media. En algunas realizaciones, dicho nivel predeterminado puede establecerse basándose en grupos comparativos, tal como cuando se sabe que un grupo definido tiene una enfermedad diana y se sabe que otro grupo definido no tiene la enfermedad diana. Alternativamente, el nivel predeterminado puede ser un intervalo, por ejemplo, un intervalo que representa los porcentajes de cininógeno escindido en una población de control dentro de un percentil predeterminado.

El nivel de control como se describe aquí puede determinarse mediante tecnología de rutina. En algunos ejemplos, el nivel de control puede obtenerse llevando a cabo un método convencional (por ejemplo, el mismo ensayo para obtener el nivel de cininógeno escindido y/o intacto en una muestra de ensayo como se describe aquí) en una muestra de control como también se describe aquí. En otros ejemplos, los niveles de cininógeno escindido y/o intacto pueden obtenerse de miembros de una población de control, y los resultados pueden analizarse mediante, por ejemplo, un programa de ordenador, para obtener el nivel de control (un nivel predeterminado) que representa el nivel de cininógeno escindido y/o intacto en la población de control.

Comparando el porcentaje de cininógeno escindido en una muestra obtenida de un sujeto candidato con el valor de referencia como se describe aquí, se puede determinar si el sujeto candidato tiene o está en riesgo de padecer la enfermedad mediada por PKal (por ejemplo, HAE o una enfermedad autoinmune tal como RA, UC, y enfermedad de Crohn). Por ejemplo, si el porcentaje de cininógeno escindido en una muestra del sujeto candidato se desvía del valor de referencia (por ejemplo, aumenta en comparación con el valor de referencia, o disminuye en comparación con el valor de referencia), el sujeto candidato podría identificarse como portador o en riesgo de padecer la enfermedad. Cuando el valor de referencia representa el intervalo de porcentaje de cininógeno escindido en una población de sujetos que tienen la enfermedad diana, el porcentaje de cininógeno escindido en una muestra de un candidato que se encuentra en el intervalo indica que el sujeto candidato tiene o está en riesgo de padecer la enfermedad diana. En algunos casos, un valor de referencia puede representar un nivel de fondo que indica la ausencia de cininógeno escindido. La presencia de cininógeno escindido se considera como una desviación de dicho valor de referencia de fondo. Como se usa aquí, una "desviación de" una muestra de control o valor de referencia abarca los niveles de HMWK escindido, así como la presencia o ausencia de HMWK escindido en la muestra.

Como se usa aquí, "un nivel elevado o un nivel por encima de un valor de referencia" significa que el nivel/porcentaje de cininógeno escindido es más alto que un valor de referencia, tal como un umbral predeterminado de un nivel/porcentaje de cininógeno escindido en una muestra de control. Los niveles de control se describen con detalle aquí.

Un porcentaje elevado de cininógeno escindido incluye un porcentaje de cininógeno escindido que es, por ejemplo, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500%, o mayor, por encima de un valor de referencia. Un porcentaje elevado de cininógeno escindido también incluye el aumento de un fenómeno desde un estado cero (por ejemplo, cininógeno escindido inexistente o indetectable y/o cininógeno intacto que se une a un reactivo de captura en una muestra) a un estado distinto de cero (por ejemplo, algo de cininógeno escindido o detectable y/o cininógeno intacto).

Como se usa aquí, "un porcentaje/nivel disminuido o un porcentaje/nivel por debajo de un valor de referencia" significa que el porcentaje/nivel de escindido es menor que un valor de referencia, tal como un umbral predeterminado de cininógeno escindido en una muestra de control. Los niveles de control se describen con detalle aquí.

5 Un nivel reducido de cininógeno escindido incluye un cininógeno escindido que es, por ejemplo, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más, menor que un valor de referencia. Un nivel reducido de cininógeno escindido que se une a un reactivo de captura también incluye la disminución de un fenómeno desde un estado distinto de cero (por ejemplo, algo de cininógeno escindido o detectable en una muestra) a un estado cero (por ejemplo, cininógeno escindido inexistente o indetectable en una muestra).

10 En algunas realizaciones, el sujeto candidato es un paciente humano que tiene un síntoma de un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, tal como HAE o una enfermedad autoinmune tal como RA, UC, y enfermedad de Crohn. Por ejemplo, el sujeto tiene edema, hinchazón, en el que dicha hinchazón es completa o predominantemente periférica; urticaria; enrojecimiento, dolor e hinchazón en ausencia de signos de infección; edema no mediado por histamina, ataques recurrentes de hinchazón, o una combinación de los mismos. En otras realizaciones, el sujeto no tiene ningún síntoma de un trastorno mediado por pKal en el momento en que se recoge la muestra, no tiene antecedentes de un síntoma de un trastorno mediado por pKal, o no tiene antecedentes de un trastorno mediado por pKal tal como HAE. En aún otras realizaciones, el sujeto es resistente a una terapia antihistamínica, una terapia con corticosteroides, o ambas.

Un sujeto identificado en los métodos descritos aquí puede someterse a un tratamiento adecuado.

20 Los métodos y kits de ensayo descritos aquí se pueden aplicar para evaluar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad asociada con calicreína plasmática, tales como los descritos aquí, dada la correlación entre el nivel del HMWK escindido y tales enfermedades. Por ejemplo, se pueden recoger múltiples muestras biológicas (por ejemplo, muestras de sangre o plasma) de un sujeto al que se le realiza un tratamiento, antes y después del tratamiento, o durante el curso del tratamiento. Los niveles de cininógeno escindido y/o intacto pueden medirse mediante cualquiera de los métodos de ensayo descritos aquí, y los valores (por ejemplo, porcentajes) de cininógeno escindido y/o intacto se pueden determinar en consecuencia. Si el porcentaje de cininógeno escindido disminuye después del tratamiento o durante el transcurso del mismo (el porcentaje de cininógeno escindido en una muestra recogida más tarde en comparación con el de una muestra recogida anteriormente), o el porcentaje de cininógeno intacto aumenta después del tratamiento o a lo largo del curso del tratamiento, indica que el tratamiento es eficaz. En algunos ejemplos, el tratamiento implica un agente terapéutico, tal como un inhibidor de calicreína, un antagonista del receptor de bradicinina B₂, o un agente de sustitución de C1-INH. Los ejemplos de los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, landadelumab (DX-2930), ecallantida (DX-88), icantibant, y C1-INH derivado de plasma humano.

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

40 En otras realizaciones, también se puede confiar en los valores del cininógeno escindido, ya sea solo o en combinación con el del cininógeno intacto, para identificar un trastorno que puede tratarse con un inhibidor de pKal. Para practicar este método, el nivel de cininógeno escindido y/o el nivel de cininógeno intacto en una muestra recogida de un sujeto (por ejemplo, una muestra de sangre o una muestra de plasma) que tiene una enfermedad diana puede medirse mediante un ensayo adecuado, por ejemplo, los descritos aquí, tales como un ensayo de transferencia Western o ELISA. Los valores tales como los porcentajes del cininógeno escindido y/o intacto pueden determinarse como se describe aquí. Los valores de cininógeno escindido y/o cininógeno intacto pueden compararse con un valor de referencia como se describe aquí. Si el valor de cininógeno escindido/cininógeno intacto se desvía del valor de referencia (por ejemplo, aumenta o disminuye), indica que un inhibidor de pKal puede ser eficaz en el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, si los porcentajes de cininógeno escindido están disminuyendo después del tratamiento o durante el transcurso del tratamiento, el tratamiento puede identificarse como efectivo. Alternativamente, si los porcentajes de cininógeno intacto aumentan después del tratamiento o durante el curso del tratamiento, el tratamiento se identifica como efectivo.

50 Si la enfermedad se identifica como susceptible a (puede ser tratada por) un inhibidor de pKal, el método descrito puede comprender además administrar al sujeto que tiene la enfermedad una cantidad eficaz de un inhibidor de pKal, por ejemplo, ecallantida (DX-88), EPIKAL-2, o landadelumab (DX-2930).

55 También dentro del alcance de la presente descripción están los métodos para evaluar la gravedad de una enfermedad o trastorno asociado con la calicreína plasmática o el estado patológico. Por ejemplo, como se describe aquí, HAE puede estar en el estado de reposo (estado basal), durante el cual el sujeto no experimenta síntomas de la enfermedad. Los ataques de HAE suelen ser episodios recurrentes en los que el sujeto puede experimentar dolor e hinchazón, por ejemplo, en las manos, los pies, la cara, el tubo digestivo, los genitales, y la laringe (garganta), que pueden durar de dos a cinco días. En algunas realizaciones, el nivel de 2-HMWK es indicativo de si el sujeto experimentará, está experimentando, o experimentará pronto un ataque de HAE. En algunas realizaciones, los

métodos implican comparar el nivel de 2-HMWK en una muestra obtenida de un sujeto que tiene HAE con el nivel de 2-HMWK en una muestra del mismo sujeto, por ejemplo, una muestra obtenida del mismo sujeto en estado basal o una muestra obtenida del mismo sujeto durante un ataque de HAE.

(v) Aplicaciones no clínicas

- 5 Además, los ensayos para detectar los niveles de 2-HMWK escindido descritos aquí pueden usarse con fines de investigación. Aunque se han identificado muchas enfermedades y trastornos asociados o mediados por la calicreína plasmática, es posible que otras enfermedades estén mediadas por mecanismos similares o impliquen componentes similares. En algunas realizaciones, los métodos descritos aquí pueden usarse para identificar una enfermedad asociada o mediada por calicreína plasmática o con componentes del sistema de activación de contacto. En algunas 10 realizaciones, los métodos descritos aquí pueden usarse para estudiar mecanismos (por ejemplo, el descubrimiento de nuevas rutas o procesos biológicos implicados en el desarrollo de una enfermedad) o la progresión de una enfermedad.

En algunas realizaciones, los niveles de 2-HMWK escindido, según se miden usando los ensayos descritos aquí, se 15 pueden basar en el desarrollo de nuevas sustancias terapéuticas para una enfermedad asociada con el sistema de activación de contacto. Por ejemplo, los niveles de 2-HMWK escindido pueden medirse en muestras obtenidas de un sujeto al que se le ha administrado una nueva terapia (por ejemplo, un ensayo clínico). En algunas realizaciones, los niveles de 2-HMWK escindido pueden indicar la eficacia del nuevo tratamiento o la progresión de la enfermedad en el sujeto antes, durante o después de la nueva terapia.

II. Tratamiento de enfermedades asociadas con calicreína plasmática

20 Un sujeto en riesgo de padecer o que padece una enfermedad asociada con la calicreína plasmática, como se identifica usando los métodos y ensayos descritos aquí, puede tratarse con cualquier agente terapéutico apropiado. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados incluyen la selección de un tratamiento para un sujeto basándose en el resultado del método descrito, por ejemplo, midiendo el nivel de 2-HMWK escindido.

25 En algunos casos, el método comprende uno o ambos de seleccionar o administrar un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor de calicreína, un inhibidor del receptor de bradicinina B2, y/o un inhibidor de C1 esterasa, para la administración al sujeto en base al resultado del ensayo, por ejemplo, la detección de 2-HMWK.

30 En algunos casos, el agente terapéutico se administra al sujeto una o más veces. En algunos casos, se administra a un sujeto un inhibidor de calicreína plasmática. En algunos casos, el inhibidor de calicreína es un péptido, un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo contra la calicreína, o un fragmento del mismo. En algunos casos, se administra a un sujeto un antagonista del receptor de bradicinina B2. En algunos casos, se administra a un sujeto un C1-INH.

35 El agente terapéutico, por ejemplo, el inhibidor de calicreína, el inhibidor del receptor de bradicinina B2, y/o C1-INH, se pueden administrar junto con otra terapia como parte de una terapia de combinación para el tratamiento de la enfermedad o afección que implica el sistema de activación de contacto. La terapia de combinación, por ejemplo, con uno o más de un inhibidor de calicreína, un antagonista del receptor de bradicinina B2, o un agente de sustitución de C1-INH, por ejemplo, con uno o más de un inhibidor de calicreína, un antagonista del receptor de bradicinina B2, o un agente de sustitución de C1-INH y otra terapia, puede proporcionarse en múltiples configuraciones diferentes. El primer agente puede administrarse antes o después de la administración de la otra terapia. En algunas situaciones, el primer agente y otra terapia (por ejemplo, un agente terapéutico) se administran al mismo tiempo o en estrecha proximidad temporal (por ejemplo, un breve intervalo de tiempo entre las inyecciones, tal como durante la misma sesión de tratamiento). El primer agente y la otra terapia también pueden administrarse a intervalos temporales mayores.

40 Los agentes de unión a calicreína plasmática (por ejemplo, proteínas de unión, por ejemplo, polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos inhibidores, por ejemplo, anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos inhibidores, u otros agentes de unión, por ejemplo, moléculas pequeñas) son agentes terapéuticos útiles para una variedad de enfermedades y afecciones, por ejemplo, enfermedades y afecciones que implican la actividad de la calicreína plasmática. Por ejemplo, en algunas 45 realizaciones, la enfermedad o afección que implica la actividad de la calicreína plasmática es el angioedema hereditario (HAE). En algunos casos, un agente de unión a calicreína plasmática, tal como un inhibidor de calicreína plasmática, se administra a un sujeto en riesgo de padecer o que padece una enfermedad asociada con el sistema de activación de contacto.

50 Varios inhibidores proteicos útiles de calicreína, ya sea calicreína tisular y/o plasmática, incluyen un dominio de Kunitz. Como se usa aquí, un "dominio de Kunitz" es un dominio polipeptídico que tiene al menos 51 aminoácidos, y que contiene al menos dos, y preferiblemente tres, disulfuros. El dominio está plegado de tal manera que la primera y sexta cisteínas, la segunda y cuarta, y la tercera y quinta cisteínas forman enlaces de disulfuro (por ejemplo, en un dominio de Kunitz que tiene 58 aminoácidos, las cisteínas pueden estar presentes en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 5, 14, 30, 38, 51 y 55, de acuerdo con el número de secuencias homólogas de BPTI que se proporcionan a continuación, y se pueden formar disulfuros entre las cisteínas en la posición 5 y 55, 14 y 38, y 30 y 51), o, si están presentes dos disulfuros, pueden formarse entre un subconjunto correspondiente de cisteínas de los mismos. El espacio entre las cisteínas respectivas puede estar dentro de 7, 5, 4, 3, 2, 1 o 0 aminoácidos del siguiente espacio entre posiciones correspondientes a: 5 a 55, 14 a 38, y 30 a 51, según la numeración de la secuencia de BPTI

proporcionada a continuación. La secuencia de BPTI puede usarse como referencia para referirse a posiciones específicas en cualquier dominio genérico de Kunitz. La comparación de un dominio de Kunitz de interés con BPTI se puede realizar identificando la alineación de mejor ajuste en la que se maximiza el número de cisteínas alineadas.

- 5 Se conoce la estructura 3D (a alta resolución) del dominio de Kunitz de BPTI. Una de las estructuras de rayos X está depositada en el Brookhaven Protein Data Bank como "6PTI". Se conoce la estructura 3D de algunos homólogos de BPTI (Eigenbrot et al., Protein Engineering (1990) 3(7):591-598; Hynes et al., Biochemistry (1990) 29:10018-10022). Se conocen al menos ochenta y una secuencias de dominio de Kunitz. Los homólogos humanos conocidos incluyen tres dominios de Kunitz de LAC1, también conocidos como inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI) (Wun et al., J. Biol. Chem. (1988) 263(13):6001-6004; Girard et al., Nature (1989) 338:518-20; Novotny et al., J. Biol. Chem. (1989) 10 264(31):18832-18837), dos dominios de Kunitz del inhibidor de inter- α -tripsina, APP-I (Kido et al. J. Biol. Chem. (1988) 263(34):18104-18107), un dominio de Kunitz del colágeno, tres dominios de Kunitz de TFPI-2 (Sprecher et al., PNAS USA (1994) 91:3353-3357), los dominios de Kunitz del inhibidor del activador del factor de crecimiento de hepatocitos tipo 1, los dominios de Kunitz del inhibidor del activador del factor de crecimiento de hepatocitos tipo 2, los dominios de Kunitz descritos en la Publicación de Patente U.S. nº: 2004-0152633. LAC1 es una fosfoglicoproteína sérica humana 15 con un peso molecular de 39 kDa (secuencia de aminoácidos en la Tabla 1) que contiene tres dominios de Kunitz.

Tabla 1: Dominios de Kunitz naturales ejemplares

LACI (SEQ ID NO: 78)	<p>1 <u>MIYTMKKVHA LWASVCLLN LAPAPLN</u>Ad s eedeehtii t <u>dtelppklM</u></p> <p>51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN</p> <p><u>QNRFESLEEC</u></p> <p>101 KKMCTRdnan riikttlqqe <u>kpdfCfleed pgiCrgyitr</u> <u>yfynnqtkqC</u></p> <p>151 <u>erfkyyggClg nmnnnfetlee CknicEdgpn gfvqvdnygtq</u> <u>lnavnnsltp</u></p> <p>201 <u>qstkvpслfe fhgpswCltp adrglCrane nrffyynsvig</u> <u>kCrpfkysgC</u></p> <p>251 <u>ggennnftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq</u> <u>rvkiayeeif</u></p> <p>301 <u>vknm</u></p> <p>La secuencia de la señal (1-28) está en mayúscula y subrayada</p> <p>LACI-K1 (50-107) está en mayúsculas</p> <p>LACI-K2 (121-178) está subrayado</p> <p>LACI-K3 (211-270) está en negrita</p>
BPTI (SEQ ID NO: 79)	<p>1 2 3 4 5</p> <p>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</p> <p>RPDF<u>C</u>LEPP<u>P</u>YTGP<u>C</u>KARI<u>I</u>RYFYNA<u>K</u>AGL<u>C</u>OTFVYGG<u>C</u>RAKRN<u>N</u>FK<u>S</u>AED<u>C</u>MR<u>T</u>CGGA</p>

- 20 Los dominios de Kunitz anteriores se denominan LACI-K1 (restos 50 a 107), LACI-K2 (restos 121 a 178) y LACI-K3 (213 a 270). La secuencia de ADNc de LACI se da a conocer en Wun et al. (J. Biol. Chem. (1988) 263(13):6001-6004). Girard et al. (Nature (1989) 338:518-20) dan a conocer estudios mutacionales en los que se alteraron los restos P1 de cada uno de los tres dominios de Kunitz. LACI-K1 inhibe el Factor VIIa (F.VIIa) cuando F.VIIa forma un complejo con el factor tisular, y LACI-K2 inhibe el Factor Xa.

- 25 Se puede usar una variedad de métodos para identificar un dominio de Kunitz a partir de una base de datos de secuencias. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos conocida de un dominio de Kunitz, una secuencia de consenso, o un motivo (por ejemplo, el Motivo de ProSite) se puede buscar en las bases de datos de secuencias de GenBank (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda MD), por ejemplo, usando BLAST; en la base de datos Pfam de HMM (modelos ocultos de Markov) (por ejemplo, utilizando parámetros predeterminados para la búsqueda de Pfam; en la base de datos SMART; o en la base de datos ProDom. Por ejemplo, el número de acceso de Pfam PF00014 de la versión 9 de Pfam proporciona numerosos dominios de Kunitz y un HMM para identificar los dominios de Kunitz. Se puede encontrar una descripción de la base de datos de Pfam en Sonhammer et al. *Proteins* (1997) 28(3):405-420, y se puede encontrar una descripción detallada de los HMM, por ejemplo, en Gribskov et al. *Meth. Enzymol.* (1990) 183:146-159; Gribskov et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84:4355-4358; Krogh et al. *J. Mol. Biol.* (1994) 235:1501-1531; y Stultz et al. *Protein Sci.* (1993) 2:305-314. La base de datos de SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE) de los HMM como se describe en Schultz et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:5857 y Schultz et al. *Nucl. Acids Res* (2000) 28:231.

30

35

La base de datos de SMART contiene dominios identificados mediante la creación de perfiles con los modelos ocultos de Markov del programa de búsqueda HMMer2 (R. Durbin et al. (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). La base de datos también está anotada y monitorizada. La base de datos de dominios de proteínas ProDom consiste en una compilación automática de 5 dominios homólogos (Corpet et al. *Nucl. Acids Res.* (1999) 27:263-267). Las versiones actuales de ProDom se crean utilizando búsquedas PSI-BLAST recursivas (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:3389-3402; Gouzy et al. *Computers and Chemistry* (1999) 23:333-340.) de las bases de datos de proteínas SWISS-PROT 38 y TREMBL. La base de datos genera automáticamente una secuencia de consenso para cada dominio. Prosit enumera el dominio 10 Kunitz como motivo, e identifica proteínas que incluyen un dominio Kunitz. Véase, por ejemplo, Falquet et al. *Nucleic Acids Res.* (2002) 30:235-238.

Los dominios de Kunitz interactúan con la proteasa diana utilizando, principalmente, aminoácidos en dos regiones de bucle ("bucles de unión"). La primera región de bucle se encuentra entre alrededor de los restos correspondientes a los aminoácidos 13-20 de BPTI. La segunda región de bucle está entre alrededor de los restos correspondientes a los aminoácidos 31-39 de BPTI. Una biblioteca ejemplar de dominios de Kunitz varía una o más posiciones de 15 aminoácidos en las regiones de bucle primera y/o segunda. Las posiciones particularmente útiles a variar, cuando se criban los dominios de Kunitz que interactúan con la calicreína o cuando se seleccionan variantes de afinidad mejoradas, incluyen: posiciones 13, 15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 y 39 con respecto a la secuencia de BPTI. Se espera que al menos algunas de estas posiciones estén en contacto estrecho con la proteasa diana. También es útil variar 20 otras posiciones, por ejemplo, posiciones que son adyacentes a las posiciones antes mencionadas en la estructura tridimensional.

La "región marco" de un dominio de Kunitz se define como aquellos restos que forman parte del dominio de Kunitz, pero excluyen específicamente los restos en las regiones de bucles de unión primera y segunda, es decir, alrededor de los restos correspondientes a los aminoácidos 13-20 de BPTI y 31-39 de BPTI. Por el contrario, los restos que no 25 están en el bucle de unión pueden tolerar un intervalo más amplio de sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones conservativas y/o no conservativas).

En una realización, estos dominios de Kunitz son formas variantes de la estructura en bucle que incluye el dominio 1 de Kunitz de la proteína inhibidor de la coagulación asociado a lipoproteína humana (LACI). LACI contiene tres estructuras de bucle peptídico internas, bien definidas, que son dominios paradigmáticos de Kunitz (Girard, T. et al., *Nature* (1989) 338:518-520). Las variantes del dominio 1 de Kunitz de LACI descritas aquí se han cribado, aislado, y 30 se unen a calicreína con mayor afinidad y especificidad (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 5.795.865 y 6.057.287). Estos métodos también se pueden aplicar a otros marcos de dominio de Kunitz para obtener otros dominios de Kunitz que interactúan con la calicreína, por ejemplo, calicreína plasmática. Los moduladores útiles de la función de la calicreína típicamente se unen y/o inhiben la calicreína, según se determina usando ensayos de inhibición y unión de calicreína.

35 En algunos aspectos, el inhibidor de calicreína plasmática se une a la forma activa de la calicreína plasmática. En algunas realizaciones, el inhibidor de calicreína plasmática se une e inhibe la calicreína plasmática, por ejemplo, calicreína plasmática humana y/o calicreína murina. Agentes de calicreína plasmática polipeptídicos ejemplares se describen en la Patente U.S. nº 5.795.865, patente U.S. nº 5.994.125, patente U.S. nº 6.057.287, patente U.S. nº 6.333.402, patente U.S. nº 7.628.983, and patente U.S. nº 8.283.321, patente U.S. nº 7.064.107, patente U.S. nº 40 7.276.480, patente U.S. nº 7.851.442, patente U.S. nº 8.124.586, patente U.S. nº 7.811.991, y Publicación U.S. nº 20110086801. En algunas realizaciones, el inhibidor de calicreína plasmática es un polipéptido o péptido inhibidor. En algunas realizaciones, el péptido inhibidor es ecallantida (también denominada DX-88 o KALBITOR®; SEQ ID NO:80). En algunas realizaciones, el inhibidor de calicreína comprende o consiste en una secuencia de alrededor de 58 45 aminoácidos de los aminoácidos 3-60 de SEC ID NO: 80 o el polipéptido DX-88 que tiene la secuencia de 60 aminoácidos de SEC ID NO: 80.

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEQ ID NO: 80). El inhibidor de calicreína plasmática pueden ser anticuerpos de longitud completa (por ejemplo, una IgG (por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por ejemplo, IgA1, IgA2), IgD, e IgE), o 50 puede incluir solo un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')2 o scFv). La proteína de unión puede incluir dos inmunoglobulinas de cadena pesada y dos inmunoglobulinas de cadena ligera, o puede ser un anticuerpo monocatenario. El inhibidor de calicreína plasmática pueden ser proteínas recombinantes tales como anticuerpos humanizados, injertados con CDR, quiméricos, desinmunizados, o generados *in vitro*, y opcionalmente 55 pueden incluir regiones constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, el inhibidor de calicreína plasmática es un anticuerpo monoclonal.

Las proteínas de unión a calicreína plasmática ejemplares se describen en la Publicación U.S. nº 20120201756. En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligera y/o pesada de anticuerpos seleccionados del grupo que consiste en M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (también denominado DX-2922), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, 60 X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01 (también denominado aquí DX-2930 o lanadelumab), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas

realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática compite con o se une al mismo epítopo que M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (también denominado aquí DX-2922), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas realizaciones, la proteína de unión a calicreína plasmática es lanadelumab. Véanse los documentos US 20110200611 y US 20120201756.

5 Un ejemplo de un anticuerpo inhibidor de calicreína plasmática es lanadelumab. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de lanadelumab se proporcionan a continuación, con las regiones CDR identificadas en negrita y subrayadas.

Secuencia de la región variable de cadena pesada de lanadelumab (SEQ ID NO: 81)

EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYIMMWVRQA PGKGLEWVSG IYSSGGITVY
10 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAYRR IGVPRRDEFD IWGQGTMVTV SS

Secuencia de la región variable de cadena ligera de lanadelumab (SEQ ID NO: 82)

DIQMTQSPS TLSASVGDRV TITCRASQSI SSWLAWYQQK PGKAPKLLIY KASTLESGVP
SRFSGSGSGT EFTLTISSLQ PDDFATYYCQ QYNTYWTFGQ GTKVEI

15 En algunas realizaciones, un inhibidor de calicreína plasmática puede tener alrededor de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia con un inhibidor de calicreína plasmática descrito aquí. En algunas realizaciones, un inhibidor de calicreína plasmática puede tener alrededor de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia de las regiones marco de HC y/o LC (por ejemplo, FR 1, 2, 3 y/o 4 de HC y/o LC) con un inhibidor de calicreína plasmática descrito aquí. En algunas realizaciones, un inhibidor de calicreína plasmática puede tener alrededor de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia en las CDR de HC y/o LC (por ejemplo, CDR1, 2 y/o 3 de HC 20 y/o LC) con un inhibidor de calicreína plasmática descrito aquí. En algunas realizaciones, un inhibidor de calicreína plasmática puede tener alrededor de 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor identidad de secuencia en la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3 y/o CL1) con un inhibidor de calicreína plasmática descrito aquí.

En algunos aspectos, una molécula pequeña se une e inhibe la forma activa de calicreína plasmática.

25 Inhibidores del receptor de bradicinina B2

En algunos casos, un inhibidor del receptor de bradicinina B2 (por ejemplo, antagonista) se administra a un sujeto. Ejemplos de antagonistas del receptor de bradicinina B2 incluyen icatibant (Firazyr®), que es un fármaco peptidomimético que contiene 10 aminoácidos que bloquean la unión de la bradicinina nativa al receptor de bradicinina B2.

30 Agentes de reemplazo de C1-INH

En algunos casos, un inhibidor de C1 esterasa (C1-INH), tal como un agente de sustitución de C1-INH, se administra a un sujeto. Los agentes de sustitución de C1-INH ejemplares están disponibles públicamente, e incluyen, por ejemplo, C1-INH derivado de plasma humano, por ejemplo, Berinert® y CINRYZE®.

III. Kits para la detección de HMWK escindido

- 35 La presente descripción también proporciona kits para uso en la evaluación de HMWK escindido en muestras sospechosas de contener un HMWK escindido, por ejemplo, muestras biológicas de pacientes humanos. Dichos kits pueden comprender un primer agente que se une específicamente a HMWK escindido en comparación con HMWK intacto o LMWK, como se define en las reivindicaciones. En algunas realizaciones, el primer agente es un anticuerpo, tal como cualquiera de los anticuerpos descritos aquí que se unen específicamente a HMWK escindido (por ejemplo, 559B-M004 o variantes funcionales del mismo como se describe aquí). En algunas realizaciones, los kits comprenden además un segundo agente (por ejemplo, un anticuerpo que se une a HMWK) para detectar la unión del primer agente al HMWK escindido. El segundo agente se puede conjugar con un marcador. En algunas realizaciones, el segundo agente es un anticuerpo que se une específicamente a HMWK escindido. En otras realizaciones, el segundo agente es un anticuerpo que reacciona de forma cruzada con HMWK tanto escindido como intacto.
- 40 45 El kit puede comprender además un elemento de soporte para realizar el inmunoensayo e inmovilizar el primer agente. En algunas realizaciones, el elemento de soporte es una placa de 96 pocillos, tal como una placa de ELISA de 96 pocillos. El kit también puede comprender uno o más amortiguadores como se describe aquí, pero no se limita a un amortiguador de revestimiento; un amortiguador de ensayo, tal como un amortiguador de ensayo que contiene ZnCl₂; un amortiguador de bloqueo; un amortiguador de lavado; y/o un amortiguador de parada.
- 50 50 En algunas realizaciones, el kit puede comprender instrucciones para uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos aquí. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de cómo utilizar los componentes

contenidos en el kit para medir el nivel del HMWK escindido y/o intacto en una muestra, que puede ser una muestra biológica recogida de un paciente humano. Alternativamente o además, el kit puede comprender una descripción de cómo utilizar los componentes contenidos en el kit para medir el nivel de LMWK.

5 Las instrucciones relacionadas con el uso del kit generalmente incluyen información sobre la cantidad de cada componente y las condiciones adecuadas para realizar los métodos de ensayo descritos aquí. Los componentes en los kits pueden estar en dosis unitarias, paquetes voluminosos (por ejemplo, envases de múltiples dosis) o dosis subunitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la presente descripción suelen ser instrucciones escritas en una etiqueta o prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero también son aceptables instrucciones legibles por máquina (por ejemplo, instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

10 La etiqueta o el prospecto indica que el kit se utiliza para evaluar el nivel de HMWK escindido y/o intacto. En algunas realizaciones, el kit se usa para evaluar el nivel de LMWK. Se pueden proporcionar instrucciones para practicar cualquiera de los métodos descritos aquí.

15 Los kits de esta presente descripción están en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales, botellas, frascos, envases flexibles (por ejemplo, bolsas Mylar o de plástico selladas), y similares. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador), o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica).

20 25 Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tal como información interpretativa, tal como una muestra control y/o estándar o de referencia. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto o prospectos en o asociados con el recipiente. En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona artículos de fabricación que comprenden los contenidos de los kits descritos anteriormente.

IV. Otros anticuerpos que se unen a HMWK escindido

También se proporcionan aquí anticuerpos aislados que se unen tanto a HMWK escindido como a HMWK intacto. En algunas realizaciones, dichos anticuerpos no se unen a LMWK, o se unen a LMWK con baja afinidad. En otras realizaciones, dichos anticuerpos también se unen a LMWK.

30 En algunas realizaciones, los anticuerpos que se unen específicamente a un HMWK escindido y un HMWK intacto (o adicionalmente a LMWK) descritos aquí tienen una afinidad de unión adecuada por uno o más de los antígenos diana. El anticuerpo descrito aquí puede tener una afinidad de unión (K_D) de al menos 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} M, o menor.

35 En la Tabla 2 en el Ejemplo 2 más abajo se proporcionan ejemplos de los anticuerpos indicados anteriormente y sus especificidades de unión. A continuación, se proporcionan las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera, con las regiones CDR identificadas en negrita y subrayadas (determinadas por un esquema como ejemplo):

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-A01 (559B-M0067-E02) (SEQ ID NO: 6)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**LYPMVWVRQAPGKGLEWVS****SIYPSGGFTTYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR**SSRYYYYGMDV**WGQGTTVTVSS

40 >secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-A01 (559B-M0067-E02) (SEQ ID NO: 7)

QYELTQPPMSGTPGQRVTIIS**CGSSSNIGSEYVY**WFQQLPGTAPKLLIY**RNDQREPS**GVPDRFS
 GSKSGTSASLAISGLRSEDETYYC**STWDDTLRTGVFGGGTKVTVL**

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-G05 (559B-M0039-G07) (SEQ ID NO: 8)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS**RYRMRWVRQAPGKGLEWVS****GISPGGGWTYYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTT**DNGDYALAH**WGQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-G05 (559B-M0039-G07) (SEQ ID NO: 9)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC**RASQRIINYLN**WYQQKPGKAPKLLIY**AASSLOS**GVPSRFS
 45 GSGSGTDFTLTISSIQPEDFATYYC**QQSYSAPLT**FGGGTRVEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-A09 (559B-M0044-E09) (SEQ ID NO: 10)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **QYSMGWVRQAPGKGLEWSS** **SIYSSGGSTQYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCAR **TRRGWFGEDYYYYMDV** WGKGT TVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-A09 (559B-M0044-E09) (SEQ ID NO: 11)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRITITC **RASQGIRNDVG** WYQQKPGKAPQRLIY **AASSLQSGVPSRFS**
 GSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCL **QHNSYPLT** FGGGTVKVEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-E01 (559B-M0003-C08) (SEQ ID NO: 12)

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **PYMMWVRQAPGKGLEWSS** **SISPSSGGKTWYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **LGSSSSYYYYYYYYGMDV** WGQGT TVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-E01 (559B-M0003-C08) (SEQ ID NO: 13)

QSALTQSPSASGTPGQRVTISC **SGSSSNIGGNTVN** WYQQFPGTAPKLLIY **SNNQRPS** GVPDRFS
 GSKSGTSASLAISGLQSEDEAIYYC **ASWDDRLN** GHWVFGGGTRLTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-G01 (559B-M0039-H06) (SEQ ID NO: 14)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **AYDMHWVRQAPGKGLEWSS** **SIWPSSGGTYYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **GDYDYGDFTD** AFDIWQGTMVTVSS

10 >secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-G01 (559B-M0039-H06) (SEQ ID NO: 15)

QSALTQSPASVGSPGQSITISC **TGTSSDVGSYNLVS** WYQQHPGKAPKLMIIY **EGSKRPS** GVPDRF
 SGSKSGNTASLIISGLQAEDEADYYC **CSYAGSYSYV** FGTGTRTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-E05 (559B-M0039-D08) (SEQ ID NO: 16)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYAMQWVRQAPGKGLEWSS** **WIYSSGGPTYYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **GLPGQPFDY** WGQGT LTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-E05 (559B-M0039-D08) (SEQ ID NO: 17)

15 QSELTQPPSASGTPGQRVTISC **SGSSSNIGNNYYV** WYQQFPGTAPKLLIY **RNNQRPS** GVPDRFS
 GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC **ATWDDRLSGWV** FGGGTVLTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-A11 (559B-M0068-C07) (SEQ ID NO: 18)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **SYQMHWVRQAPGKGLEWSS** **GIYSSGGSTPYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **GHHGMDV** WGQGT TVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-A11 (559B-M0068-C07) (SEQ ID NO: 19)

QDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC **RASQGISSWLA** WYQQKPGKAPKLLIY **AASNLQSGVPSRFS**
 GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC **QKYNIA** PYTF GQGTVKLEIK

20 >secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-A03 (559B-M0021-G11) (SEQ ID NO: 20)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **PYPMTWVRQAPGKGLEWSS** **GISSSSGGTPYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **MVRGVIA** FDIWQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-A03 (559B-M0021-G11) (SEQ ID NO: 21)

QYELTQPPSASGTPGQRVTISC **SGSSSNIGSHYV** F WYQQLPGAAPKLLIY **RNNQRPS** GVPDRFS
 GSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC **ATWDNSL** SAWVFGGGTVLTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-C05 (559B-M0061-G06) (SEQ ID NO: 22)

25 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **KYTMWWVRQAPGKGLEWSS** **VISSSSGGKTYYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **TANRAF** D I WQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-C05 (559B-M0061-G06) (SEQ ID NO: 23)

QDIQMTQSPAALSVSPGERATLSCRASQSVSSDLWYQQKPGQAPRLLIHGASTRATGIPARFS
GSGSGREFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNDWPPLFGPGTKVNK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-A03 (559B-M0036-G12) (SEQ ID NO: 24)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYYMAWVRQAPGKGLEWVGIVPSGGQTGYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTRRGWFGEDYYYYMDVWGKGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-A03 (559B-M0036-G12) (SEQ ID NO: 25)

5 QDIQMTQSPGTLSLSPGERATVSCRASQSVGSTYLWYQHKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF
SGSGSGTDFLTLSLEPEDFAIYYCQHFHTSPPGITFGQGTRLEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-C09 (559B-M0042-E06) (SEQ ID NO: 26)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYKMSWVRQAPGKGLEWVSVISPGGRTYYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTRTSGLDYWGQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-C09 (559B-M0042-E06) (SEQ ID NO: 27)

QSALTQPAVGSPGQSITISCTGTSSDVGGYKYVSWYQQHPGKAPKLVIYEVSNRPSGVSNRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSSTTVVFGGGTKLTVL

10 >secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-E09 (559B-M0070-H10) (SEQ ID NO: 28)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYGMRWVRQAPGKGLEWVSVISPGGKTNYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRPDYYAMDVWGQGTTTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-E09 (559B-M0070-H10) (SEQ ID NO: 29)

QSALTQPPSASGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQKLPGTAPKLLIYNDRRPSGVPDRFS
GSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCAAWDDSLSGPVFGGGTKLTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-E05 (559B-M0068-D01) (SEQ ID NO: 30)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSIYPMSWVRQAPGKGLEWVGISPSSGGKTAYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGQGRAVRGKLYYYGMDVWGQGTTTVSS

15

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-E05 (559B-M0068-D01) (SEQ ID NO: 31)

QSALTQPPSASQTPGQTVTISCSGSSSNIGTNVNWYQQLPGTAPKLLISHHRRPSGVPDRFS
ASKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-C01 (559B-M0004-E08) (SEQ ID NO: 32)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYHMNWVRQAPGKGLEWSSSIYSSGGSTRYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGVRYGMWDVWGQGTTTVSS

20

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-C01 (559B-M0004-E08) (SEQ ID NO: 33)

QDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPDRFS
GSGSGTDFLTLSLEPEDFATYYCQQANSFPITFGQGTRLEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-C01 (559B-M0069-C09) (SEQ ID NO: 34)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSMYDMHWVRQAPGKGLEWSSSISSSGGYTQYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARDRGLIAAAGGFDPWGQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-C01 (559B-M0069-C09) (SEQ ID NO: 35)

25 QDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGIYLWYQQKPGTAPKLLIYAASSLQSGVPDRFS
GSGSGTDFLTLSLEPEDFATYYCQRTYGRPLTFGGGTKVEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-A05 (559B-M0038-F04) (SEQ ID NO: 36)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **KYEMMWVRQAPGKGLEWVS SISPSGGYTMYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHRSKWNDAPFDS WGQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-A05 (559B-M0038-F04) (SEQ ID NO: 37)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRVAITC **RASQSIDTYLNWYQQKPGKAPKLLIY AASKLED** GVPSRFS
 GSGTGTDFTLTIRSLQPEDFASYFC **QQSYSSPGIT** FGPGTKVEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-G05 (559B-M0044-C05) (SEQ ID NO: 38)

5 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **IYQMYWVRQAPGKGLEWVS SIYSSGGRTFYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATRGSWYVGGNEYFQH WGQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-G05 (559B-M0044-C05) (SEQ ID NO: 39)

QSVLTQSPSLSLSPGQTASIPCSGDTLGNKFVSWYQQKPGQSPVLVIYQDTKRPSGIPEFSGS
 NSGNTATLTITGTQAMDEADYYC **QVWDSNSYA** FGPGTKVTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-C11 (559B-M0047-H01) (SEQ ID NO: 40)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **FYMMYWVRQAPGKGLEWVS SISSSGGFTRYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVRLAVAAPDY WGQGTLTVSS

10 >secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-C11 (559B-M0047-H01) (SEQ ID NO: 41)

QSELTQPASVSGSPGQSITISC **IGTSSDIGTYNYVS** WYQQHPGKAPKLMIIY **DVNTRPS** GVSDRF
 SGSKSGNTASLTISGLQAEDADYYC **SSYTTSVTWF** FGGGTTLTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-C03 (559B-M0019-E12) (SEQ ID NO: 42)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **GYNMYWVRQAPGKGLEWVS RISP SGGWTSYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTR **QWMDW** WGQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-C03 (559B-M0019-E12) (SEQ ID NO: 43)

15 QDIQMTQSPSSLSASVGDRVIITC **RASQNITGYLNWYQQKPGKAPNLLIY DASRMNT** GVPSRFR
 GSGSGTDYILTIYKLEPEDITYFC **QHTDDFSVT** FGGGTKVDLK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-A05 (559B-X0004-B05) (SEQ ID NO: 44)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFH **YRMMWVRQAPGKGLEWVSY ISSSGGYTAYADSVK**
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAKRNRAFDI WGQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-A05 (559B-X0004-B05) (SEQ ID NO: 45)

QDIQMTQSPDSLAVSLGERATINC **KSSQSVLYSSNNKNYL** AWYQQKPGQPPKLLIY **WASTRESG**
 VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDEVAVYYC **QQYYSTPLGF** FGQGKLEIK

20 >secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-E11 (559B-M0048-D12) (SEQ ID NO: 46)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **RYQMTWVRQAPGKGLEWVS S IGSSGGFTNYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR **LPANFYYMDV** WGKGITVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-E11 (559B-M0048-D12) (SEQ ID NO: 47)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC **RASQNIYSFLN** WYQQKPGKAPKLLIY **ATSSLQS** GVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISLQPEDFASYYC **QQNYNIPWT** FGQGKLEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-G11 (559B-M0053-G01) (SEQ ID NO: 48)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **WYMMK** WVRQAPGKGLEWVS S **IVP SGGWTTYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT **EGNLWFGEGRADFI** WGQGTMVTVSS

25 >secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-G11 (559B-M0053-G01) (SEQ ID NO: 49)

QDIQMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRF
SGSGSGTDFLTLSRLEPEDFAVYYCQORSNWPPSFGQGTRLDIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-C05 (559B-M0038-H03) (SEQ ID NO: 50)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSKYDMHWVRQAPGKGLEWVSRISSSGGKTEYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEYRYCTANTCSLYGMDVWGRGTTVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-C05 (559B-M0038-H03) (SEQ ID NO: 51)

5 QDIQMTQSPSSLSASVGDRVAITCRTSQGVRSDFAWYQQTPGKAPRRLIYAAFILDNGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPLTFGGGTKVEMK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-E03 (559B-M0017-H08) (SEQ ID NO: 52)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSPYWMHWVRQAPGKGLEWVSVISPGGGTGYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREESRGSGSHEDYWGQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-E03 (559B-M0017-H08) (SEQ ID NO: 53)

QDIQMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRGTGIPARFS
GSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYFCQQYKNWPNLTGGGTKVDIK

10 >secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-E03 (559B-M0035-F05) (SEQ ID NO: 54)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYPMAWVRQAPGKGLEWVSGIVSSGGRTVYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPYDFWSEGAFDIWGQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-E03 (559B-M0035-F05) (SEQ ID NO: 55)

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNFVYWYHQVPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDRFS
GSKSAASASLAISGLRSEDEADYYCAAWDNSLSGFYVFGAGTKVTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-G03 (559B-M0035-H09) (SEQ ID NO: 56)

15 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSWYGMHWVRQAPGKGLEWVSRIGPSGGPTSYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGYYGTGRYFQHWGQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-G03 (559B-M0035-H09) (SEQ ID NO: 57)

QDIQMTQSPDSLSLSPGDRATLSCRASQSVGSDYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
SGSGSGTDFLTLSRLEPEDFAVYYCQORSNWPPTFGGGTKVEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-A07 (559B-M0043-C06) (SEQ ID NO: 58)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMRWVRQAPGKGLEWVSYISSLGGETMYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANGYGRIDYWGQGTLTVSS

20 >secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-A07 (559B-M0043-C06) (SEQ ID NO: 59)

QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRF
SGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTSGSTRVFGTGTRVTVL

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-G01 (559B-M0003-A08) (SEQ ID NO: 60)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYVMRWVRQAPGKGLEWVSSIGSSGGPTYYADSV
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGSGSSHAFDIWGQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-G01 (559B-M0003-A08) (SEQ ID NO: 61)

25 QDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPDRFS
GSGSGTDFLTLSRLEPEDSGTYYCQQYNSFPLTFGGGTKVEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-G09 (559B-M0054-B11) (SEQ ID NO: 62)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **YYGMNWVRQAPGKGLEWVSVISPSGGLTVYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYCATGFAVQHGGGAFDIWGQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-G09 (559B-M0054-B11) (SEQ ID NO: 63)

QDIQMTQSPATLSMSPGERATLSC **RASQSVTTYLA**WYQQKPGQAPRLLIY **DASIRAT**GVPARFS
 GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC **QORTIWPLTF**GGGTKVEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-E07 (559B-M0067-G11) (SEQ ID NO: 64)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **PYEMWVWRQAPGKGLEWSSIVPSGGWTVYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASPSGRGLAFDIWGQGTMVTVSS

5

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-E07 (559B-M0067-G11) (SEQ ID NO: 65)

QDIQMTQSPGTLSLSPGERATLSC **RASQSISSSYLA**WYQQKPGQAPRLLIY **GASSRAT**GVPDFR
 SGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC **LOOKSYPYT**FGQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-C07 (559B-M0065-B10) (SEQ ID NO: 66)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **KYFMTWVWRQAPGKGLEWSSWISSSGGYTNYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGAYYDAFDIWGQGTMVTVSS

10

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-C07 (559B-M0065-B10) (SEQ ID NO: 67)

QDIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC **RASQSIAIFLN**WYQQTPGKPPKLLIY **GASTLOS**GVPSRFS
 GSGSGADFTLTISNQLLEDFTYYC **QQSYSTLYT**FGQGTMVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-C03 (559B-M0037-E08) (SEQ ID NO: 68)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **RYSMSWVWRQAPGKGLEWSSVISSSGGMTYYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYYGNMDVWGKTTVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-C03 (559B-M0037-E08) (SEQ ID NO: 69)

QDIQMTQSPSSLSTSVGDRVITIC **RTSQDISGALA**WYQQKPGKAPRLLIY **GASSLES**GVPSRFS
 GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC **QOFNKYPLT**FGQGTMVTVSS

15

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0049-E01 (559B-M0035-A01) (SEQ ID NO: 70)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **WYTMGWVWRQAPGKGLEWSSYIYPGGYTMYYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCANPYSSGGYWQGTLTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0049-E01 (559B-M0035-A01) (SEQ ID NO: 71)

QDIQMTQSPSLPVTPGEPASISC **RSSQSLLDSNGNYLDWF**LQKPGQSPQLLIYL **GFNRAS**GV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADVGVYYC **MOALQTPYTF**FGQGTMVTVSS

20

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-G03 (559B-M0003-E08) (SEQ ID NO: 72)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **AYLMTWVWRQAPGKGLEWSSGISPSGGITKYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIPNWIYGMWDVWGQGTTVTVSS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-G03 (559B-M0003-E08) (SEQ ID NO: 73)

QSALTQPPSVSPGQTASITC **SGDKLGNKYAS**WYQQKPGQSPVLVIY **QDRRRPS**GIPERFSGS
 NSGNTATLTISGTQAMDEADYYC **QAWDSGVVFGGGTLKTLV**

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-R0048-G07 (559B-M0052-E02) (SEQ ID NO: 74)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS **NYLMLWVWRQAPGKGLEWSSGISPSGGTAYADSV**
KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAKVAYSGSYYYYYMDVWGKTTVTVSS

25

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-R0048-G07 (559B-M0052-E02) (SEQ ID NO: 75)

QDIQMTQSPSSLSAVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOSYTHSITFGQGTRLEIK

>secuencia de aminoácidos de cadena pesada de 559B-M0064-H02 (SEQ ID NO: 76)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYIMGWVRQAPGKGLEWVSSIGSSGVTVYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGGVTVLHAFDIWGQGMVTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKS

>secuencia de aminoácidos de cadena ligera de 559B-M0064-H02 (SEQ ID NO: 77)

5 QSALTQPASVSGSPGQSSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKVPKLIIYEGNKRPSGVPDFR
SGSKAGNTASLTVSGLQAEDEADYYCTAYGGHSRFYVFGTGTKVTVLGQPKANP

10 También dentro del alcance de esta descripción están los equivalentes funcionales de cualquiera de los anticuerpos ejemplares enumerados anteriormente. Tal equivalente funcional puede unirse al mismo epítopo de un HMWK escindido y/o HMWK intacto, o al mismo epítopo de LMWK tal como uno de los anticuerpos ejemplares enumerados anteriormente. En algunas realizaciones, el equivalente funcional compite contra uno de los anticuerpos ejemplares enumerados anteriormente por unirse a un antígeno diana.

15 En algunas realizaciones, el equivalente funcional comprende una cadena V_H que incluye una V_H CDR1, una V_H CDR2, y/o una V_H CDR3 al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idénticas a las V_H CDR correspondientes de uno de los anticuerpos ejemplares enumerados anteriormente. Alternativamente o además, el equivalente funcional comprende una V_L CDR1, una V_L CDR2, y/o una V_L CDR3 al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idénticas al anticuerpo ejemplar como se enumera anteriormente. En algunas realizaciones, el equivalente funcional tiene las mismas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada y/o cadena ligera que uno de los anticuerpos ejemplares enumerados anteriormente.

20 Alternativamente o además, el equivalente funcional comprende una cadena V_H al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idéntica a la cadena V_H de un anticuerpo ejemplar, y/o una cadena V_L al menos 75% (por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idéntica a la cadena V_L del anticuerpo ejemplar.

25 En algunos casos, el equivalente funcional puede contener uno o más (por ejemplo, hasta 5, hasta 3, o hasta 1) mutaciones conservativas en una o más de las CDR de cadena pesada, o una o más de las CDR de cadena ligera en un anticuerpo ejemplar, por ejemplo, en posiciones en las que no es probable que los restos estén implicados en la interacción con un antígeno diana.

Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción anterior, utilizar la presente descripción en su máxima extensión. Por lo tanto, las siguientes realizaciones específicas, deben interpretarse como meramente ilustrativas y no limitantes del resto de la descripción de ninguna manera.

EJEMPLOS

30 Ejemplo 1: Desarrollo de inmunoensayos para la detección específica de HMWK escindido

Inicialmente se desarrolló un cribado de inmunoensayo basado en ELISA para identificar fragmentos Fab en una biblioteca de presentación en fagos que se unían a HMWK escindido o intacto. En general, las condiciones del ensayo se basaron en HMWK biotinilado intacto o escindido inmovilizado en placas de ensayo de 384 pocillos revestidas con estreptavidina, bloqueando usando un amortiguador de bloqueo de seroalbúmina bovina (BSA), y poniendo en contacto el HMWK inmovilizado con Fab mostrado en el fago de un cultivo nocturno en *E. coli* (detectado con anticuerpo anti-M13-HRP).

40 Como se muestra en la FIG. 12, panel A, la selección se dirigió a la obtención de anticuerpos específicos para HMWK de 2 cadenas realizando primero una selección negativa de la biblioteca con una entrada de aproximadamente 1 x 10^{12} fagos contra HMWK de 1 cadena biotinilado inmovilizado sobre perlas magnéticas revestidas con estreptavidina (Dynabeads M280, Thermo Fisher). La biblioteca agotada se puso entonces en contacto con HMWK de 2 cadenas biotinilado inmovilizado sobre perlas magnéticas revestidas con estreptavidina. Las perlas se lavaron extensamente con amortiguador de PBS, y se usaron para infectar *E. coli* para la amplificación de la producción de fagos para completar una ronda de selección. Se realizaron tres rondas de selección antes de cribar colonias de fagos individuales mediante ELISA con HMWK biotinilado de 1 cadena y 2 cadenas inmovilizado sobre placas revestidas con estreptavidina, seguido de la detección con anticuerpo anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y detección de la absorbancia debido a la hidrólisis del sustrato para 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). Los fragmentos Fab recombinantes se expresaron en *E. coli*, y se purificaron mediante cromatografía con proteína A sefarosa (Wassaf et al. Anal. Biochem. (2006) 351: 241-253). La especificidad de cada Fab purificado se determinó revistiendo placas de 384 pocillos y midiendo la unión a HMWK de 1 cadena biotinilado, a HMWK de 2 cadenas biotinilado, o a LMWK biotinilado, seguido de la detección con estreptavidina conjugada con HRP, y detección con

TMB. Estas condiciones de ensayo llevaron a la identificación del aislado 559B-M004-B04, que se une específicamente al HMWK escindido con respecto a HMWK intacto (FIG. 1).

El HMWK inmovilizado también se puso en contacto con una preparación de Fab 559B-M004-B04 en bruto (sin purificar) de un cultivo nocturno en *E. coli*. El Fab unido al HMWK se detectó usando un anticuerpo anti-Fab humano-HRP, pero no dio como resultado una unión específica al HMWK escindido (FIG. 1).

La configuración del inmunoensayo se invirtió inmovilizando pasivamente el fragmento Fab purificado de 559B-M004-B04 en una placa de ensayo de poliestireno de 384 pocillos. El Fab se puso en contacto con HMWK biotinilado, y el HMWK unido se detectó con estreptavidina-HRP. (FIG. 1).

Inesperadamente, la especificidad del Fab 559B-M004-B04 para HMWK escindido se incrementó cuando el amortiguador de bloqueo de BSA se reemplazó por un amortiguador de bloqueo disponible comercialmente, la LowCross Blocking Solution de Candor Biosciences durante los análisis de cribado inicial (FIG. 1). Además, la realización del inmunoensayo usando placas de ensayo de 96 pocillos en lugar de placas de 384 pocillos aumentó aún más la especificidad observada de 559B-M004-B04 para HMWK escindido (FIG. 1).

Los resultados obtenidos usando el aislado 559B-M004-B04 condujeron al desarrollo de un inmunoensayo (ELISA) para la detección de 2-HMWK en muestras (FIG. 12, panel B). Este ensayo también se puede utilizar para evaluar adicionalmente las características de unión de otros fragmentos Fab y anticuerpos. Brevemente, se reviste un Fab sobre una placa de múltiples pocillos durante la noche. Al día siguiente, la placa se lava, y después se bloquea con amortiguador de BSA. Despues de un lavado, las muestras, los estándares, y los controles de calidad diluidos en amortiguador LowCross se añaden a la placa, y tras una incubación posterior y después un lavado, cualquier HMWK de 2 cadenas unido se detecta mediante la adición de anticuerpo de detección polyclonal de oveja anti-HMWK marcado con HRP. Despues de la incubación con el anticuerpo de detección, la placa se lava, y se añade el sustrato TMB a la placa. Despues de una breve incubación, la reacción se detiene con ácido fosfórico. A continuación, se mide la densidad óptica a 450 nm-630 nm.

Ejemplo 2: Evaluación de la especificidad de unión de los clones de Fab usando los inmunoensayos descritos aquí

Se evaluaron treinta y seis clones de Fab purificados (véase la Tabla 2 a continuación) para determinar la unión a HMWK escindido, HMWK intacto, y LMWK, usando el inmunoensayo descrito en el Ejemplo 1. Específicamente, cada uno de los clones de Fab purificados se inmovilizó en placas de ensayo de 96 pocillos a una concentración de 1 µg/l) en un volumen total de 100 µl en PBS, y se incubó durante la noche a 2-8°C. Las placas de ensayo se bloquearon usando amortiguador de bloqueo LowCross. Se añadió HMWK intacto biotinilado, HMWK escindido biotinilado o LMWK biotinilado (1 µg/l cada uno) a cada pocillo en un volumen total de 100 µl, y se incubó durante 2 horas antes de lavar con un amortiguador de lavado. Se añadió estreptavidina marcada con HRP a cada pocillo a una concentración de 100 ng/ml, y la señal se desarrolló utilizando sustrato Ultra TMB. La relación señal/ruido se calculó usando la señal observada tras la adición de la proteína biotinilada a un pocillo sin revestir. (FIG. 2, paneles A y B). En base a los resultados de ELISA, los anticuerpos se pueden dividir en 5 categorías (Tabla 2).

Tabla 2: Características de unión de los fragmentos Fab

Unión de ELISA	Fragmento Fab
Ligante de baja afinidad	559B-M0035-A01, 559B-M0052-E02, 559B-M0003-E08
Se une a HMWK escindido e intacto, no a LMWK	559B-M0067-E02, 559B-M0039-G07, 559B-M0044-E09, 559B-M0003-C08, 559B-M0039-H06, 559B-M0039-D08, 559B-M0068-C07, 559B-M0021-G11, 559B-M0061-G06, 559B-M0036-G12, 559B-M0042-E06, 559B-M0070-H10, 559B-M0068-D01, 559B-M0004-E08
Se une a HMWK escindido e intacto y a LMWK	559B-M0069-C09, 559B-M0038-F04, 559B-M0044-C05, 559B-M0047-H01, 559B-M0019-E12, 559B-X0004-B05, 559B-M0048-D12, 559B-M0053-G01, 559B-M0038-H03, 559B-M0017-H08, 559B-M0035-F05, 559B-M0035-H09, 559B-M0043-C06, 559B-M0003-A08, 559B-M0054-B11, 559B-M0067-G11, 559B-M0065-B10, 559B-M0064-H02
Se une principalmente a LMWK	559B-M0037-E08
Se une específicamente a HMWK escindido	559B-M0004-B04

Se obtuvieron varios anticuerpos que se unieron tanto a HMWK de 1 cadena y de 2 cadenas como a LMWK, tal como 559B-M0064-H02. Es probable que estos anticuerpos se unan a un epítopo en los dominios 1 a 4, que se comparten entre HMWK y LMWK. M070-H10 es un ejemplo de un anticuerpo que se supone que se une a un epítopo compartido entre HMWK de 1 cadena y de 2 cadenas, pero no en LMWK. LMWK es una variante de ayuste de cininógeno que

conduce a una proteína truncada compuesta por los dominios 1 a 4 y parte del dominio 5 (Colman et al. *Blood* (1997) 90: 3819-3843). En consecuencia, es probable que anticuerpos tal como M070-H10 se unan al dominio 5 o al dominio 6.

Como se muestra en la FIG. 14, panel A, 559B-M0004-B04 exhibió selectividad para HMWK de 2 cadenas por encima de tanto HMWK de 1 cadena como LMWK, y se seleccionó para una optimización del ensayo adicional. Se desarrolló un ELISA de tipo sándwich para detectar HMWK escindido en muestras de plasma humano en las que se inmovilizó pasivamente 559B-M0004-B04 (100 μ l de 2 μ g/ml) en una placa de 96 pocillos (placa Nunc Maxisorp) (FIG. 12, panel B). Al día siguiente, la placa se lavó, y después se bloqueó con BSA al 2% (sin proteasa/IgG) en amortiguador de PBS. Después de un lavado, las muestras que contenían HMWK escindido en amortiguador de BSA al 0,1% en PBS con Tween-20 al 0,05% (amortiguador de ensayo de HMWK de 2 cadenas). Estándares de proteína purificada (por ejemplo, HMWK de 2 cadenas, HMWK intacto, o LMWK) se añadieron a plasma deficiente en HNKW HMWK, y se diluyeron 1:320 en amortiguador de ensayo de HMWK de 2 cadenas. Después del lavado de la placa con PBST, se añadió una mezcla de 2 anticuerpos monoclonales de ratón (11H05 y 13B12) a 1 μ g/ml en amortiguador de ensayo de HMWK de 2 cadenas durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos de detección no unidos se lavaron, y se añadió una dilución 1:2000 de anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). El ensayo que contenía el anticuerpo secundario se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, y el anticuerpo secundario no unido se eliminó lavando con amortiguador de ensayo de HMWK de 2 cadenas. La señal se detectó mediante la adición de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), un sustrato de HRP. La reacción se detuvo con ácido fosfórico. La hidrólisis de un sustrato TMB se detectó usando un lector de microplacas a 450 nm-630 nm (FIG. 3). Además, realizar el ensayo ELISA usando muestras que contienen HMWK escindido en amortiguador de ensayo de HMWK de 2 cadenas o plasma deficiente en HMWK, y analizarlas en presencia de plasma al 2,5% o al 10%, dio como resultado una unión similar (FIG. 4). Usando estas condiciones de inmunoensayo, se detectó la unión específica a HMWK escindido. El ensayo dio como resultado un comportamiento comparable cuando se proporcionó HMWK en amortiguador de ensayo de HMWK de 2 cadenas o en plasma deficiente en HMWK (FIGs. 3 y 4). Además, no hubo unión de 559B-M0004-B04 a LMWK.

El ensayo ELISA se evaluó para la detección de HMWK escindido generado tras la activación del sistema de contacto en plasma humano (FIGs. 5A y 5B). La cantidad de HMWK escindido en plasma humano normal se midió en ausencia o presencia de una cantidad catalítica de FXIIa, pKal, o ácido elágico, que provoca la autoactivación de FXII a FXIIa y la generación consiguiente de HMWK escindido (FIGs. 5, paneles A y B). De acuerdo con el papel de la calicreína plasmática como la enzima plasmática primaria requerida para la generación de HMWK de 2 cadenas, ni la adición de ácido elágico ni de FXIIa conducen a la generación de HMWK escindido en plasma deficiente en precalicreína. El sistema de contacto en plasma deficiente en FXI se activó igualmente usando FXIIa, pKal o ácido elágico; un resultado consistente con la comprensión de que FXIa es generado por FXIIa y no produce HMWK de 2 cadenas.

Los resultados del ELISA de HMWK de 2 cadenas se corroboraron detectando el HMWK escindido generado tras la activación del sistema de contacto en plasma humano mediante análisis de transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal de ratón, 11H05 (FIG. 10). El anticuerpo 11H05 se une específicamente a la cadena ligera de HMWK, e ilumina tanto la cadena ligera de 56 kDa como la cadena ligera proteolizada adicional de 46 kDa, que posteriormente se genera a través de la actividad proteolítica de la calicreína plasmática en un sitio cerca del término N de la cadena ligera de HMWK (Colman et al. *Blood* (1997) 90: 3819-3843).

También se evaluó la capacidad del ensayo ELISA para detectar HMWK escindido generado en plasma de 12 donantes normales (FIG. 6). Después de la activación con ácido elágico del sistema de activación de contacto, se detectó HMWK escindido en cada una de las 12 muestras. La cantidad de HMWK escindido también se midió después de que se inhibiera el sistema de activación de contacto en el plasma normal usando diversas concentraciones de lanadelumab (DX-2930; un inhibidor específico de la calicreína plasmática) o un inhibidor de la serpina CI-INH, activado entonces con ácido elágico (FIG. 7, paneles A y B). Lanadelumab (DX-2930) es un anticuerpo completamente humano potente ($K_i = 0,12$ nM) y un inhibidor específico de la calicreína plasmática que se descubrió utilizando fagos, y está en desarrollo clínico para el tratamiento profiláctico de los ataques de HAE-C1INH (Chyung et al. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* (2014) 113: 460-466; Kenniston et al. *J. Biol. Chem.* (1994) 269: 23596-23608). Cuando se añadió lanadelumab en plasma citrado a diferentes concentraciones, inhibió eficazmente la generación de HMWK de 2 cadenas inducida por FXIIa, como se muestra mediante transferencia Western y ELISA de tipo sándwich (FIG. 7B). La IC_{50} para la inhibición por lanadelumab de la generación de HMWK de 2 cadenas fue de 212 ± 28 nM, lo que es consistente con el valor esperado para la activación de toda la precalicreína en plasma puro (aproximadamente 500 nM). La inhibición completa de la señal por lanadelumab en plasma tratado con un activador del sistema de contacto confirma que M004-B04 es específico para HMWK de 2 cadenas generado por calicreína plasmática.

La activación del sistema de contacto en plasma deficiente en cininógeno no produjo un aumento en la señal de ELISA en este ensayo preliminar usando M004-B04 como el anticuerpo de captura y un anti-cininógeno políclonal de oveja conjugado con HRP como el anticuerpo de detección (datos no mostrados).

También es evidente a partir de la FIG. 10 que el plasma recogido de un sujeto sano usando EDTA como anticoagulante se activó de forma similar al plasma citrado, apoyando la observación de que los iones metálicos no son necesarios para la activación del sistema de contacto (Colman et al. *Blood* (1997) 90: 3819-3843). Sin embargo, HMWK de 2 cadenas no se detectó mediante ELISA en plasma con EDTA (FIG. 5B), lo que sugiere que la unión del

anticuerpo M004-B04 al HMWK de 2 cadenas depende de un ión metálico. Se identificó previamente un sitio de unión de cinc en HMWK en el dominio 5 (aminoácidos 479-498) de la cadena ligera, y se demostró que media las interacciones del cininógeno con los receptores de la superficie de células endoteliales gC1qR, la citoqueratina 1, y el receptor del activador del plasminógeno de tipo urocinasa, y de ese modo potencia la activación del sistema de contacto (Kaplan et al. Adv. Immunol. (2014) 121: 41-89; Bjorkqvist et al. Biol. Chem. (2013) 394: 1195-1204). Se evaluó la adición de ZnCl₂ al amortiguador de ensayo a diversas concentraciones, y se encontró que potencia la unión del anticuerpo a HMWK escindido (FIG. 11). Se investigó el aumento de las concentraciones de ZnCl₂ en la señal de ELISA observada con plasma citrado y con EDTA activado por ácido elágico. La señal de ELISA en plasma con EDTA aumentó a un máximo aparente a concentraciones de ZnCl₂ por encima de 400 μM (en concentración de pocillo).

Se demostró previamente, usando microscopía electrónica, que la unión de HMWK de 1 cadena a cinc promueve una estructura cuaternaria más compacta y esférica (Herwald et al. Eur J. Biochem. (2001) 268: 396-404). También se demostró mediante microscopía electrónica que HMWK de 2 cadenas adopta una estructura cuaternaria más alargada y menos esférica que HMWK de 1 cadena en un amortiguador que contiene EDTA (Herwald et al. Eur J. Biochem. (2001) 268: 396-404). Aunque el efecto del cinc en la estructura de HMWK de 2 cadenas no se dio a conocer previamente, la unión aparente dependiente de cinc de M004-B04 descrito aquí sugiere que HMWK de 2 cadenas existe en una conformación única en presencia de cinc.

La concentración de EDTA en el plasma recogido en tubos con K2EDTA revestidos por pulverización comercialmente disponibles es aproximadamente 4 mM, que después de una dilución 1:20 se convierte en una concentración en el pocillo de aproximadamente 200 μM y es coherente con la restauración de la unión dependiente del cinc tras la adición de suficiente ZnCl₂ para superar la capacidad quelante del EDTA. Por el contrario, la señal de ELISA del plasma citrado activado usando ácido elágico no aumentó en presencia de ZnCl₂ 25 o 50 μM (concentraciones en el pocillo), pero a concentraciones de ZnCl₂ superiores a 100 μM, la señal de ELISA aumentó a un máximo por encima de 200 μM de ZnCl₂ (FIG. 11). La concentración normal de cinc en el plasma de voluntarios sanos es 10-17 μM (Wessells et al. J. Nutr. (2014) 144: 1204-1210). Dado que la señal de ELISA observada en plasma citrado activado solo aumentó cuando las concentraciones de ZnCl₂ en pocillos > 50 μM, que equivaldría a concentraciones en plasma > 1 mM, parece que el ELISA no es susceptible a fluctuaciones fisiológicas en la concentración de cinc en el plasma. En consecuencia, los experimentos posteriores no añadieron ZnCl₂ al amortiguador de ensayo.

Como se describió anteriormente, la unión de 559B-M004-B04 a HMWK de 2 cadenas se mejoró mediante concentraciones suprafisiológicas de ZnCl₂, y se inhibió por la quelación de metales con altas concentraciones de EDTA. Se ha descrito un sitio de unión de cinc en el dominio de HMWK de 2 cadenas, y se demostró que un péptido sintético que abarca este sitio (HKh20, HKhGHGHGKhKNKGKNGKh (SEQ ID NO: 83) inhibe la activación del sistema de contacto mediante una atenuación de la asociación de la superficie celular (Nakazawa et al. Int. Immunopharmacol. (2002) 2: 1875-1885). En consecuencia, el péptido HKh20, así como el péptido GCP28 correspondiente a las secuencias en el dominio 3, se ensayaron para determinar su capacidad para inhibir la unión de HMWK de 2 cadenas a 559B-M004-B04 mediante ELISA. Como se muestra en la FIG. 15, el péptido HKh20, pero no el péptido GCP28, inhibe la unión de HMWK de 2 cadenas a M004-B04, lo que sugiere que el epítopo de M004-B04 podría residir dentro del dominio 5 en la vecindad del sitio de unión de cinc. Para realizar el ensayo, los péptidos de cininógeno se diluyeron hasta 250 μg/ml, y se dejaron preincubar en la placa de ensayo. Después, HMWK de 2 cadenas purificado, en plasma humano deficiente, se diluyó 160, y después se añadió a la placa.

La dependencia del tiempo de la generación de HMWK escindido en plasma humano normal citrado se evaluó en diversos puntos de tiempo después de la activación del sistema de activación de contacto con ácido elágico o FXIIa (FIG. 8). Finalmente, el ensayo ELISA se utilizó para evaluar la presencia y la cantidad de HMWK escindido en muestras de plasma de pacientes con angioedema hereditario (HAE) en comparación con muestras de plasma citrado de pacientes normales (sin HAE). Se encontró que las muestras de pacientes con HAE contenían niveles elevados de HMWK de 2 cadenas (1423 ± 603 ng/ml) con respecto a las muestras de donantes normales (432,4 ± 186 ng/ml) (FIG. 9), que son estadísticamente diferentes (P = 0,017) mediante análisis ANOVA de una vía.

Habiendo determinado que M004-B04 se une específicamente a un neoepítopo en HMWK de 2 cadenas que no está presente en HMWK de 1 cadena o LMWK, y demostrando que la unión del anticuerpo depende de la actividad de calicreína plasmática, el ensayo también se realizó utilizando un par de anticuerpos monoclonales de ratón (11H05 y 13B12) para la detección (FIG. 16). El anticuerpo 13B12 parece unirse a la cadena pesada de HMWK, y 11H05 parece unirse a la cadena ligera de HMWK; la combinación de ambos anticuerpos para la detección dio como resultado un refuerzo de señal, posiblemente debido a sus epítopos de unión no solapantes en el antígeno.

La importancia de la recogida de plasma en la evaluación del sistema de contacto se ha descrito previamente (Suffritti et al. Clin. Exp. Allergy (2014) 44: 1503-1514). Es bien sabido que el contacto del plasma con vidrio u otras superficies polares da como resultado una extensa activación *ex vivo* del sistema de contacto que puede enmascarar la determinación precisa de la activación endógena del sistema de contacto (Colman et al. Blood (1997) 90: 3819-3843). Se comparó la capacidad del ELISA de tipo sándwich optimizado para detectar HMWK de 2 cadenas en diferentes tipos de plasma, incluyendo un plasma personalizado que contiene una mezcla de inhibidores de proteasas en ácido-citrato-dextrosa en un tubo de plástico de extracción de sangre a vacío denominado SCAT169 (HTI, Essex Vt). Como se muestra en la FIG. 6, la curva estándar preparada en plasma SCAT169 es menos sensible que la curva preparada

en plasma citrado, probablemente debido a la inclusión de EDTA 2 mM en el plasma recogido. A la dilución de plasma utilizada en este ensayo (1:320), esta concentración de EDTA (3,1 μ M) no interfiere significativamente con el HMWK de 2 cadenas, y puede ayudar a estabilizar el plasma de la degradación proteolítica debida a metaloproteasas.

5 El plasma citrado y SCAT169 de voluntarios sanos se comparó con muestras de pacientes con HAE mediante transferencia Western y el ensayo ELISA de tipo sándwich. En la FIG. 17, paneles A-C, el método de transferencia Western para detectar HMWK de 2 cadenas (es decir, cininógeno escindido) en plasma citrado fue capaz de diferenciar muestras de pacientes con HAE de voluntarios sanos (HV), como se muestra mediante análisis de características del operador del receptor (ROC) con un valor de área bajo la curva (AUC) de 0,977 para la comparación de basal con HV, o 1,0 para la comparación de ataque con HV. Las muestras de plasma citrado de pacientes con HAE durante la inactividad (basal) se diferenciaron de las muestras de ataque con un AUC de 0,625 (FIG. 17, panel D).

10 Como se muestra en la FIG. 18, paneles A-C, el método de transferencia Western para detectar HMWK de 2 cadenas en plasma SCAT169 fue capaz de diferenciar muestras de pacientes con HAE de muestras de voluntarios sanos (HV), como se muestra mediante análisis de ROC con un valor de AUC de 0,915 para la comparación de basal con HV, o 0,967 para la comparación de ataque con HV. Las muestras de SCAT169 de pacientes con HAE durante la inactividad (basal) se diferenciaron de las muestras de ataque con un AUC de 0,597 (FIG. 18, panel D).

15 20 En la FIG. 19, paneles A-C, el método de ELISA de 2 cadenas para detectar HMWK de 2 cadenas en plasma citrado fue capaz de diferenciar muestras de pacientes con HAE de voluntarios sanos, como se muestra mediante análisis de ROC con un valor de AUC de 0,915 para la comparación de basal con HV, o 0,866 para la comparación de ataque con HV. Las muestras de plasma citrado de pacientes con HAE durante la inactividad (basal) se diferenciaron de las muestras de ataque con un AUC de 0,709 (FIG. 19, panel D).

25 Como se muestra en la FIG. 20, paneles A-C, el método de ELISA de 2 cadenas para detectar HMWK de 2 cadenas en muestras SCAT169 fue capaz de diferenciar muestras de pacientes con HAE de voluntarios sanos, como se muestra mediante análisis de ROC con un valor de AUC de 0,999 para la comparación de basal con HV, o 1,0 para la comparación de ataque con HV. Las muestras de plasma citrado de pacientes con HAE durante la inactividad (basal) se diferenciaron de las muestras de ataque con un AUC de 0,8176 (FIG. 20, panel D).

30 Para el análisis de ROC anterior, tanto la transferencia Western de HMWK de 2 cadenas como el ELISA de HMWK de 2 cadenas que se muestran aquí pueden ser útiles para diferenciar a los pacientes que tienen o están en riesgo de tener HAE en función de los niveles de cininógeno escindido en plasma, en comparación con voluntarios sanos. La presencia de inhibidores de proteasas en plasma SCAT169 redujo la activación *ex vivo* del plasma durante la recogida de sangre.

OTRAS REALIZACIONES

35 Todas las características descritas en esta memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica descrita en esta memoria descriptiva puede ser reemplazada por una característica alternativa que tenga el mismo fin, equivalente, o similar. De este modo, a menos que se indique expresamente lo contrario, cada característica descrita es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

EQUIVALENTES Y ALCANCE

40 Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar, utilizando únicamente experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la presente descripción descrita aquí. No se pretende que el alcance de la presente descripción se limite a la descripción anterior, sino que es como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

45 En las reivindicaciones, artículos tales como "un", "una", y "el/la" pueden significar uno o más de uno, a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto. Las afirmaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechas si uno, más de uno, o todos el grupo de miembros está presente en, se emplea en, o es de otro modo relevante para un producto o procedimiento dado, a menos que se indique lo contrario, o sea, evidente de otro modo a partir del contexto. La presente descripción incluye realizaciones en las que exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en, o es de otro modo relevante para un producto o procedimiento dado. La presente descripción incluye realizaciones en las que más de uno, o todo el grupo de miembros, están presentes en, se emplean en, o son de otro modo relevantes para un producto o procedimiento dado.

50 55 Además, la presente descripción abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, y términos descriptivos de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que dependa de otra reivindicación puede modificarse para incluir una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Cuando los elementos se presentan como listas, por ejemplo, en el formato de grupo de Markush, también se describe cada subgrupo de los elementos, y cualquier elemento o elementos se pueden eliminar del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando se hace referencia a la presente descripción, o aspectos de la presente descripción, como que comprenden elementos y/o características particulares, ciertas realizaciones de la presente

descripción o aspectos de la presente descripción consisten, o consisten esencialmente en dichos elementos y/o características. Por motivos de simplicidad, esas realizaciones no se han expuesto específicamente aquí en este documento. También se observa que las expresiones "que comprende" y "que contiene" están destinadas a ser abiertas, y permiten la inclusión de elementos o etapas adicionales. Cuando se dan intervalos, se incluyen los puntos

5 finales. Además, a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otro modo a partir del contexto y comprensión de un experto en la técnica, los valores que se expresan como intervalos pueden asumir en diferentes realizaciones de la presente descripción cualquier valor o subintervalo específico dentro de los intervalos establecidos, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior del intervalo, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

10 Cualquier realización particular de la presente descripción que se encuentre dentro de la técnica anterior puede excluirse explícitamente de una cualquiera o más de las reivindicaciones. Debido a que se considera que tales realizaciones son conocidas por un experto en la técnica, pueden excluirse incluso si la exclusión no se establece explícitamente aquí. Cualquier realización particular de la presente descripción puede excluirse de cualquier reivindicación, por cualquier motivo, relacionado o no con la existencia de la técnica anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 15 <110> Dyax Corp.
<120> INMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE CININÓGENO DE ALTO PESO MOLECULAR
ESCINDIDO
<130> D0617.70113WO00
<140> Aún no cedida
20 <141> Concurrentemente con ésta
<150> US 62/335,311
<151> 2016-05-12
<150> US 62/243,505
<151> 2015-10-19
25 <160> 83
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 644
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens

ES 2 857 552 T3

<400> 1
Met Lys Leu Ile Thr Ile Leu Phe Leu Cys Ser Arg Leu Leu Leu Ser
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 857 552 T3

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

ES 2 857 552 T3

385	390	395	400	
Thr Val Ser Pro Pro His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu				
	405	410	415	
Arg Asp Ser Gly Lys Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly				
	420	425	430	
His Glu Lys Gln Arg Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu				
	435	440	445	
Arg Asp Gln Gly His Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly				
	450	455	460	
His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp				
	465	470	475	480
Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys				
	485	490	495	
His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys				
	500	505	510	
Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys Thr Glu His Leu Ala Ser Ser Ser				
	515	520	525	
Glu Asp Ser Thr Thr Pro Ser Ala Gln Thr Gln Glu Lys Thr Glu Gly				
	530	535	540	
Pro Thr Pro Ile Pro Ser Leu Ala Lys Pro Gly Val Thr Val Thr Phe				
	545	550	555	560
Ser Asp Phe Gln Asp Ser Asp Leu Ile Ala Thr Met Met Pro Pro Ile				
	565	570	575	
Ser Pro Ala Pro Ile Gln Ser Asp Asp Asp Trp Ile Pro Asp Ile Gln				
	580	585	590	
Ile Asp Pro Asn Gly Leu Ser Phe Asn Pro Ile Ser Asp Phe Pro Asp				
	595	600	605	
Thr Thr Ser Pro Lys Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu				
	610	615	620	
Ile Asn Pro Thr Thr Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr				
	625	630	635	640
Asp Gly Leu Ser				
<210> 2				
<211> 362				
<212> PRT				
<213> Homo sapiens				

ES 2 857 552 T3

<400> 2
Gln Glu Ser Gln Ser Glu Glu Ile Asp Cys Asn Asp Lys Asp Leu Phe
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 857 552 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro
1 5 10 15

His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys
20 25 30

Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg
35 40 45

Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His
50 55 60

ES 2 857 552 T3

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 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
210 215 220 240

Cys Pro Gly Arg Pro Trp Lys Ser Val Ser Glu Ile Asn Pro Thr Thr
225 230 235 240

Gln Met Lys Glu Ser Tyr Tyr Phe Asp Leu Thr Asp Gly Leu Ser
245 250 255

<210> 4

<211> 123

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 4

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr

ES 2 857 552 T3

20

25

30

Val Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Asn Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Lys Leu Phe Tyr Tyr Asp Asp Thr Lys Gly Tyr Phe Asp Phe
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 5

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Leu Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Arg Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 6

<211> 120

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 6
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Pro Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Phe Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Ser Arg Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7

<211> 110

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 7

Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Met Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Glu
20 25 30

10 Tyr Val Tyr Trp Phe Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Thr Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Trp Asp Asp Thr Leu
85 90 95

Arg Thr Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 8

<211> 118

ES 2 857 552 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 8

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Arg Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Asp Asn Gly Asp Tyr Ala Leu Ala His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 9
Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 125

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 10
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ser Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Arg Arg Gly Trp Phe Gly Glu Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 11

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 11

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

<210> 12

<211> 126

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 12
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Tyr
20 25 30

Met Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Lys Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Gly Ser Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 13

<211> 111

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 13

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
65 70 75 80

10 Ser Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Arg Leu
85 90 95

Asn Gly His Trp Val Phe Gly Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 14

<211> 123

ES 2 857 552 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 14

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Trp Pro Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Asp Tyr Gly Asp Phe Thr Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

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

<210> 15

<211> 110

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 15

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

15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Gly Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Tyr Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
100 105 110

ES 2 857 552 T3

<210> 16
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 16
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Trp Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Leu Pro Gly Gln Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

10 115

<210> 17
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 17
Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Arg Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 18

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

10 Gln Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly His His Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 108

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 857 552 T3

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 19

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

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

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ile Ala Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 20

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> Polipéptido Sintético

<400> 20

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Tyr
20 25 30

Pro Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Gly Phe Thr Pro Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Met Val Arg Gly Val Ile Lys Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 857 552 T3

<210> 21
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 21
Gln Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser His
20 25 30

Tyr Val Phe Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Ala Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asn Ser Leu
85 90 95

10 Ser Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

<210> 22
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 22
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Thr Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Ser Gly Gly Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Thr Ala Asn Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 23

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

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

Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile His Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asp Trp Pro
85 90 95

Pro Leu Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asn Ile Lys
100 105

10 <210> 24

<211> 125

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 857 552 T3

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 24

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Tyr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Val Pro Ser Gly Gly Gln Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

5 Ala Arg Thr Arg Arg Gly Trp Phe Gly Glu Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Met
100 105 110

Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 25

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

Gly Glu Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser
20 25 30

Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln His Phe His Thr Ser
85 90 95

Pro Pro Gly Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

15

<210> 26

<211> 118

ES 2 857 552 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 26

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

Lys Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Thr Ser Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

10

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

15

<400> 27

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Lys Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Val Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
85 90 95

Thr Thr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

ES 2 857 552 T3

<210> 28
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 28
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Gly Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Lys Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Arg Pro Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 29
<211> 110
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

15 <400> 29
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Lys Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asn Asp Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 30

<211> 126

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 30

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
 20 25 30

Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Lys Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gln Gly Arg Ala Val Arg Gly Lys Leu Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110

10 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 31

<211> 110

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 31
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gln Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Asn Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Ser Ser His His Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 32

<211> 117

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 32
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
 20 25 30

His Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Val Arg Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 33

<211> 108

15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 857 552 T3

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 33

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

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

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
85 90 95

Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 34

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> Polipéptido Sintético

<400> 34

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Met Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Leu Ile Ala Ala Gly Gly Phe Asp Pro Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

15

<210> 35

<211> 108

ES 2 857 552 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 35

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

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

Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Thr
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Thr Tyr Gly Arg Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

10

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

15

<400> 36

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Glu Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Ser Lys Trp Asn Asp Ala Pro Phe Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

ES 2 857 552 T3

<210> 37
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 37
Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Arg Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Ser Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ser Pro
85 90 95

10 Gly Ile Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 38
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 38
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr
20 25 30

Gln Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Arg Gly Ser Trp Tyr Val Gly Gly Asn Glu Tyr Phe Gln His
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 39

Gln Ser Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Thr Ala Ser Ile Pro Cys Ser Gly Asp Thr Leu Gly Asn Lys Phe Val
20 25 30

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Thr Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Asn Ser Tyr Ala
85 90 95

10 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 857 552 T3

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 40

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Met Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Gly Gly Phe Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

5

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Val Arg Gly Leu Ala Val Ala Ala Pro Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 110

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 41

Gln Ser Glu Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Ile Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Thr Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Thr Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Thr Ser
85 90 95

Val Thr Trp Val Phe Gly Gly Thr Thr Leu Thr Val Leu
100 105 110

15

<210> 42

<211> 115

ES 2 857 552 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 42

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asn Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Gly Gln Trp Met Asp Trp Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 108

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 43

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

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

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Arg Met Asn Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg
50 55 60

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

15 Pro Glu Asp Ile Gly Thr Tyr Phe Cys Gln His Thr Asp Asp Phe Ser
85 90 95

Val Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Asp Leu Lys
100 105

ES 2 857 552 T3

<210> 44
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 44
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Tyr Arg
20 25 30

Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
35 40 45

Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Ala Lys Arg Asn Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

10 <210> 45
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

15 <400> 45
Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu

ES 2 857 552 T3

1	5	10	15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr 20 25 30			
Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly 35 40 45			
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly 50 55 60			
Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu 65 70 75 80			
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln 85 90 95			
Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Gly Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu 100 105 110			
Ile Lys			
<210> 46 <211> 120 5 <212> PRT <213> Secuencia Artificial <220> <223> Polipéptido Sintético			
<400> 46 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr 20 25 30			
Gln Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45			
Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Phe Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60			
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80			
10 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95			
Ala Arg Leu Pro Ala Asn Phe Tyr Tyr Tyr Met Asp Val Trp Gly Lys 100 105 110			
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser 115 120			
<210> 47 <211> 108			

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 47

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

<210> 48

<211> 123

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 48

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr

ES 2 857 552 T3

20

25

30

Met Met Lys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Val Pro Ser Gly Gly Trp Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Thr Glu Gly Asn Leu Trp Phe Gly Glu Gly Arg Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

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

<210> 49

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 49

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

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

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
 65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
 85 90 95

Pro Pro Ser Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Lys
 100 105

<210> 50

<211> 126

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 15

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 50
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Ser Ser Ser Gly Gly Lys Thr Glu Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Arg Tyr Cys Thr Ala Asn Thr Cys Ser Leu Tyr Gly
100 105 110

Met Asp Val Trp Gly Arg Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 51

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 51

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

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

10 Asp Phe Ala Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Arg Arg Leu
35 40 45

Ile Tyr Ala Ala Phe Ile Leu Asp Asn Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Met Lys
100 105

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 52

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

<210> 53

<211> 109

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 53
 Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro
 1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Gly Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Lys Asn Trp Pro
 85 90 95

Asn Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 54

<211> 122

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 54
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
 20 25 30

Pro Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Val Ser Ser Gly Gly Arg Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

10

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro Tyr Asp Phe Trp Ser Glu Gly Ala Phe Asp Ile Trp
 100 105 110

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

<210> 55

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 55
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Phe Val Tyr Trp Tyr His Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Ala Ala Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asn Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Phe Tyr Val Phe Gly Ala Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 56

<211> 120

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 56
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Gly Pro Ser Gly Gly Pro Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Thr Gly Arg Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 57

<211> 109

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 57

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

Gly Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser
20 25 30

Asp Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

10 Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp
85 90 95

Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 58

<211> 116

ES 2 857 552 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 58

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ala Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Glu Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Gly Tyr Gly Arg Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 59

<211> 110

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 59

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

15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

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

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Gly
85 90 95

Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
100 105 110

ES 2 857 552 T3

<210> 60
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 60
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Val Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Gly Pro Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Gly Gly Ser Gly Ser Ser His Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

10 115 120

<210> 61
<211> 108
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 61
Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Ser Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 62

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 62
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

10

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Pro Ser Gly Gly Leu Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Gly Phe Ala Val Gln His Gly Gly Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

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

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

15

<213> Secuencia Artificial

ES 2 857 552 T3

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 63

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

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

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

Ile Tyr Asp Ala Ser Ile Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Ile Trp Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 64

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> Polipéptido Sintético

<400> 64

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Tyr
20 25 30

Glu Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Val Pro Ser Gly Gly Trp Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Pro Ser Gly Arg Gly Leu Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

ES 2 857 552 T3

<210> 65
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 65
Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

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

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Gln Lys Ser Tyr
85 90 95

10 Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 119
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<400> 66
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20 25 30

Phe Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Trp Ile Ser Ser Ser Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ala Tyr Tyr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 67

<211> 108

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 67

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

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

Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu Gln
 65 70 75 80

Leu Glu Asp Phe Thr Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Leu
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 68

<211> 117

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 857 552 T3

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 68

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Ser Gly Gly Met Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

5 Ala Arg Asp Tyr Tyr Gly Asn Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 108

<212> PRT

10

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 69

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp Ile Ser Gly
20 25 30

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

Ile Phe Gly Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Lys Tyr Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

15

<210> 70

<211> 116

ES 2 857 552 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 70

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Tyr
20 25 30

Thr Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Tyr Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Tyr Thr Met Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Asn Pro Tyr Ser Ser Gly Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 71

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

10

<400> 71

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

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp
20 25 30

Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Phe Asn Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

ES 2 857 552 T3

5 Thr

<210> 72

<211> 120

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 72

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr

20

25

30

Leu Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Asp Ile Pro Asn Trp Ile Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln

100

105

110

10 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

120

15 <210> 73

<211> 105

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 73

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln

1

5

10

15

Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Lys Leu Gly Asn Lys Tyr Ala

20

25

30

ES 2 857 552 T3

Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
35 40 45

Gln Asp Arg Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gly Val Val Phe
85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 74

<211> 124

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 74

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Leu Met Leu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gly Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Val Ala Tyr Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Met Asp
100 105 110

10 Val Trp Gly Lys Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 75

<211> 109

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 75
 Gln Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr His
 85 90 95

Ser Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 76

<211> 137

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 76
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Ile Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

10 Ser Ser Ile Gly Ser Ser Gly Val Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Gly Gly Gly Val Thr Val Leu His Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135

<210> 77
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<400> 77
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
 35 40 45

Ile Ile Tyr Glu Gly Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ala Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ala Tyr Gly Gly His
 85 90 95

Ser Arg Phe Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln Pro Lys Ala Asn Pro
 115

10 <210> 78
 <211> 304
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 857 552 T3

<400> 78
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 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
145 150 155 160

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

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

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

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

ES 2 857 552 T3

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

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

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

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

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

<210> 79

<211> 58

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

10 <210> 80

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

15 <400> 80

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

20 <210> 81

<211> 122

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

ES 2 857 552 T3

<400> 81
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
20 25 30

Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Tyr Ser Ser Gly Gly Ile Thr Val Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Tyr Arg Arg Ile Gly Val Pro Arg Arg Asp Glu Phe Asp Ile Trp
100 105 110

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

<210> 82

<211> 105

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

<400> 82

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105

<210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5

<400> 83

His Lys His Gly His Gly His Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys
1 5 10 15

Asn Gly Lys His
20

REIVINDICACIONES

1. Un método de inmunoensayo para detectar un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, comprendiendo el método:

5 (i) proporcionar un elemento de soporte, sobre el cual se inmoviliza un primer agente que se une específicamente a un HMWK escindido;

(ii) poner en contacto el elemento de soporte de (i) con una muestra biológica sospechosa de contener un HMWK escindido;

(iii) poner en contacto el elemento de soporte obtenido en (ii) con un segundo agente que se une a HMWK, en el que el segundo agente está conjugado con un marcador; y

10 (iv) detectar una señal liberada por el marcador del segundo agente que está unido al elemento de soporte, directa o indirectamente, para determinar el nivel del HMWK escindido en la muestra biológica,

en el que el primer agente es un anticuerpo que comprende una secuencia de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada FSFYVMV, una secuencia de CDR2 de cadena pesada GISPSGGNTAYADSVK, y una secuencia de CDR3 de cadena pesada KLFYYDDTKGYFDF, y una secuencia de CDR1 de cadena ligera SGSSSNIGSNYVY, una secuencia de CDR2 de cadena ligera RNNQRPS, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera AWDDSLNGRV.

15 2. El método de inmunoensayo de la reivindicación 1, en el que:

(a) el elemento de soporte es una placa de 96 pocillos;

(b) antes de la etapa (ii), el elemento de soporte de (i) se incuba con un amortiguador de bloqueo;

20 (c) el segundo agente es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, o una mezcla de dos o más anticuerpos monoclonales que se unen a HMWK;

(d) el marcador es un agente que libera una señal;

25 (e) el marcador es un miembro de un par receptor-ligando, y el método de inmunoensayo comprende además, antes de la etapa (iv), poner en contacto el segundo agente en (iii) que está unido al elemento de soporte, con el otro miembro del par receptor-ligando, en el que el otro miembro está conjugado con un agente que libera una señal, opcionalmente en el que el par receptor-ligando es biotina y estreptavidina;

(f) el método de inmunoensayo es un ensayo de transferencia Western, un ensayo ELISA, o un ensayo de flujo lateral; y/o

(g) la etapa (ii) se realiza en presencia de ZnCl₂.

30 3. El método de inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la muestra biológica se obtiene de un sujeto humano, opcionalmente en el que:

(a) la muestra biológica es una muestra de suero o una muestra de plasma, que se procesa a partir de una muestra de sangre recogida en un tubo de recogida de sangre a vacío que comprende uno o más inhibidores de proteasas;

35 (b) el sujeto humano tiene una enfermedad, y en el que el método de inmunoensayo comprende además determinar si la enfermedad está mediada por pKal basándose en el nivel del HMWK escindido determinado en la etapa (iv), siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra biológica, con respecto al de una muestra de control, indicativa de que la enfermedad está mediada por pKal;

40 (c) el método de inmunoensayo comprende además determinar si el sujeto humano tiene o está en riesgo de padecer una enfermedad mediada por calicreína plasmática basándose en el nivel del HMWK escindido determinado en la etapa (iv), en el que si el nivel del HMWK escindido de la muestra biológica del sujeto se desvía del nivel del HMWK escindido de una muestra de control, se identifica que el sujeto tiene o está en riesgo de padecer la enfermedad, que opcionalmente comprende además identificar al sujeto como candidato para la administración de una cantidad eficaz de un agente terapéutico para tratar la enfermedad, si se identifica que el sujeto tiene la enfermedad, por ejemplo, en el que el agente terapéutico es un inhibidor de calicreína plasmática (pKal), un inhibidor del receptor de bradicinina 2 (B2R), y/o un inhibidor de C1 esterasa, por ejemplo, en el que el inhibidor de pKal es un anticuerpo anti-pKal o un péptido inhibidor tal como lanadelumab, ecallantida, icatibant, o C1-INH derivado de plasma humano;

45 (d) el sujeto humano está en tratamiento para la enfermedad, y en el que el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento basándose en el nivel del HMWK escindido determinado en la etapa (iv), siendo una

desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra biológica del sujeto, con respecto al de una muestra de control, indicativa de la eficacia del tratamiento;

(e) el método de inmunoensayo comprende además identificar un tratamiento adecuado para el sujeto basándose en el nivel del HMWK escindido;

5 (f) el método de inmunoensayo comprende además identificar al sujeto como candidato para un tratamiento de la enfermedad basándose en el nivel del HMWK escindido; o

(g) el sujeto humano tiene antecedentes de HAE, y en el que el método de inmunoensayo comprende además evaluar el riesgo de ataque de la enfermedad en el sujeto basándose en el nivel del HMWK escindido, siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra biológica del sujeto, con respecto al de una muestra de control, indicativa del riesgo de ataque de la enfermedad, que opcionalmente comprende además identificar al sujeto como candidato para la administración de un agente terapéutico, si el sujeto tiene riesgo de ataque de la enfermedad.

4. El método de inmunoensayo de una cualquiera de las reivindicaciones 3(a) o 3(c)-3(f), en el que el sujeto humano tiene un antecedente de la enfermedad, opcionalmente en el que la enfermedad es HAE.

15 5. Un anticuerpo aislado, que se une específicamente a un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, en el que el anticuerpo comprende una secuencia de región determinante de la complementariedad (CDR) 1 de cadena pesada FSFYVMV, una secuencia de CDR2 de cadena pesada GISPSGGNTAYADSVK, y una secuencia de CDR3 de cadena pesada KLFYYDDTKGYFDF, y una secuencia de CDR1 de cadena ligera SGSSSNIGSNVY, una secuencia de CDR2 de cadena ligera RNNQRPS, y una secuencia de CDR3 de cadena ligera AWDDSLNGRV.

20 6. El anticuerpo aislado según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de la región variable de cadena pesada presentada en SEQ ID NO: 4 y la secuencia de la región variable de cadena ligera presentada en SEQ ID NO: 5.

25 7. Un kit para detectar un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido, comprendiendo el kit un primer agente que se une específicamente a un HMWK escindido; en el que el primer agente es un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6.

8. El kit de la reivindicación 7, en el que:

(a) el kit comprende además un segundo agente que se une a HMWK, a un elemento de soporte, o a ambos; opcionalmente en el que (b) el elemento de soporte es una placa de 96 pocillos; y/o
(c) el kit comprende además instrucciones para detectar el HMWK escindido.

30 9. Un anticuerpo aislado que se une tanto a cininógeno de alto peso molecular (HMWK) intacto como a un HMWK escindido, en el que:

(a) el anticuerpo no se une al cininógeno de bajo peso molecular (LMWK),

en el que el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

35 i) SEQ ID NOs: 6 y 7;

ii) SEQ ID NOs: 8 y 9;

iii) SEQ ID NOs: 10 y 11;

iv) SEQ ID NOs: 12 y 13;

v) SEQ ID NOs: 14 y 15;

40 vi) SEQ ID NOs: 16 y 17;

vii) SEQ ID NOs: 18 y 19;

viii) SEQ ID NOs: 20 y 21;

ix) SEQ ID NOs: 22 y 23;

x) SEQ ID NOs: 24 y 25;

45 xi) SEQ ID NOs: 26 y 27;

xii) SEQ ID NOs: 28 y 29;

xiii) SEQ ID NOs: 30 y 31; or

xiv) SEQ ID NOs: 32 y 33,

o compite contra un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

5 i) SEQ ID NOs: 6 y 7;

ii) SEQ ID NOs: 8 y 9;

iii) SEQ ID NOs: 10 y 11;

iv) SEQ ID NOs: 12 y 13;

v) SEQ ID NOs: 14 y 15;

10 vi) SEQ ID NOs: 16 y 17;

vii) SEQ ID NOs: 18 y 19;

viii) SEQ ID NOs: 20 y 21;

ix) SEQ ID NOs: 22 y 23;

x) SEQ ID NOs: 24 y 25;

15 xi) SEQ ID NOs: 26 y 27;

xii) SEQ ID NOs: 28 y 29;

xiii) SEQ ID NOs: 30 y 31; or

xiv) SEQ ID NOs: 32 y 33

por la unión al HMWK intacto y/o al HMWK escindido,

20 por ejemplo, en el que el anticuerpo comprende las mismas CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

i) SEQ ID NOs: 6 y 7;

ii) SEQ ID NOs: 8 y 9;

iii) SEQ ID NOs: 10 y 11;

25 iv) SEQ ID NOs: 12 y 13;

v) SEQ ID NOs: 14 y 15;

vi) SEQ ID NOs: 16 y 17;

vii) SEQ ID NOs: 18 y 19;

viii) SEQ ID NOs: 20 y 21;

30 ix) SEQ ID NOs: 22 y 23;

x) SEQ ID NOs: 24 y 25;

xi) SEQ ID NOs: 26 y 27;

xii) SEQ ID NOs: 28 y 29;

xiii) SEQ ID NOs: 30 y 31; or

35 xiv) SEQ ID NOs: 32 y 33; or

(b) el anticuerpo también se une a LMWK,

en el que el anticuerpo se une al mismo epítopo que un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

- i) SEQ ID NOs: 34 y 35;
 - ii) SEQ ID NOs: 36 y 37;
 - iii) SEQ ID NOs: 38 y 39;
 - iv) SEQ ID NOs: 40 y 41;
 - v) SEQ ID NOs: 42 y 43;
 - vi) SEQ ID NOs: 44 y 45;
 - vii) SEQ ID NOs: 46 y 47;
 - viii) SEQ ID NOs: 48 y 49;
 - ix) SEQ ID NOs: 50 y 51;
 - x) SEQ ID NOs: 52 y 53;
 - xi) SEQ ID NOs: 54 y 55;
 - xii) SEQ ID NOs: 56 y 57;
 - xiii) SEQ ID NOs: 58 y 59;
 - xiv) SEQ ID NOs: 60 y 61;
 - xv) SEQ ID NOs: 62 y 63;
 - xvi) SEQ ID NOs: 64 y 65;
 - xvii) SEQ ID NOs: 66 y 67;
 - xviii) SEQ ID NOs: 76 y 77;

o compite contra un anticuerpo que comprende las CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

- i) SEQ ID NOs: 34 y 35;
 - ii) SEQ ID NOs: 36 y 37;
 - iii) SEQ ID NOs: 38 y 39;
 - iv) SEQ ID NOs: 40 y 41;
 - v) SEQ ID NOs: 42 y 43;
 - vi) SEQ ID NOs: 44 y 45;
 - vii) SEQ ID NOs: 46 y 47;
 - viii) SEQ ID NOs: 48 y 49;
 - ix) SEQ ID NOs: 50 y 51;
 - x) SEQ ID NOs: 52 y 53;
 - xi) SEQ ID NOs: 54 y 55;
 - xii) SEQ ID NOs: 56 y 57;
 - xiii) SEQ ID NOs: 58 y 59;
 - xiv) SEQ ID NOs: 60 y 61;
 - xv) SEQ ID NOs: 62 y 63;
 - xvi) SEQ ID NOs: 64 y 65;

xvii) SEQ ID NOs: 66 y 67; o

xviii) SEQ ID NOs: 76 y 77,

por la unión al HMWK intacto, al HMWK escindido, y/o al LMWK.

10. El anticuerpo aislado de la reivindicación 9, en el que:

5 (a) el anticuerpo comprende las mismas CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

i) SEQ ID NOs: 6 y 7;

ii) SEQ ID NOs: 8 y 9;

iii) SEQ ID NOs: 10 y 11;

iv) SEQ ID NOs: 12 y 13;

10 v) SEQ ID NOs: 14 y 15;

vi) SEQ ID NOs: 16 y 17;

vii) SEQ ID NOs: 18 y 19;

viii) SEQ ID NOs: 20 y 21;

ix) SEQ ID NOs: 22 y 23;

15 x) SEQ ID NOs: 24 y 25;

xi) SEQ ID NOs: 26 y 27;

xii) SEQ ID NOs: 28 y 29;

xiii) SEQ ID NOs: 30 y 31; o

ix) SEQ ID NOs: 32 y 33; o

20 (b) en el que el anticuerpo comprende las mismas CDR de cadena pesada y de cadena ligera presentadas en:

i) SEQ ID NOs: 34 y 35;

ii) SEQ ID NOs: 36 y 37;

iii) SEQ ID NOs: 38 y 39;

iv) SEQ ID NOs: 40 y 41;

25 v) SEQ ID NOs: 42 y 43;

vi) SEQ ID NOs: 44 y 45;

vii) SEQ ID NOs: 46 y 47;

viii) SEQ ID NOs: 48 y 49;

ix) SEQ ID NOs: 50 y 51;

30 x) SEQ ID NOs: 52 y 53;

xi) SEQ ID NOs: 54 y 55;

xii) SEQ ID NOs: 56 y 57;

xiii) SEQ ID NOs: 58 y 59;

xiv) SEQ ID NOs: 60 y 61;

35 xv) SEQ ID NOs: 62 y 63;

xvi) SEQ ID NOs: 64 y 65;

xvii) SEQ ID NOs: 66 y 67; o

xviii) SEQ ID NOs: 76 y 77.

11. Un método para detectar un cininógeno de alto peso molecular (HMWK) escindido en una muestra, comprendiendo el método:

- 5 (i) poner en contacto una muestra sospechosa de contener un HMWK escindido con un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6;
- (ii) medir un complejo del HMWK escindido y el anticuerpo formado en la etapa (i); y
- (iii) determinar el nivel del HMWK escindido en la muestra basándose en el resultado de la etapa (ii).

12. El método de la reivindicación 11, en el que:

10 (a) la muestra es una muestra biológica obtenida de un sujeto, por ejemplo, en el que la muestra biológica es una muestra de suero o una muestra de plasma, y/o en el que el sujeto es un paciente humano, que opcionalmente comprende además recoger la muestra biológica en un tubo de recogida de sangre a vacío, que comprende uno o más inhibidores de proteasas; y/o

15 (b) el método se realiza utilizando un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayo de inmunotransferencia, o ensayo de flujo lateral,

15 (c) opcionalmente en el que el sujeto de (a) y/o (b) tiene una enfermedad, y en el que el método comprende además determinar si la enfermedad está mediada por pKal basándose en el nivel del HMWK escindido determinado en la etapa (iii), siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra, con respecto al de una muestra de control, indicativa de que la enfermedad está mediada por pKal.

13. El método de la reivindicación 12:

20 (a) que comprende además determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de padecer un trastorno mediado por calicreína plasmática basándose en el nivel del HMWK escindido determinado en la etapa (iii), en el que si el nivel del HMWK escindido de la muestra del sujeto se desvía del nivel del HMWK escindido de una muestra de control, se identifica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener el trastorno, que comprende además opcionalmente identificar al sujeto como candidato para la administración de una cantidad eficaz de un agente terapéutico para tratar el trastorno, si se identifica que el sujeto padece el trastorno, por ejemplo, en el que el agente terapéutico es un inhibidor de calicreína plasmática (pKal), un inhibidor del receptor de bradicinina 2 (B2R), y/o un inhibidor de C1 esterasa, particularmente en el que el inhibidor de pKal es un anticuerpo anti-pKal o un péptido inhibidor tal como lanadelumab, ecallantida, icatibant, o C1-INH derivado de plasma humano; o

30 (b) en el que el sujeto es un paciente humano que está en tratamiento para el trastorno, y en el que el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento basándose en el nivel del HMWK escindido determinado en la etapa (iii), siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra del sujeto, con respecto al de una muestra de control, indicativa de la eficacia del tratamiento.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13(a), en el que:

35 (a) el método comprende además identificar un tratamiento adecuado para el sujeto basándose en el nivel del HMWK escindido;

(b) el método comprende además identificar al sujeto como candidato para un tratamiento de la enfermedad basándose en el nivel del HMWK escindido; o

40 (c) en el que el paciente humano tiene antecedentes de HAE, y el método comprende además evaluar el riesgo de ataque de la enfermedad en el sujeto basándose en el nivel del HMWK escindido, siendo una desviación del nivel del HMWK escindido en la muestra del sujeto, con respecto al de una muestra de control, indicativa del riesgo de ataque de enfermedad, que opcionalmente comprende además identificar al sujeto como candidato para la administración de un agente terapéutico, si el sujeto está en riesgo de ataque de enfermedad.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en el que el paciente humano tiene antecedentes de la enfermedad, opcionalmente en el que la enfermedad es HAE.

45 16. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, en el que la etapa (i) se realiza en presencia de ZnCl₂.

FIG. 1

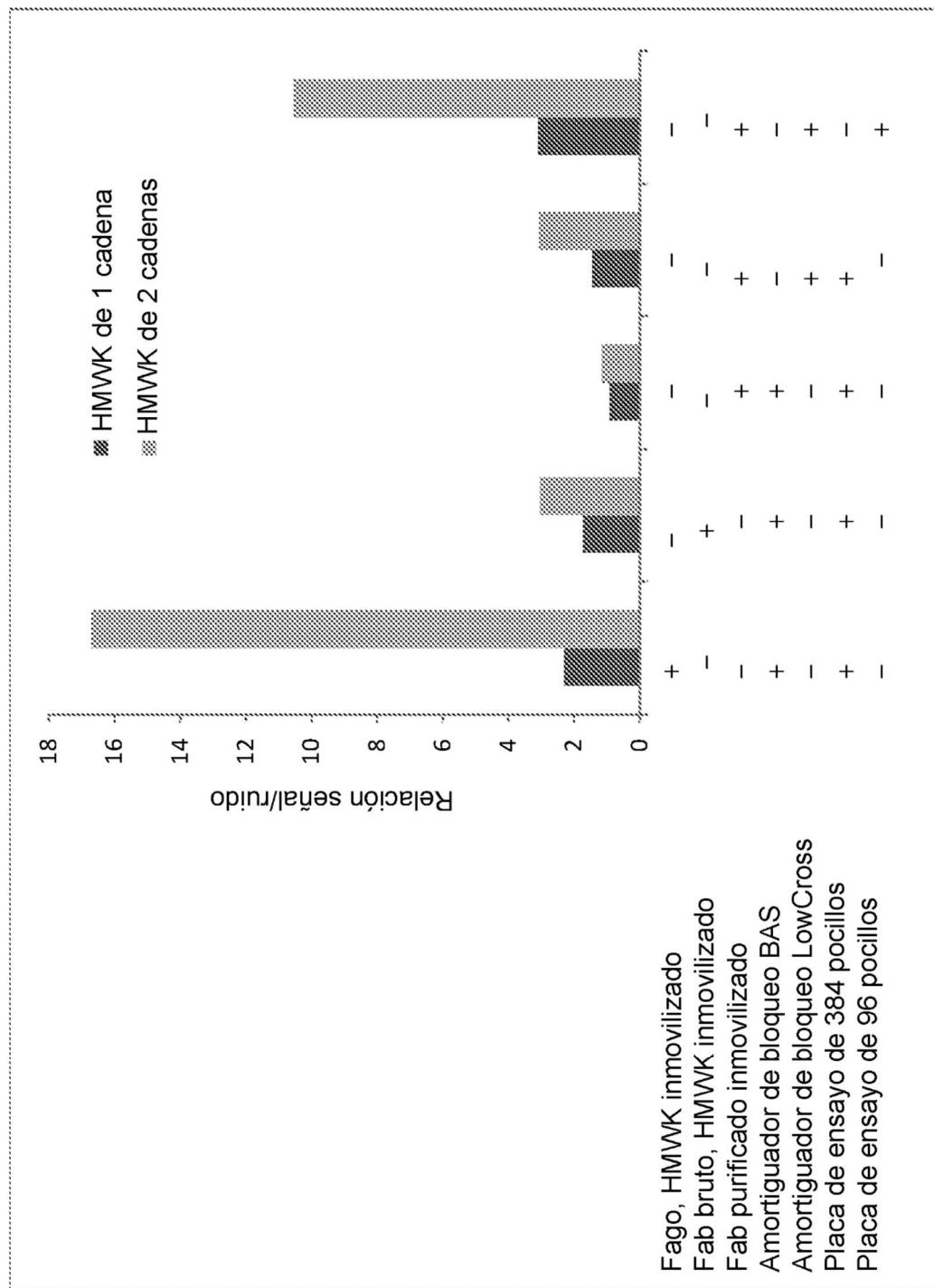


FIG. 2

A

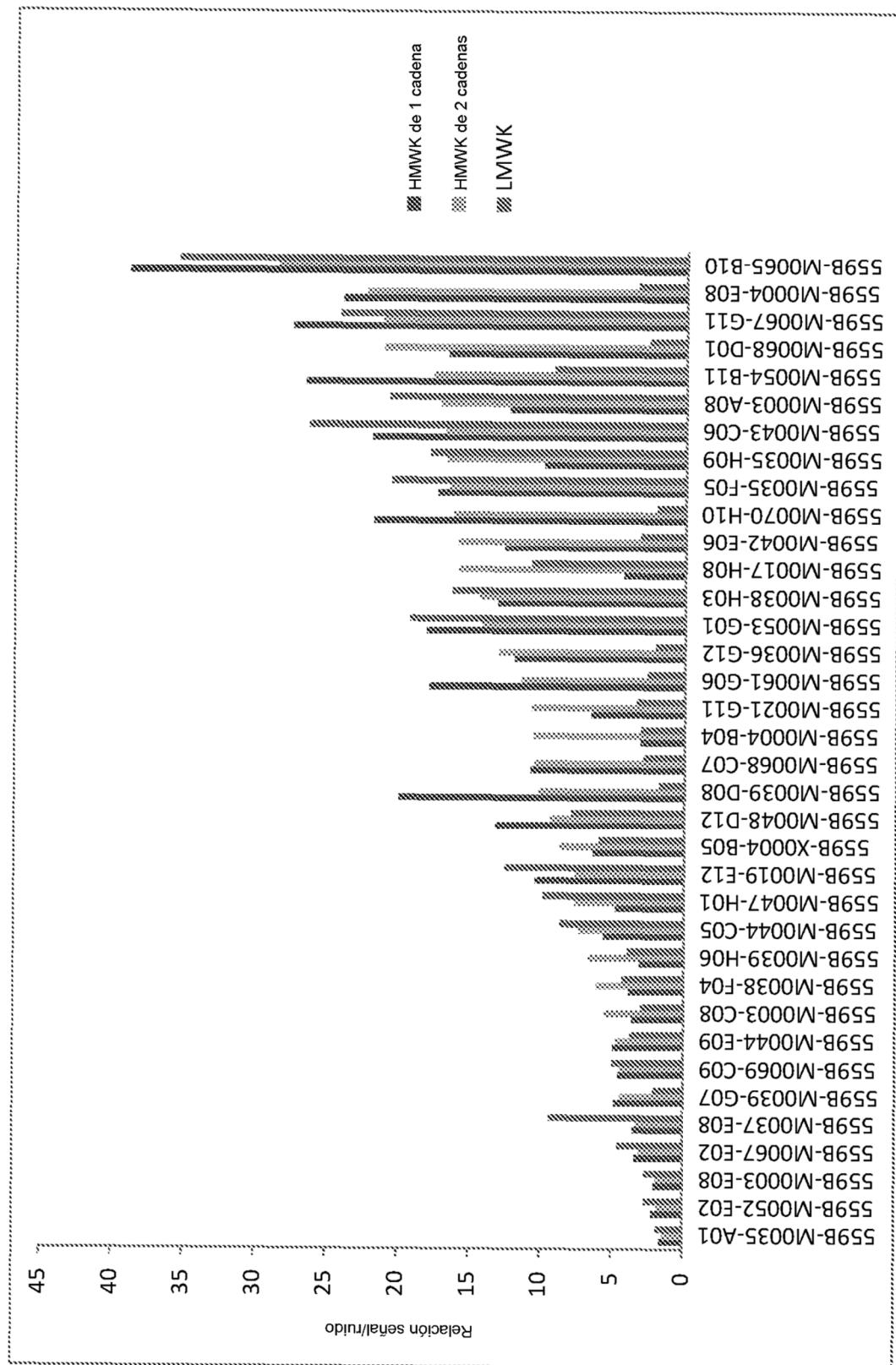


FIG. 2 CONTINUACIÓN

B

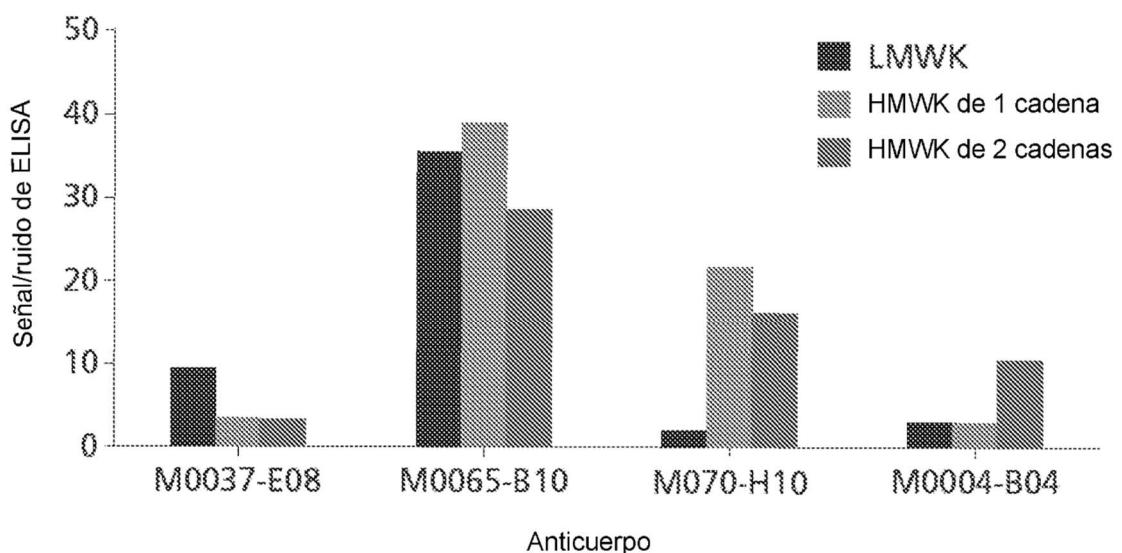


FIG. 3

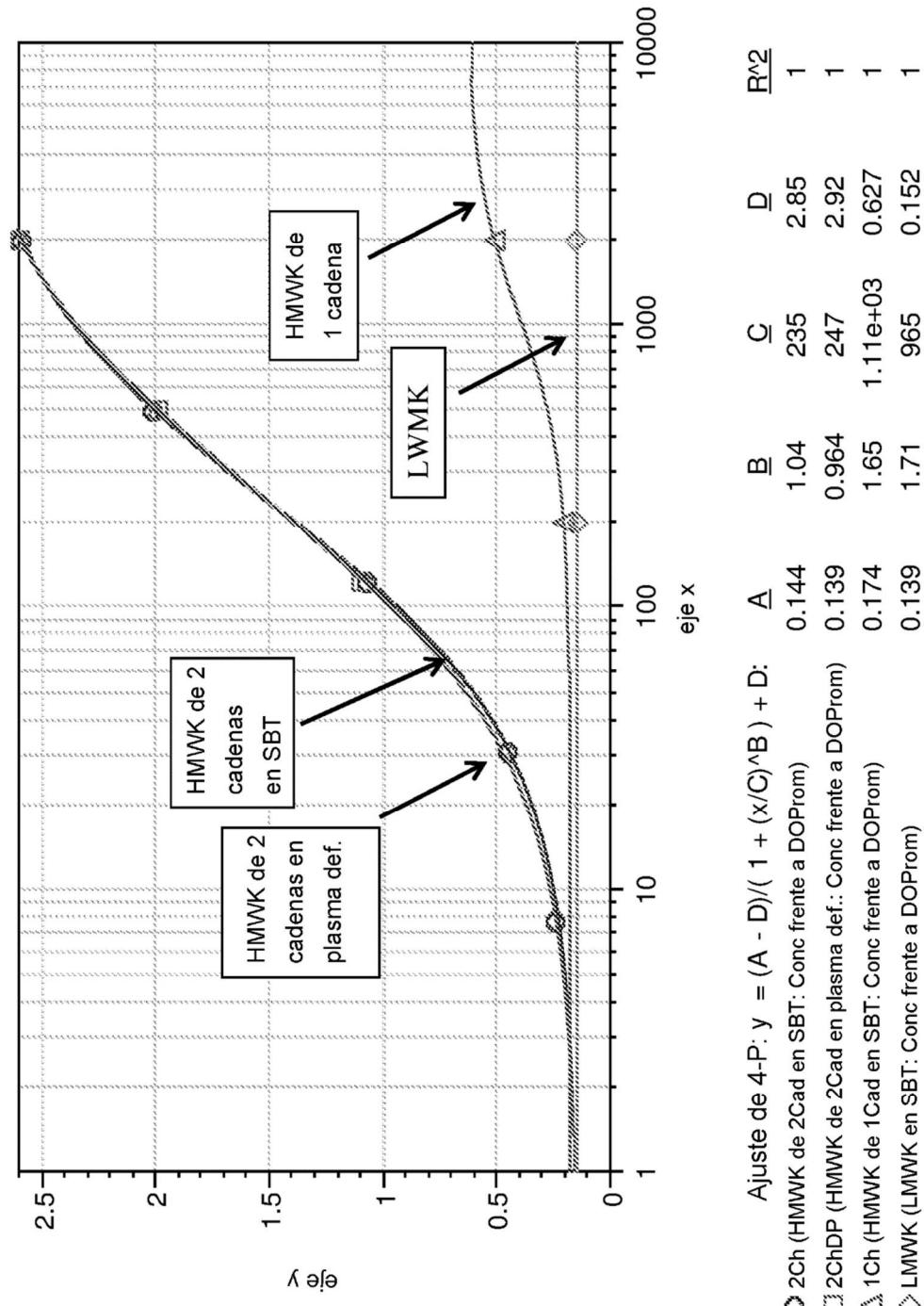


FIG. 4

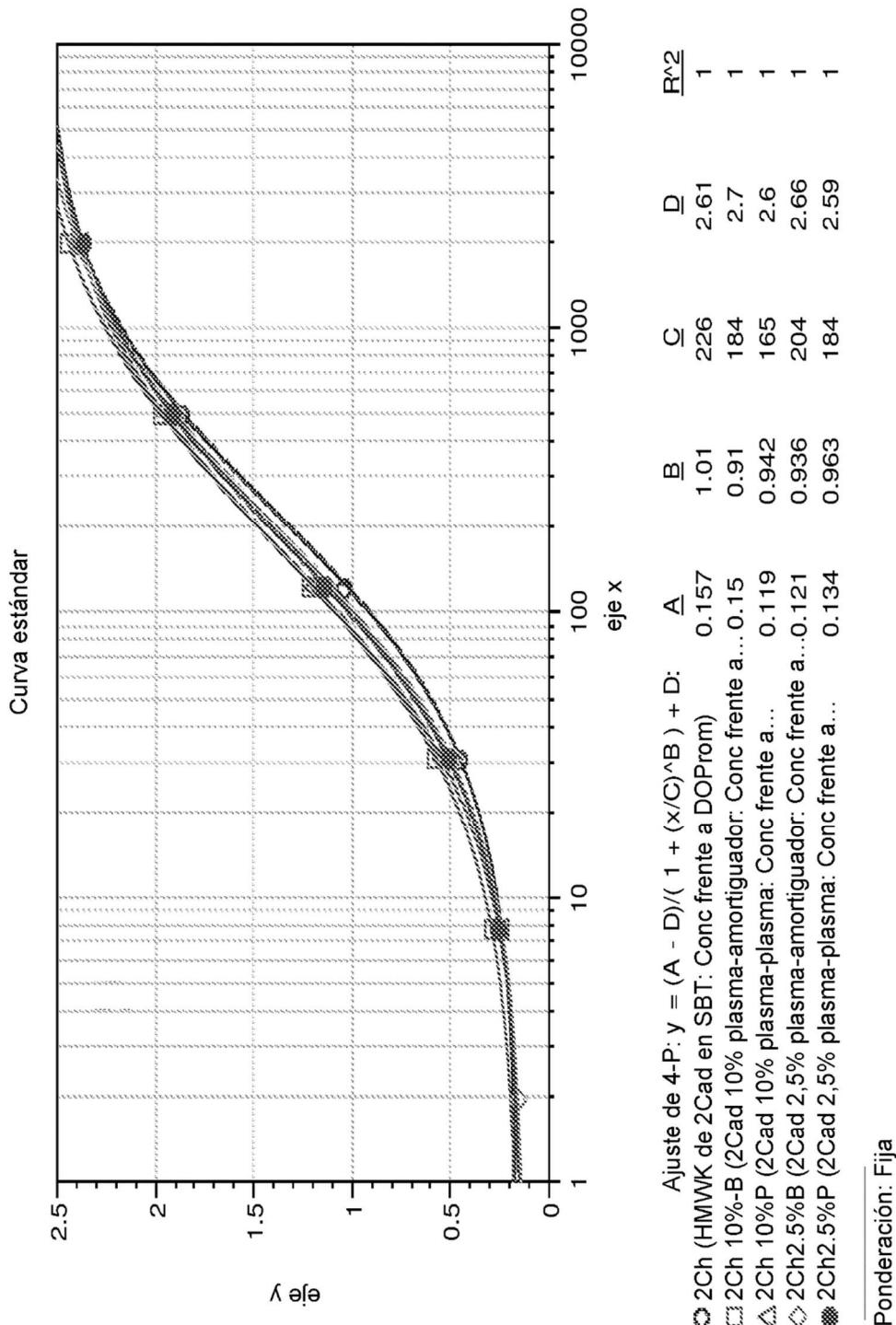
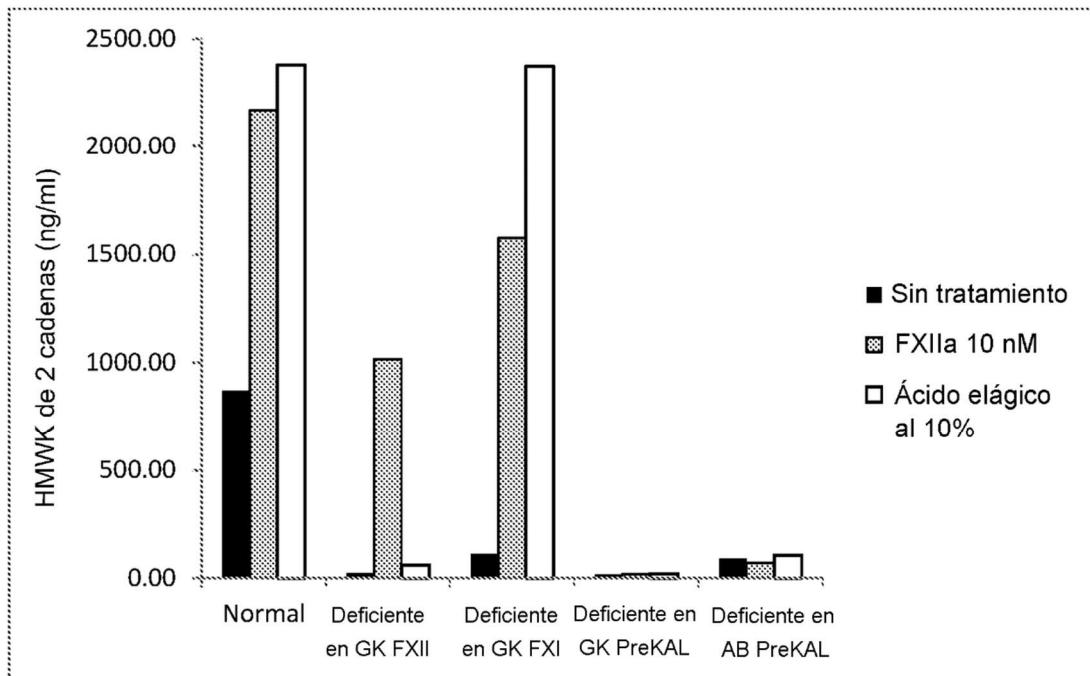


FIG. 5

A



B

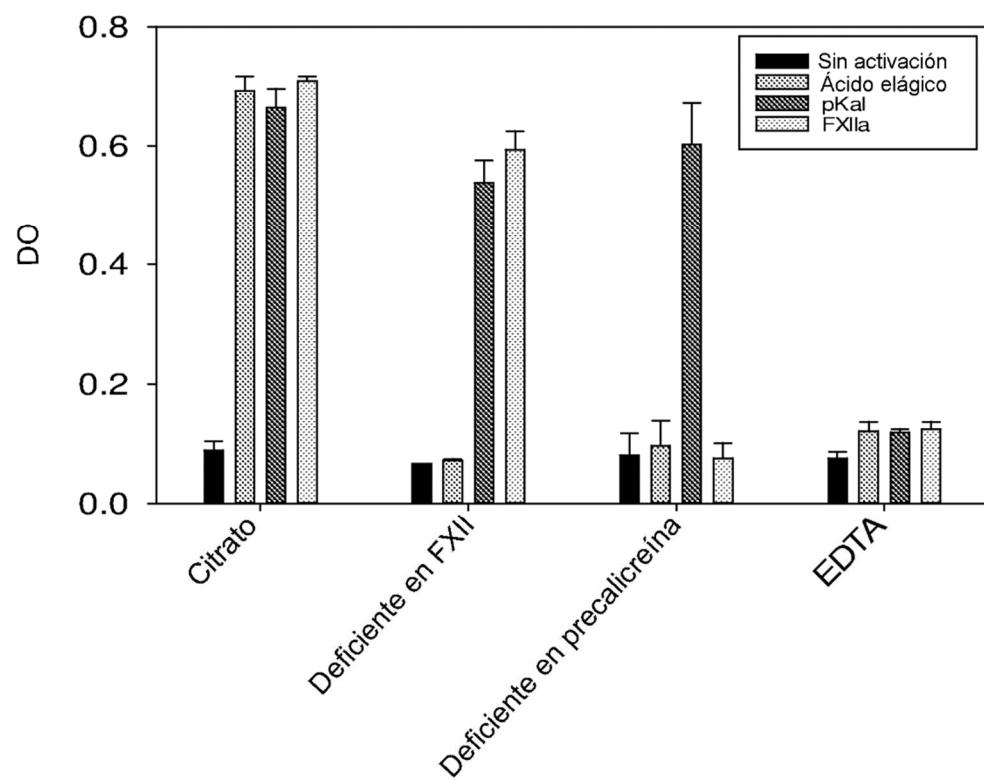


FIG. 6

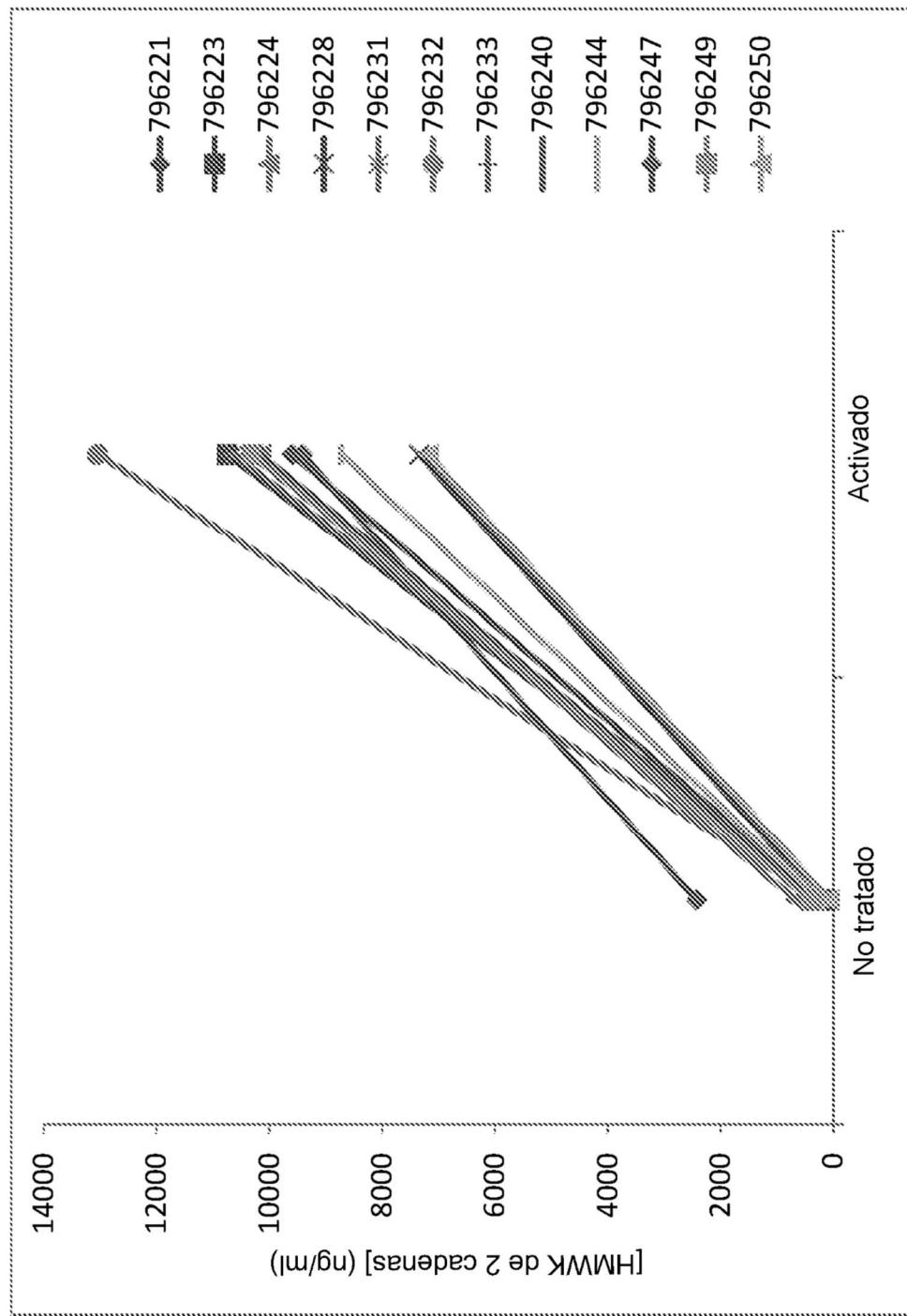
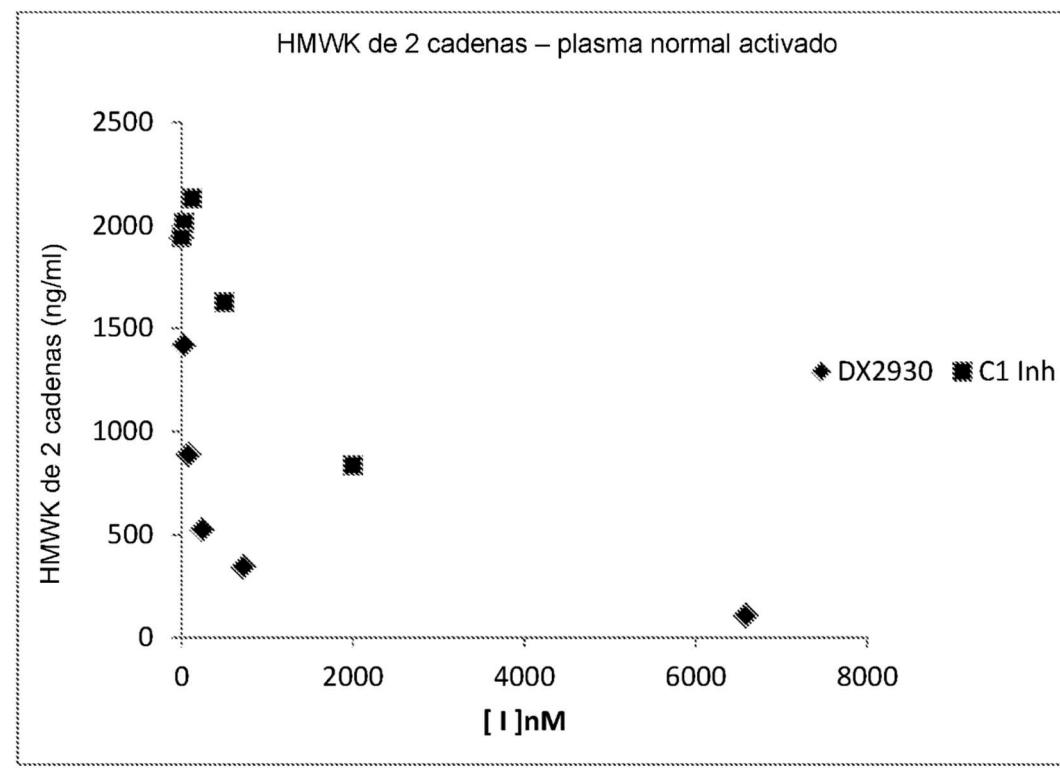


FIG. 7

A



B

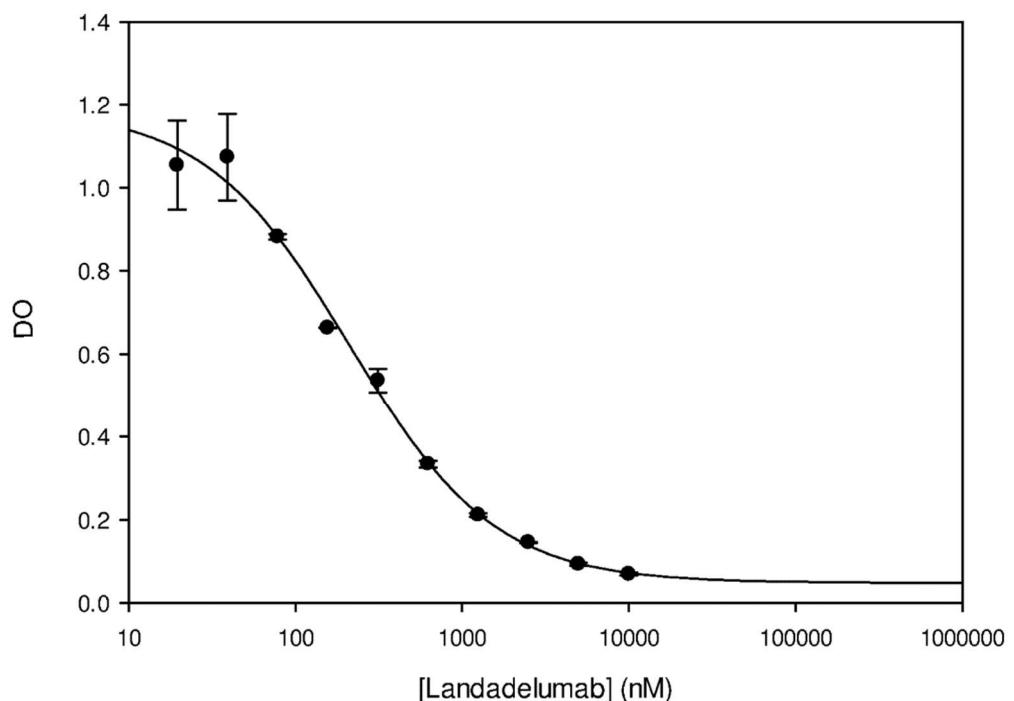


FIG. 8

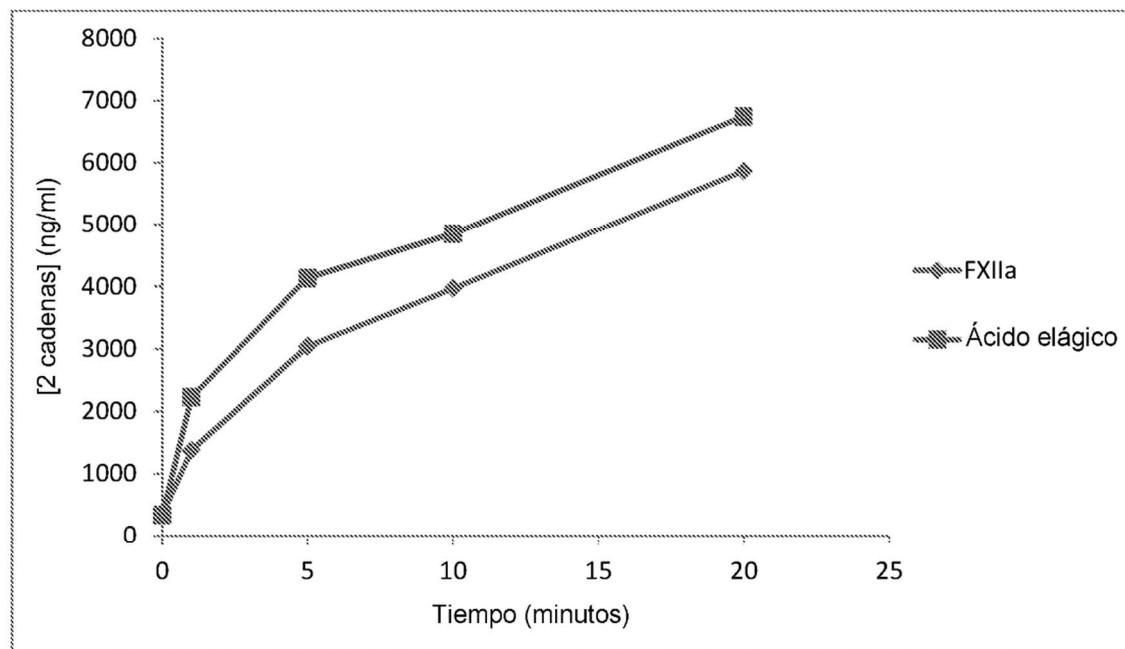


FIG. 9

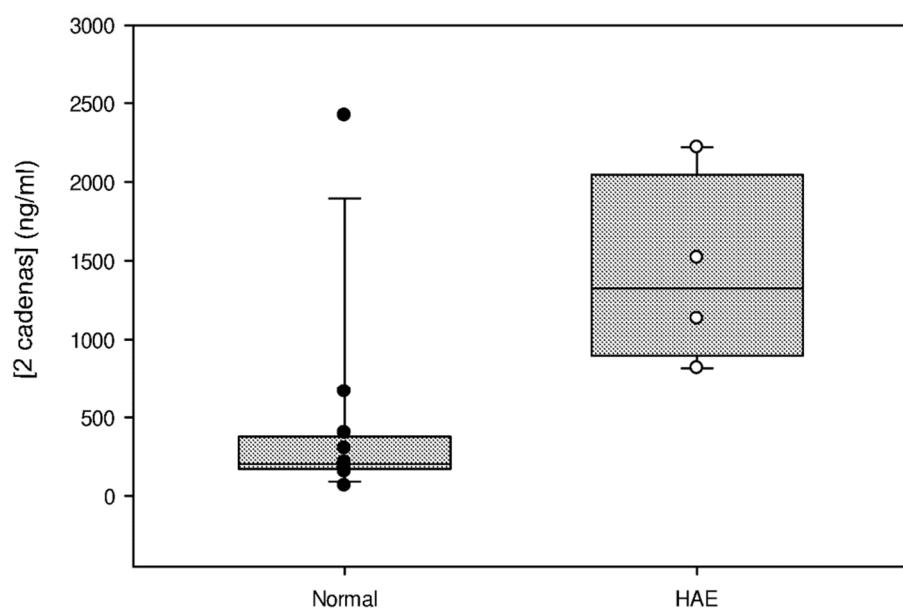


FIG. 10

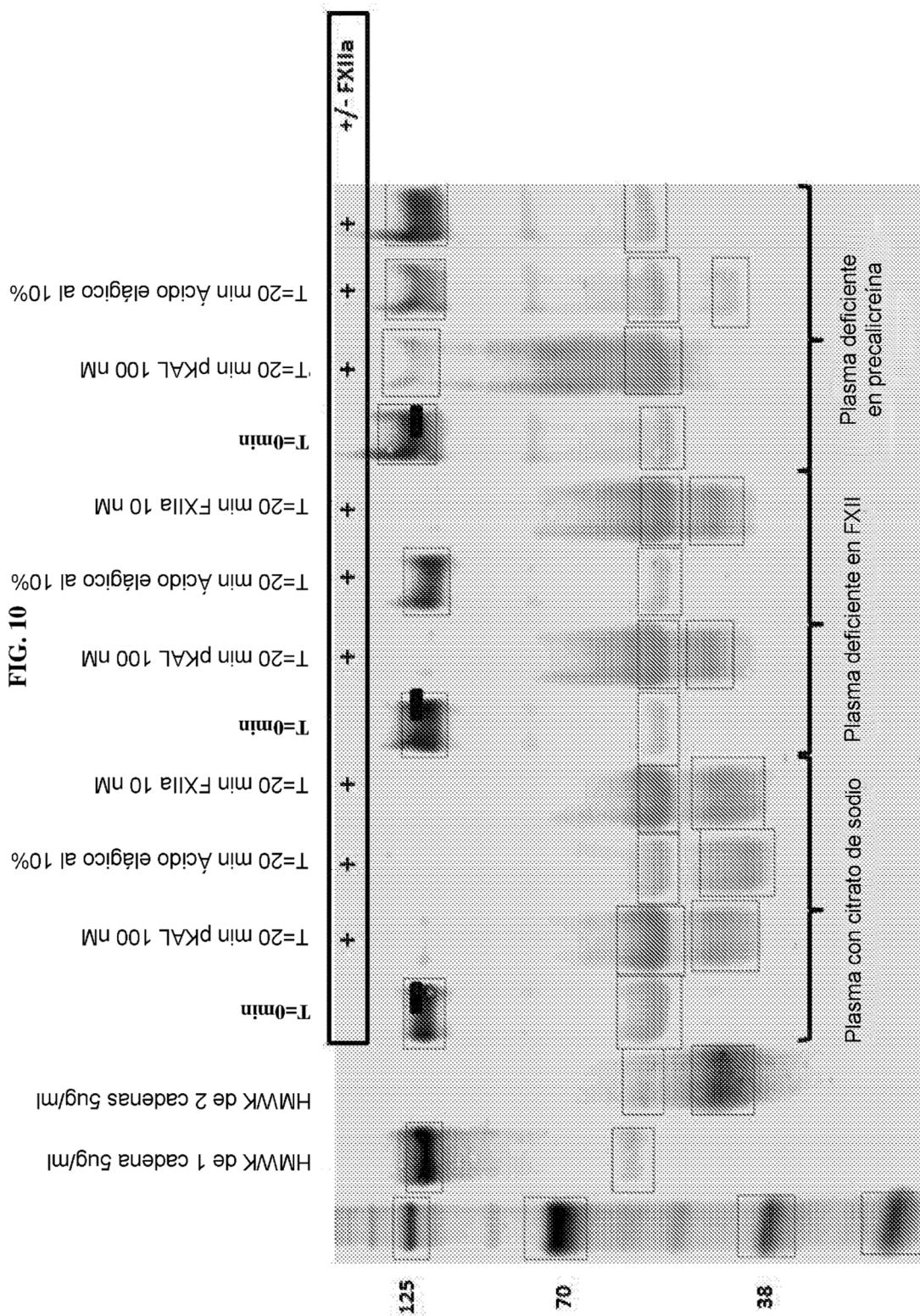
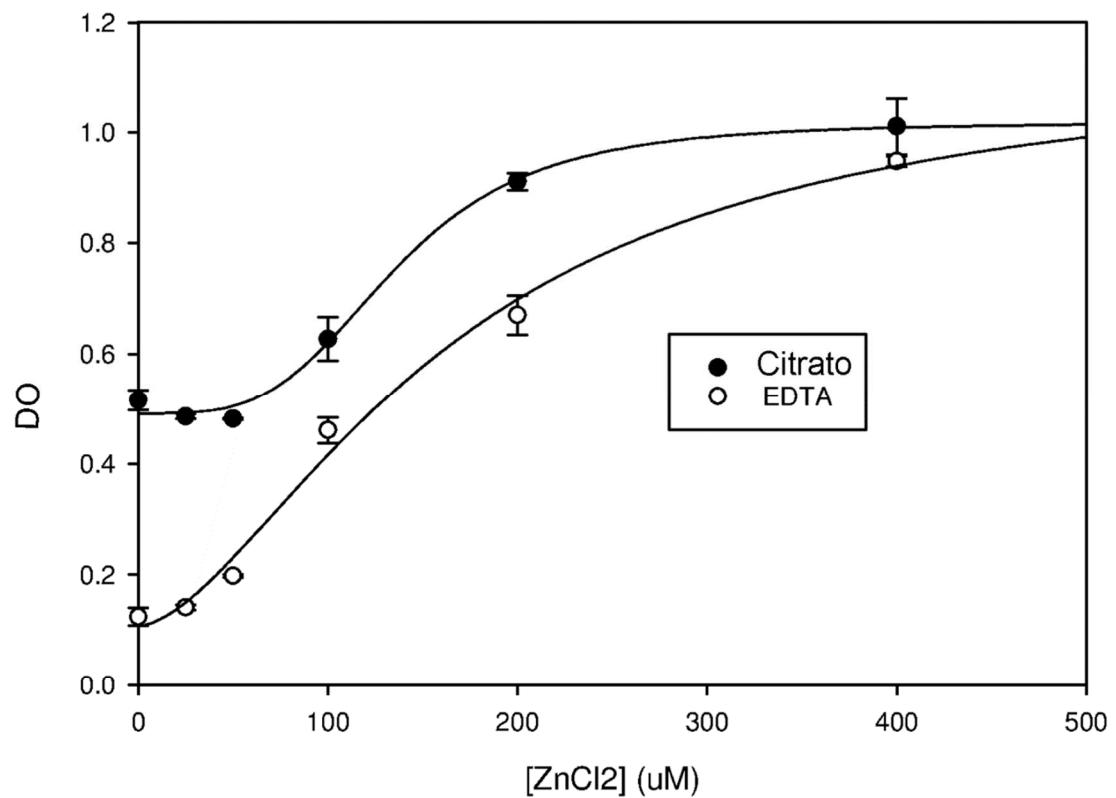


FIG. 11

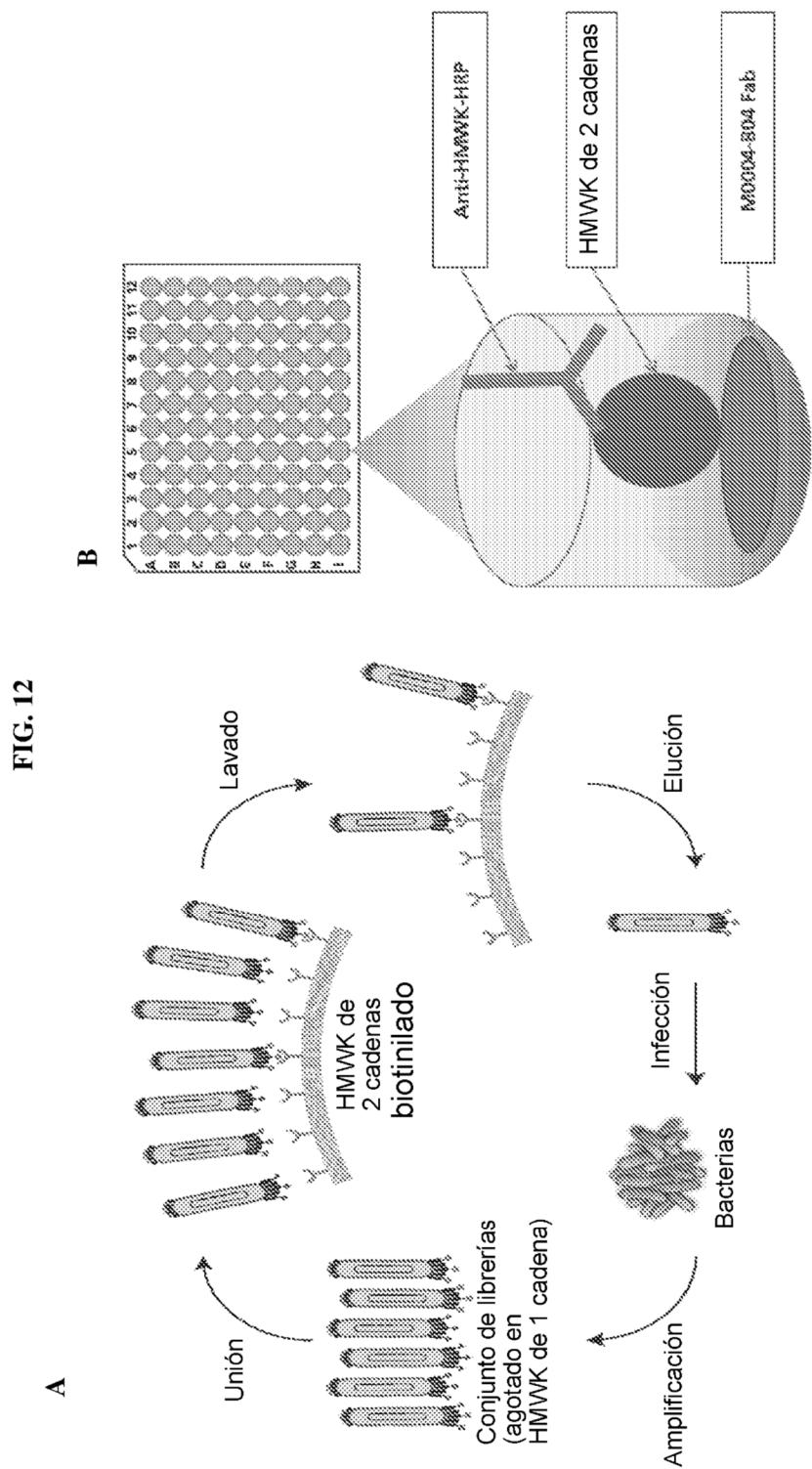


FIG. 13

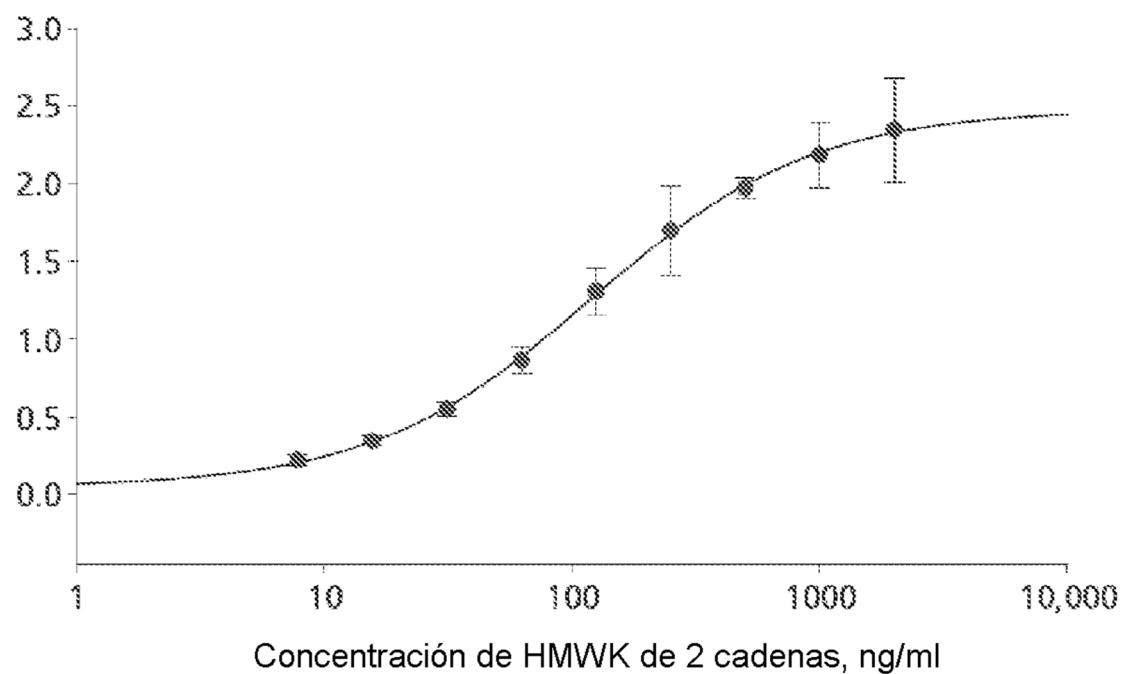
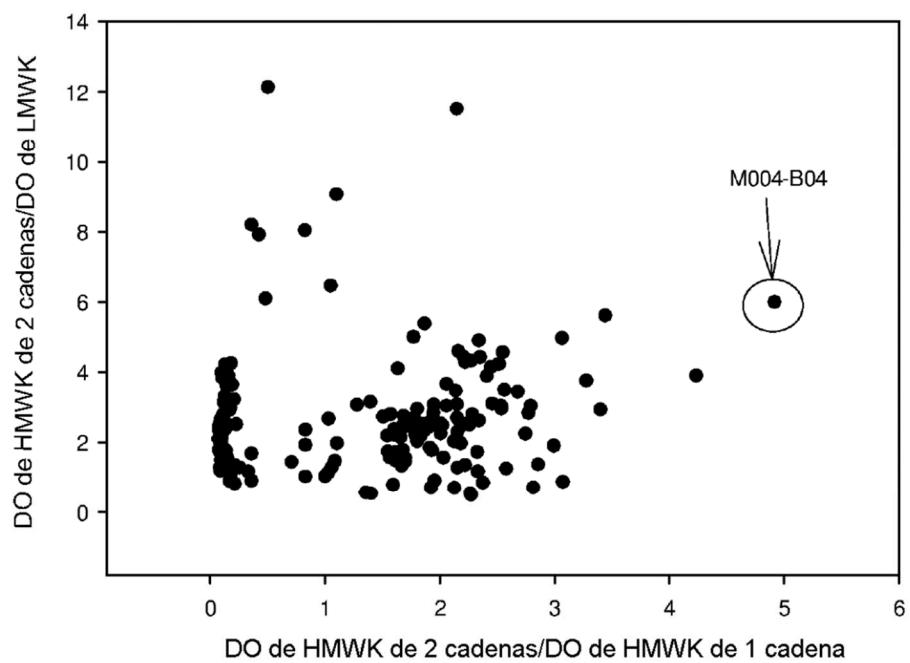


FIG. 14

A



B

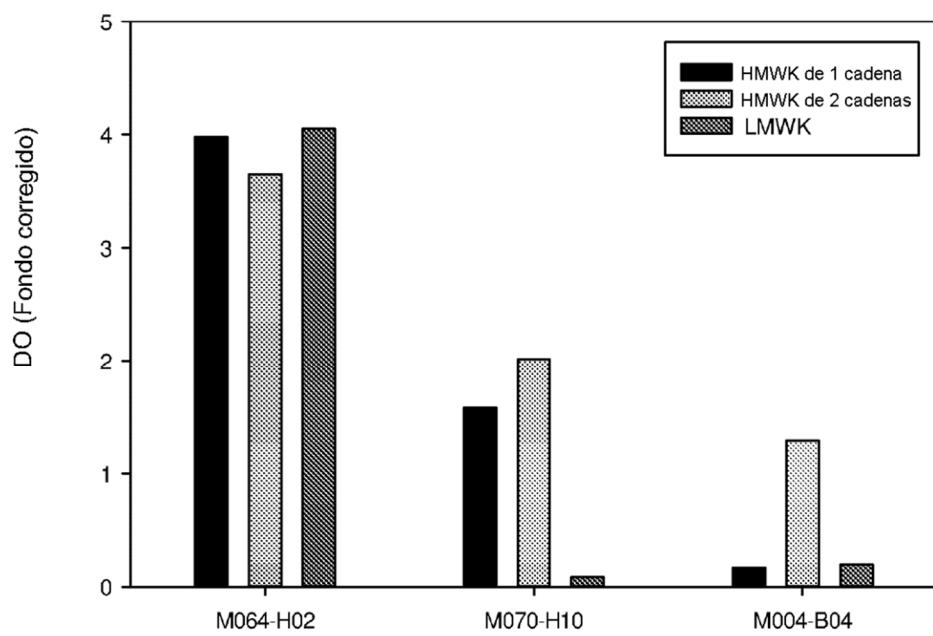


FIG. 15

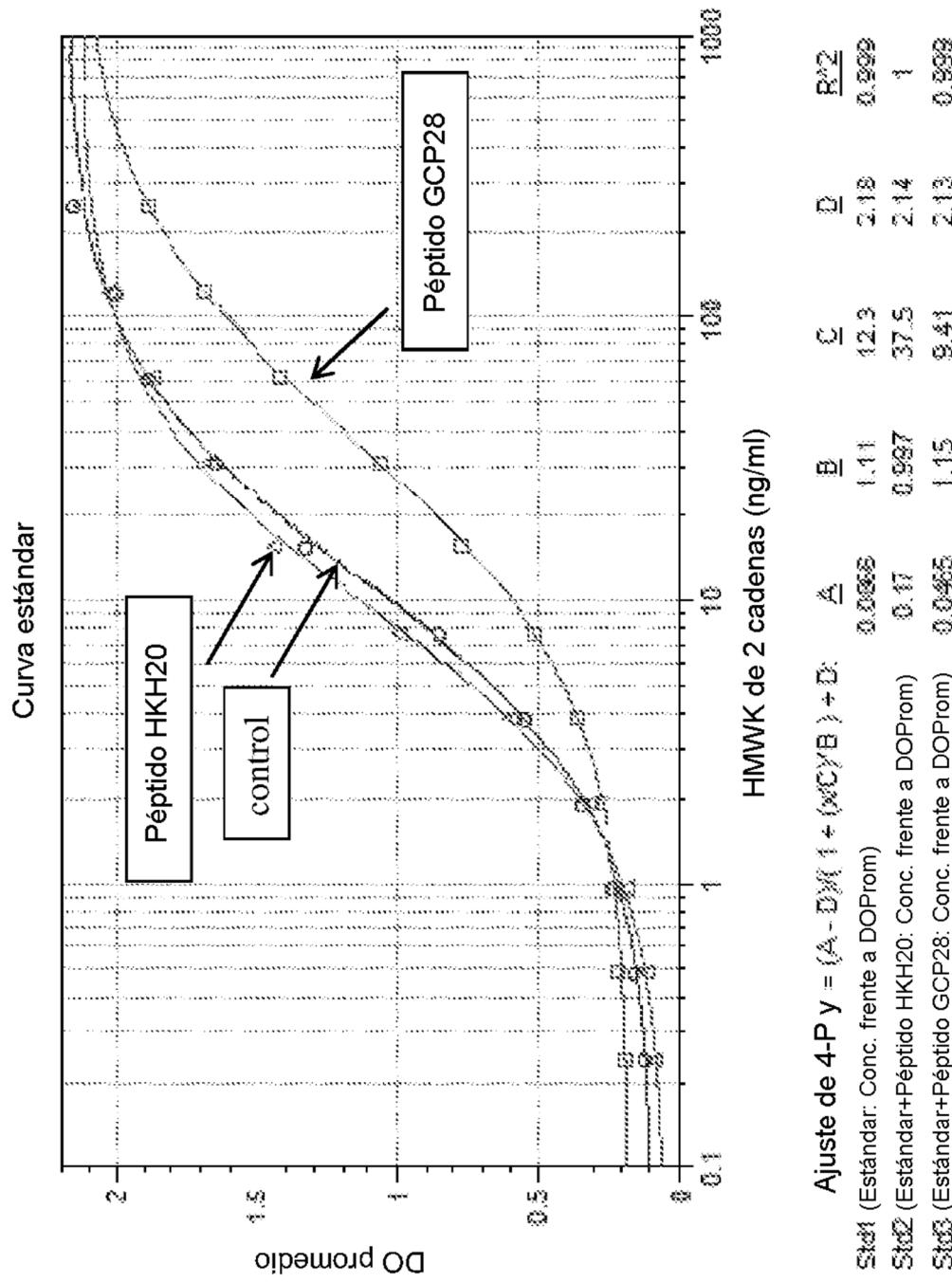


FIG. 16

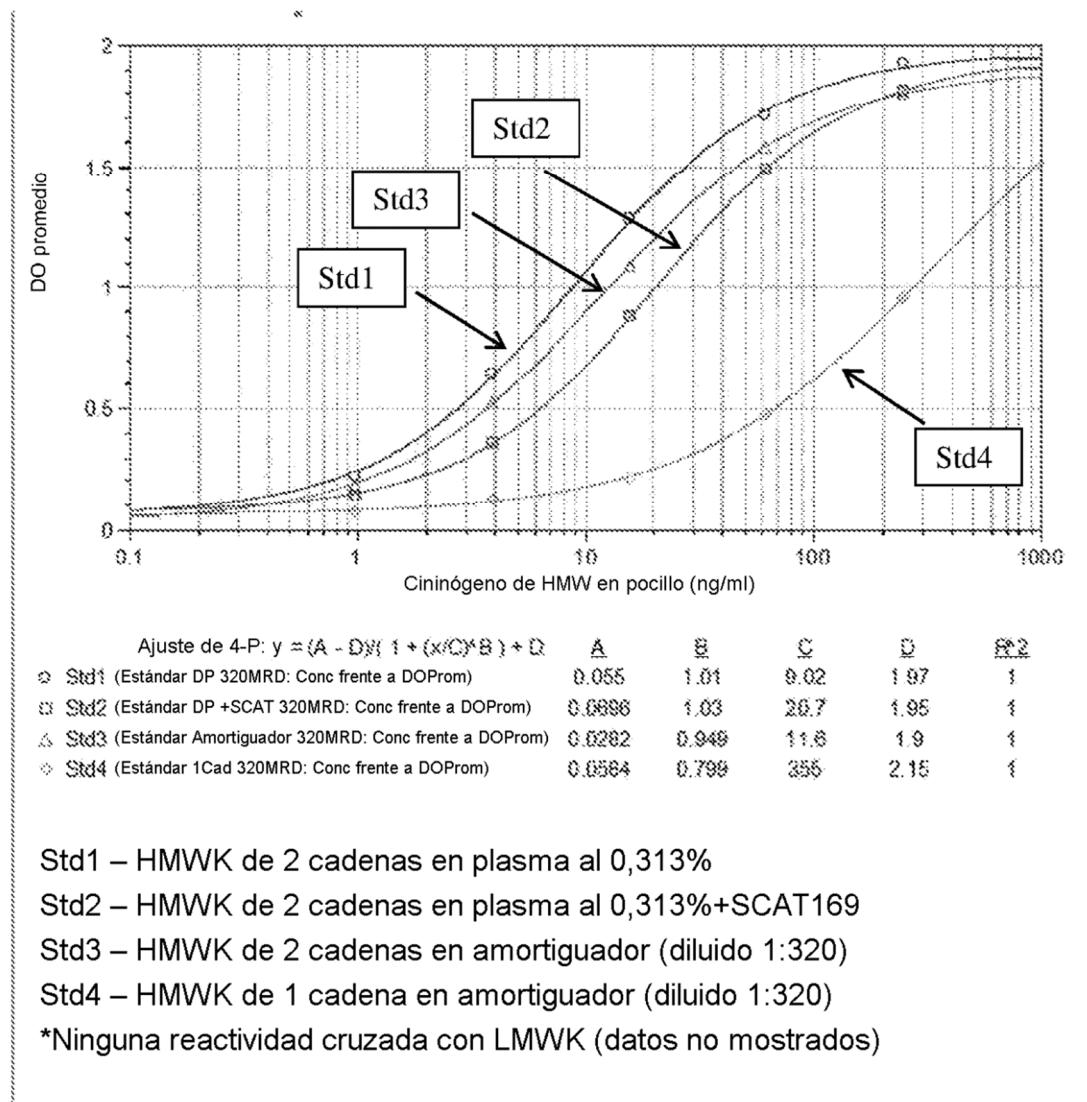
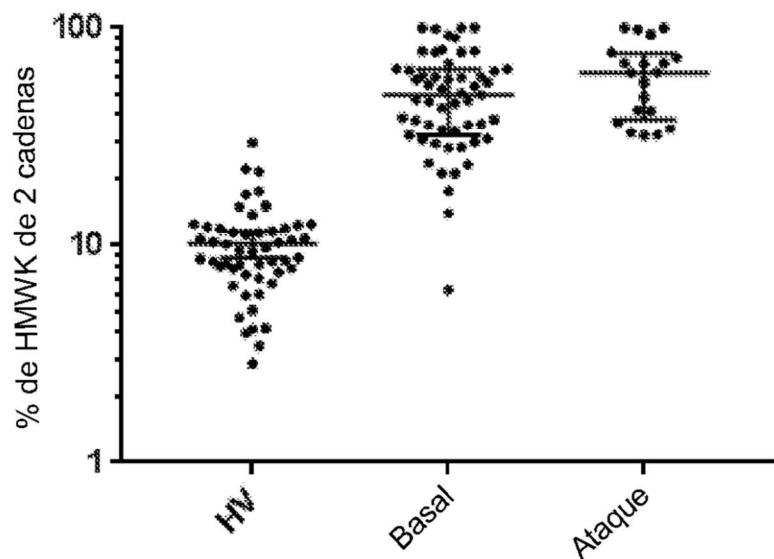


FIG. 17

A

% de HMWK de 2 cadenas en plasma humano con citrato de sodio



B

Plasma con NaCit de voluntario sano frente a HAE Basal

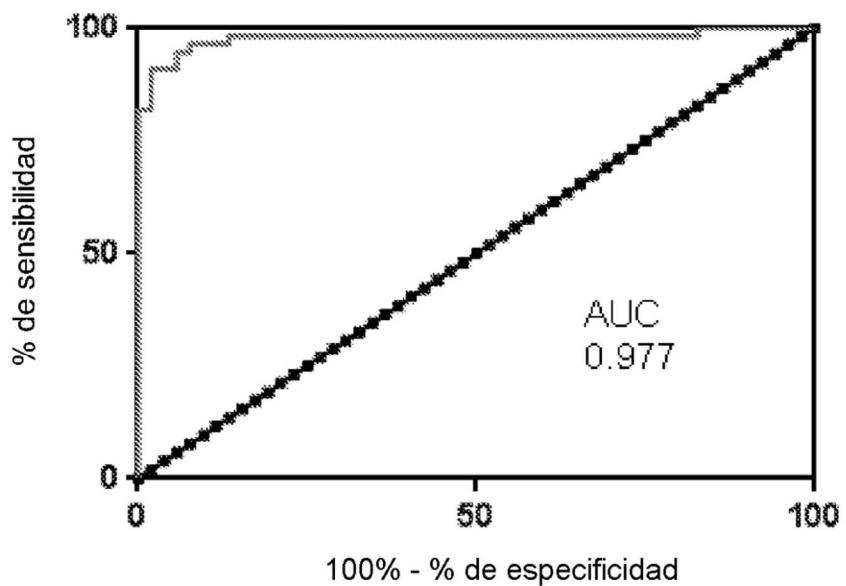
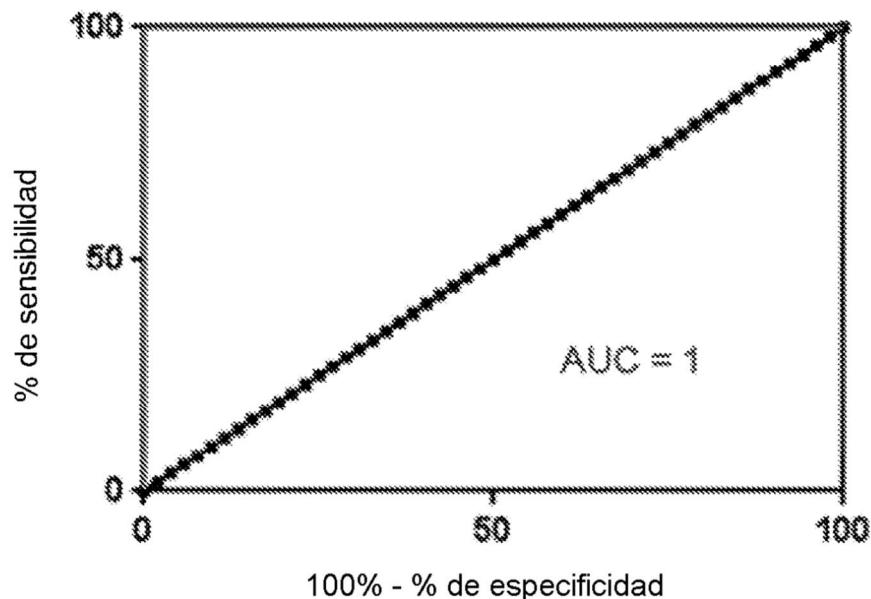


FIG. 17 CONTINUACIÓN

C

Plasma con NaCit de voluntario sano frente a Ataque de HAE



D

HAE Basal con NaCit frente a Ataque

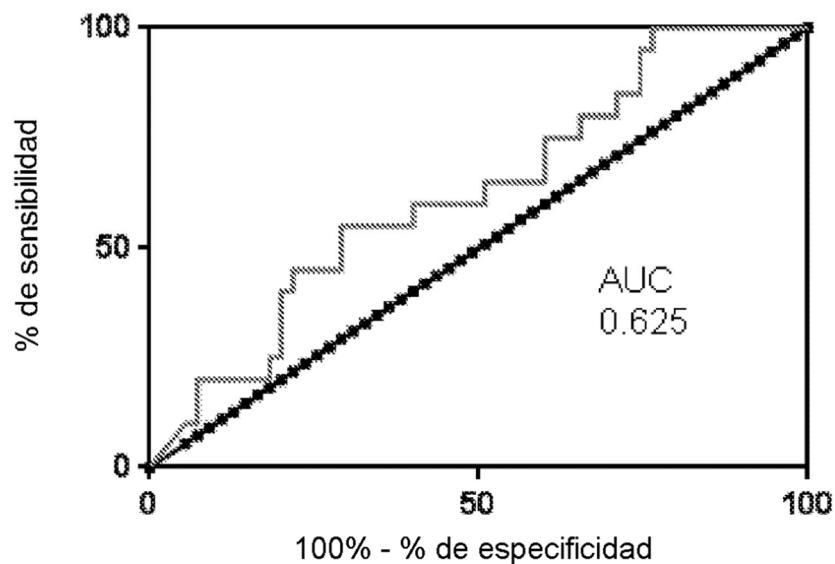
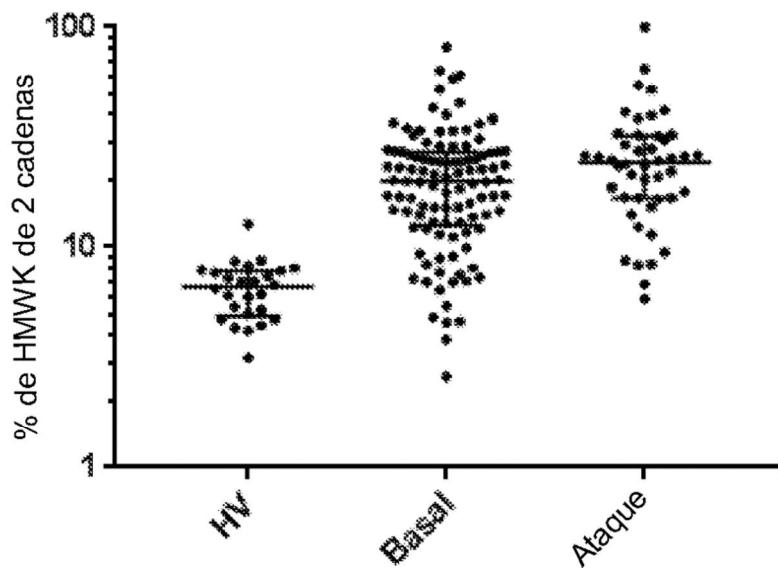


FIG. 18

A

% de HMWK de 2 cadenas en plasma humano SCAT169



B

Plasma SCAT169 de voluntario sano frente a HAE Basal

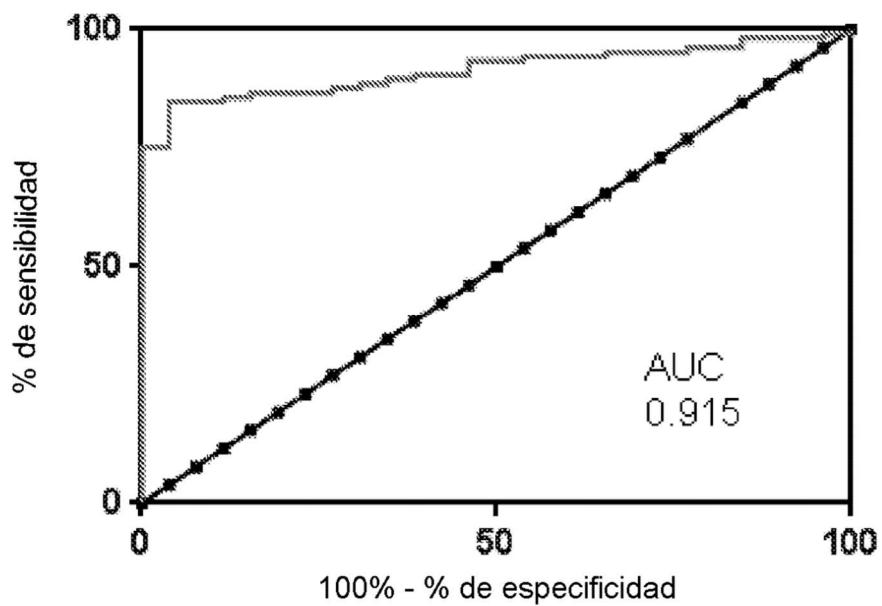
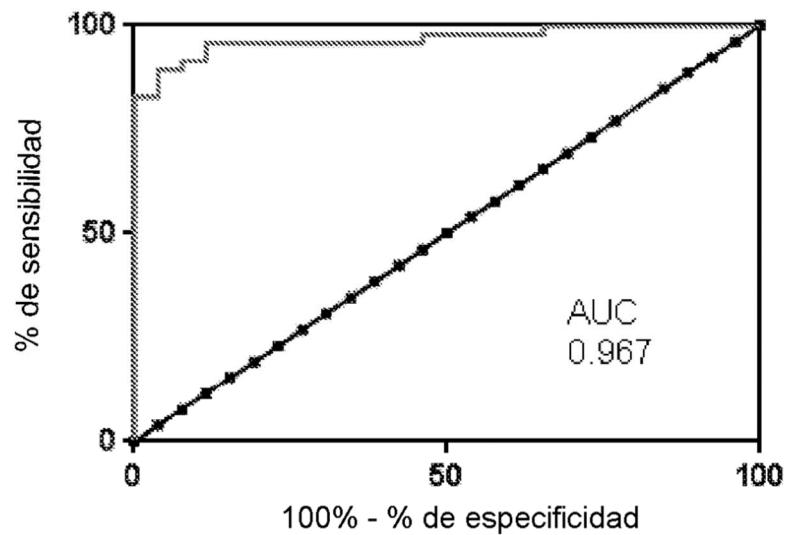


FIG. 18 CONTINUACIÓN

C

Plasma SCAT169 de voluntario sano frente a Ataque de HAE



D

HAE Basal de SCAT169 frente a Ataque

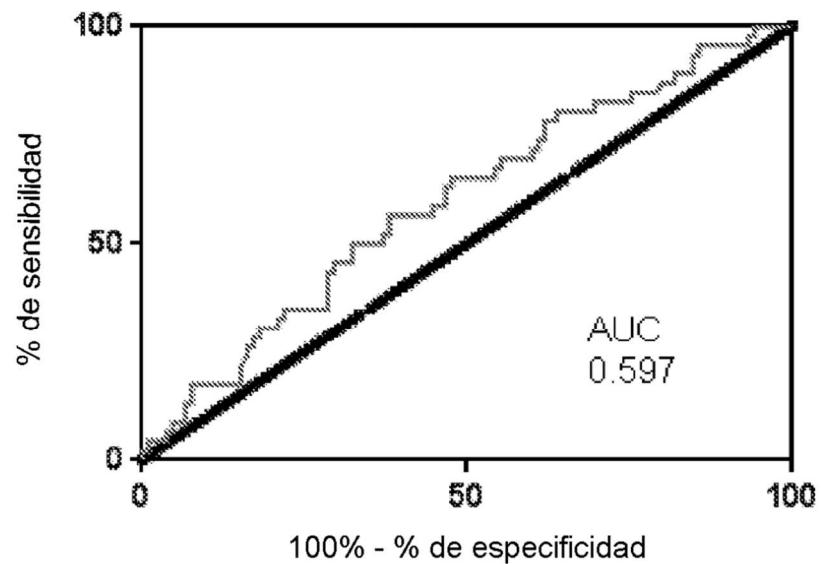
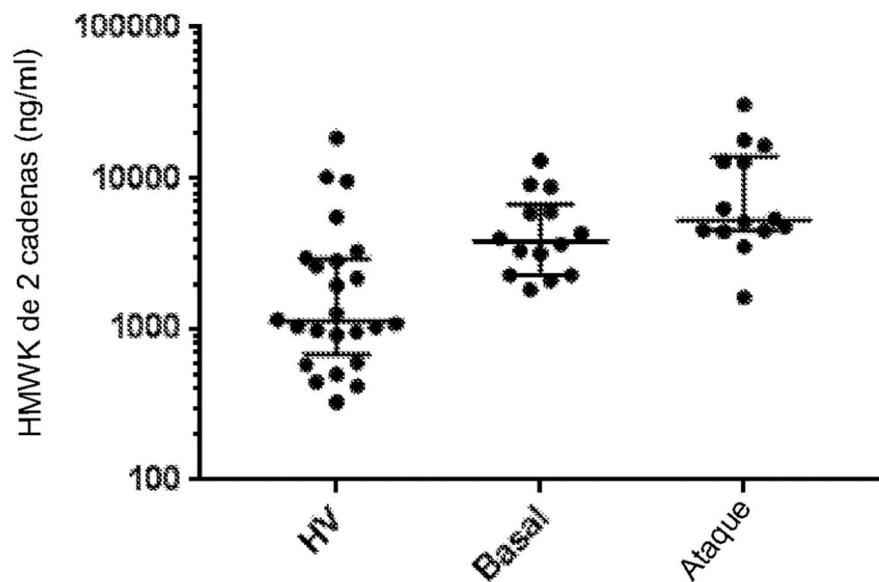


FIG. 19

A

HMWK de 2 cadenas en plasma humano con NaCit



B

Plasma con NaCit de voluntario sano frente a HAE Basal

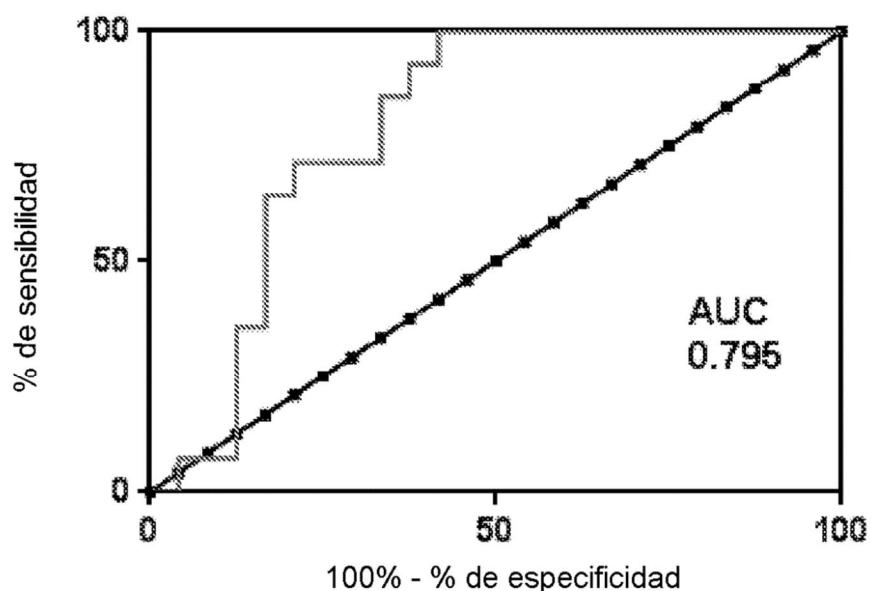
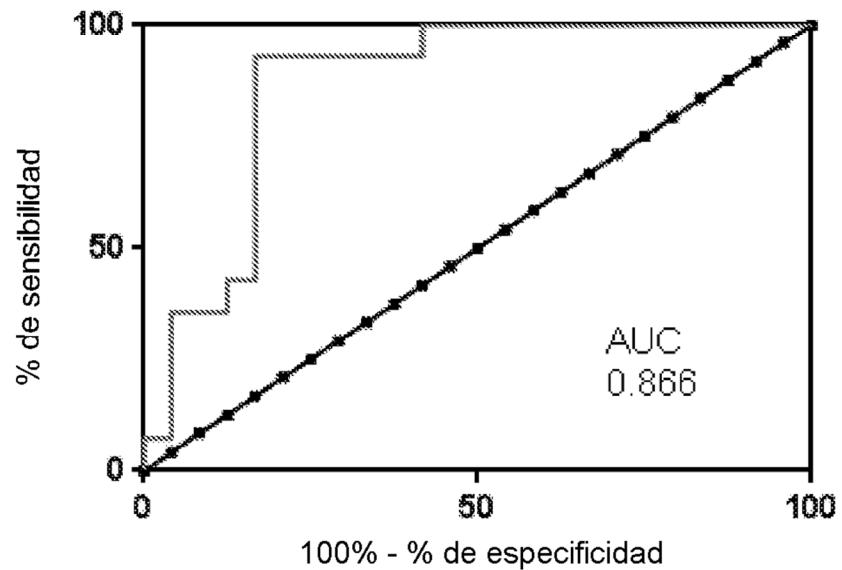


FIG. 19 CONTINUACIÓN

C

Plasma con NaCit de voluntario sano frente a Ataque de HAE



D

Plasma con NaCit de HAE Basal frente a Ataque

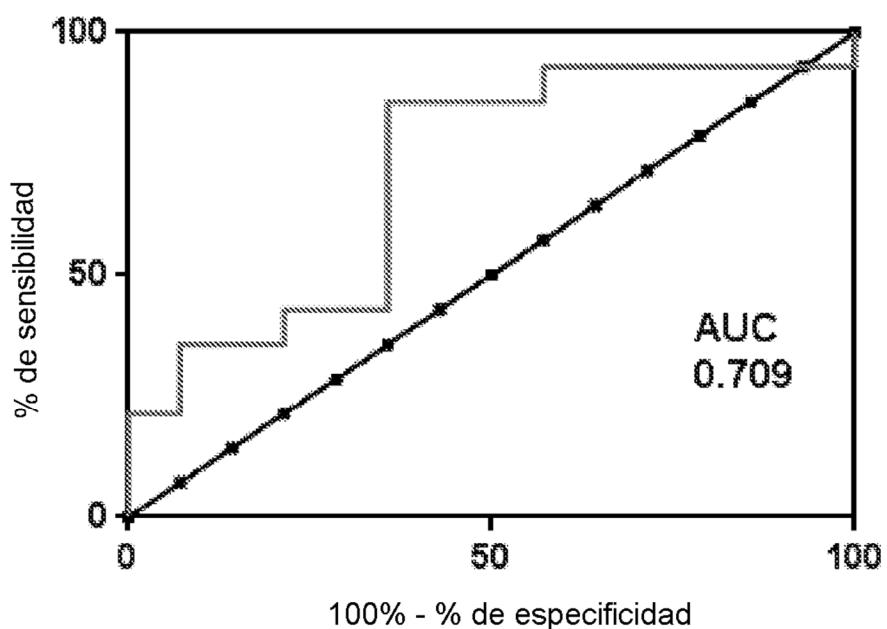
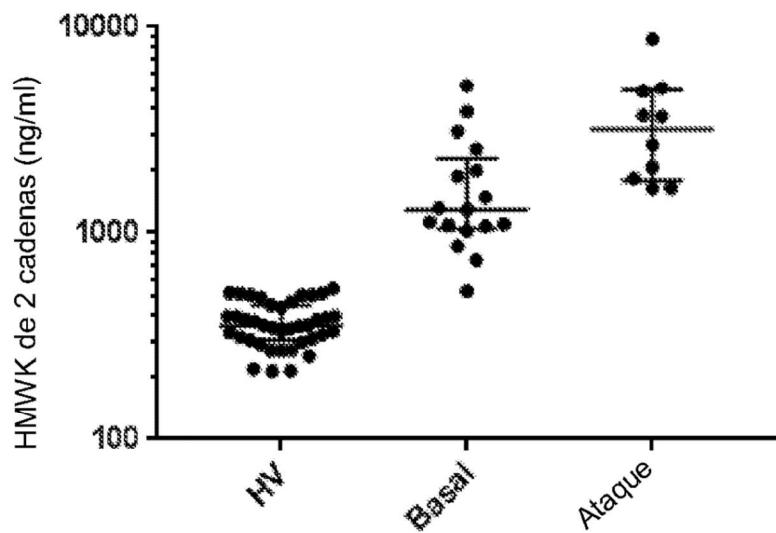


FIG. 20

A

HMWK de 2 cadenas en plasma humano SCAT169



B

Plasma SCAT169 de voluntario sano frente a HAE Basal

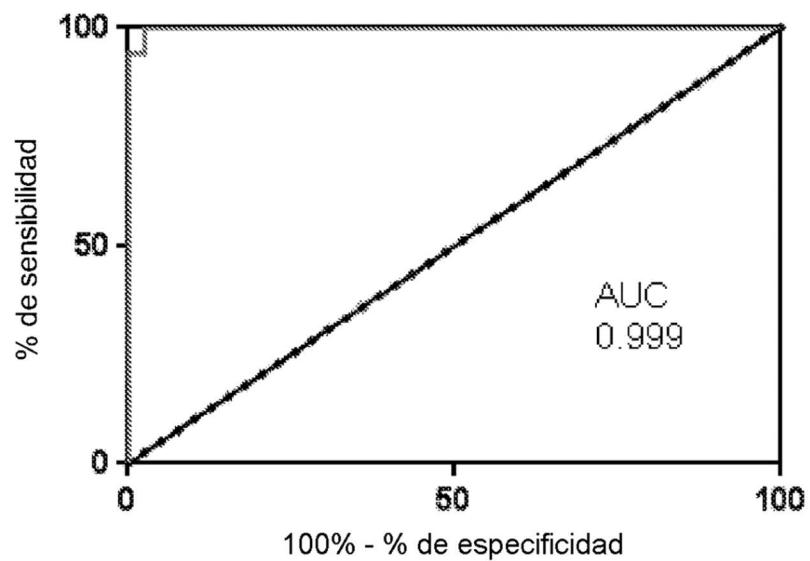
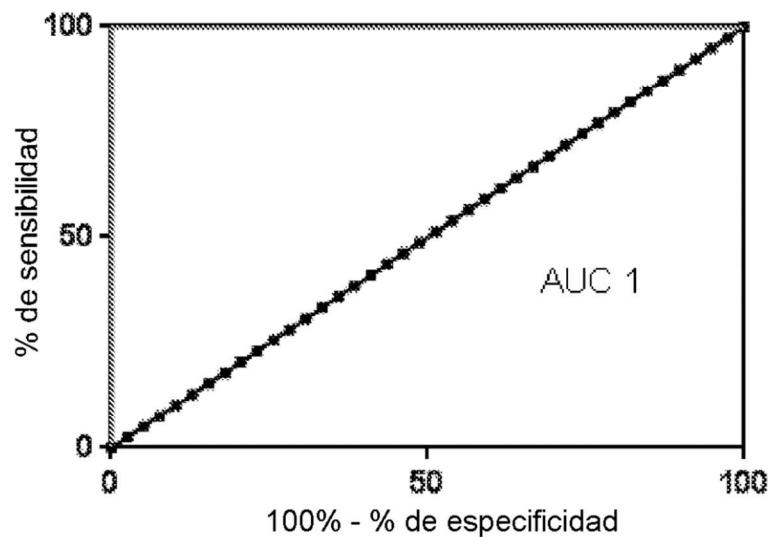


FIG. 20 CONTINUACIÓN

C

Plasma SCAT169 de voluntario sano frente a Ataque de HAE



D

SCAT169 de HAE Basal frente a Ataque

