

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-511823

(P2016-511823A)

(43) 公表日 平成28年4月21日(2016.4.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 L	4 C O 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H O 4 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-553864 (P2015-553864)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月17日 (2014. 1. 17)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年7月13日 (2015. 7. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/012107
 (87) 国際公開番号 W02014/113712
 (87) 国際公開日 平成26年7月24日 (2014. 7. 24)
 (31) 優先権主張番号 61/754, 607
 (32) 優先日 平成25年1月20日 (2013. 1. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 513168518
 ダイアックス コーポレーション
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
 1 8 0 3 - 2 7 5 6, バーリントン, 5 5
 ネットワーク ドライブ
 (74) 代理人 100114775
 弁理士 高岡 亮一
 (74) 代理人 100121511
 弁理士 小田 直
 (74) 代理人 100202751
 弁理士 岩堀 明代
 (74) 代理人 100191086
 弁理士 高橋 香元

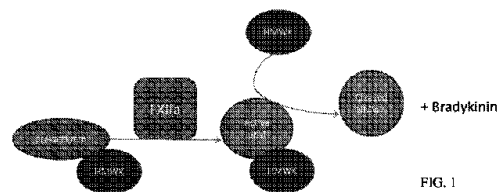
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ブラジキニン媒介障害の評価および治療

(57) 【要約】

本開示は、被験体の試料中の無傷のおよび/または切断されたキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)に基づき、被験体、例えば、p K a 1 媒介またはブラジキニン媒介障害の危険がある、またはこれを患う被験体を評価する方法を提供する。提供される方法により、評価および治療において有用な、血漿カリクレイン媒介血管浮腫(KMA)、またはp K a 1 により媒介される他の疾患を有する患者の分析が可能になる。そのような方法は切断されたキニノーゲンまたは無傷のキニノーゲンに優先的に結合する検出剤の使用を含むことができる。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

p K a l 媒介障害の危険がある、またはこれを有する被験体を同定するための方法であって、

被験体の試料中の切断されたキニノーゲンのレベルおよび無傷のキニノーゲンのレベルを測定すること；

前記切断されたキニノーゲンのレベル、前記無傷のキニノーゲンのレベル、または両方に基づき、前記試料中の前記切断されたキニノーゲンまたは前記無傷のキニノーゲンの値を決定すること；ならびに

前記切断されたキニノーゲンの値または前記無傷のキニノーゲンの値が基準値から逸脱する場合、前記被験体を p K a l 媒介障害の危険がある、またはこれを有するとして同定すること

を含む方法。

【請求項 2】

前記切断されたキニノーゲンまたは前記無傷のキニノーゲンの値は前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージまたは前記無傷のキニノーゲンのパーセンテージである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージが決定され、前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージが基準値にある、またはそれを超える場合、前記被験体は、p K a l 媒介障害の危険がある、またはこれを有するとして同定される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルは、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲン特異的に結合する、検出剤により測定され、任意で前記検出剤は L M W K に結合しない、請求項 1 - 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記検出剤は抗体である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体は、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合し、任意で、L M W K に結合しない、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記検出剤は、切断されたキニノーゲンの軽鎖の C 末端に結合する抗体である、請求項 4 - 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

前記無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルはウエスタンブロットアッセイにより測定される、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料は、血液試料または血漿試料である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記 p K a l 媒介障害は遺伝性血管浮腫 (H A E)、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、またはクローン病である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記方法はさらに、前記被験体が、p K a l 媒介障害の危険がある、またはこれを有するとして同定された場合、有効量の p K a l 阻害剤を被験体に投与することを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記 p K a l 阻害剤は D X - 8 8、E P I K A L - 2 または D X - 2 9 3 0 である、請求項 11 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

前記被験体は、p K a l 媒介障害の症状を有する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記被験体は、抗ヒスタミン療法、コルチコステロイド療法、または両方に耐性がある、請求項 1 - 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記症状は浮腫である、請求項 13 または 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記症状は

腫脹の再発性発作；

完全にまたは主に末梢性である、腫脹；

蕁麻疹；

感染の証拠がない場合の発赤、疼痛、および腫脹；または

ヒスタミンに媒介されない浮腫

である、請求項 13 または 14 に記載の方法。

10

【請求項 17】

前記被験体は、試料を採取した時点で p K a l 媒介障害の症状を有さず、p K a l 媒介障害の症状の病歴を有さず、または p K a l 媒介障害の病歴を有さない、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 18】

障害が p K a l 阻害剤による治療の影響を受けやすいかどうかを決定するための方法であって、

前記障害を有する被験体の試料中の切断されたキニノーゲンのレベルおよび無傷のキニノーゲンのレベルを測定すること；

前記試料中の、切断されたキニノーゲンの値、無傷のキニノーゲンの値、または両方を決定する、；ならびに

前記切断されたキニノーゲンの値が基準値から逸脱する場合、前記障害を、p K a l 阻害剤による治療の影響を受けやすいとして同定すること

を含む、方法。

30

【請求項 19】

前記切断されたキニノーゲンまたは前記無傷のキニノーゲンの値は前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージまたは前記無傷のキニノーゲンのパーセンテージである、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージが決定され、前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージが基準値にある、またはそれを超える場合、前記被験体は、p K a l 媒介障害の危険がある、またはこれを有するとして同定される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルは、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合する検出剤により測定され、任意で前記検出剤は L M W K に結合しない、請求項 18 - 20 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 22】

前記検出剤は抗体である、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記抗体は無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合し、任意で、L M W K に結合しない、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

50

前記検出剤は、切断されたキニノーゲンの軽鎖のC末端に結合する抗体である、請求項21-23のいずれかに記載の方法。

【請求項25】

前記無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルはウエスタンブロットアッセイにより測定される、請求項18~24のいずれか一項に記載の方法。

【請求項26】

前記試料は、血液試料または血漿試料である、請求項18~25のいずれか一項に記載の方法。

【請求項27】

さらに、前記障害が、pKa1阻害剤の治療の影響を受けやすいとして同定された場合、被験体に有効量のpKa1阻害剤を投与することを含む、請求項18-26のいずれか一項に記載の方法。

【請求項28】

前記pKa1阻害剤はDX-88、EPIKAL-2、またはDX-2930である、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

被験体におけるpKa1媒介障害の治療を評価するための方法であって、前記治療前後または前記治療の過程中的前記被験体から採取した試料中の切断されたキニノーゲンのレベルおよび無傷のキニノーゲンのレベルを測定すること；
同じ試料中の切断されたおよび無傷のキニノーゲンのレベルに基づき、各試料中の切断されたキニノーゲンの値、無傷のキニノーゲンの値、または両方を決定すること；ならびに

前記治療の前後または前記治療の過程にわたる、前記試料中の前記切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンの値の変化に基づき、前記治療の有効性を評価することを含む、方法。

【請求項30】

前記切断されたキニノーゲンの値または前記無傷のキニノーゲンは前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージまたは前記無傷のキニノーゲンのパーセンテージである、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージが決定され、前記被験体が、pKa1媒介障害の危険がある、またはこれを有するとして同定され、前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージの前記治療後または前記治療の過程にわたる減少は、前記治療が前記被験体に対して有効であることを示す、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

前記治療は、前記被験体に有効量のpKa1阻害剤を投与することを含む、請求項29-31のいずれか一項に記載の方法。

【請求項33】

前記pKa1阻害剤はDX-88、EPIKAL-2またはDX-2930である、請求項32に記載の方法。

【請求項34】

前記切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルは、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合する検出剤により測定され、前記検出剤は任意でLMWKに結合しない、請求項29-33のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

前記検出剤は抗体である、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

前記抗体は無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合し、任

10

20

30

40

50

意で、L M W K に結合しない、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記検出剤は切断されたキニノーゲンの軽鎖の C 末端に結合する抗体である、請求項 3 4 - 3 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 8】

前記無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルはウエスタンブロットアッセイにより測定される、請求項 2 9 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記試料は、血液試料または血漿試料である、請求項 2 9 - 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記 p K a 1 媒介障害は遺伝性血管浮腫 (H A E)、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、またはクローン病である、請求項 2 9 - 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

治療に必要な被験体に有効量の p K a 1 阻害剤を投与することを含み、前記被験体は、基準値から逸脱する、切断されたキニノーゲンの値、無傷のキニノーゲンの値、または両方を有する、p K a 1 媒介疾患を治療するための方法。

【請求項 4 2】

被験体の p K a 1 媒介疾患を治療するのに使用するための医薬組成物であって、p K a 1 阻害剤および薬学的に許容される担体を含み、前記被験体は基準値から逸脱する、切断されたキニノーゲンの値、無傷のキニノーゲンの値、または両方を有する、組成物。

【請求項 4 3】

試料中の切断されたキニノーゲン、無傷のキニノーゲン、または両方の値を決定するための方法であって、

無傷のおよび切断されたキニノーゲンを含む試料を検出試薬と、前記検出剤と前記無傷のおよび切断されたキニノーゲンの間の相互作用を可能にする条件下で接触させることであって、前記検出剤は無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合し、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合し、任意で前記検出剤 L M W K に結合しない、こと；

前記試料中の前記切断されたキニノーゲンのレベルおよび前記無傷のキニノーゲンのレベルを、それらの前記検出試薬との相互作用に基づき測定すること；ならびに

前記切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンの量に基づき、前記試料中の、前記切断されたキニノーゲンの値、前記無傷のキニノーゲンの値、または両方の値を決定すること

を含む、方法。

【請求項 4 4】

前記切断されたキニノーゲンまたは前記無傷のキニノーゲンの値は前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージまたは前記無傷のキニノーゲンのパーセンテージである、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記切断されたキニノーゲンのパーセンテージが決定される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記検出剤は抗体である、請求項 4 3 - 4 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 7】

前記抗体は無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合し、任意で、L M W K に結合しない、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記検出剤は切断されたキニノーゲンの軽鎖の C 末端に結合する抗体である、請求項 4 3 - 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

前記無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルはウエスタンブロットアッセイにより測定される、請求項 43 - 48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

前記試料は、血液試料または血漿試料である、請求項 43 - 49 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2013年1月20日に提出された米国仮特許出願第61/754,607号の出願日の恩典を主張する。この参照される出願の全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

血漿カリクレイン (pKa1) は循環血液中での主なブラジキニン生成酵素である。pKa1の活性化は遺伝性血管浮腫 (HAE) と関連する疾患病状と関連している接触系を介して起こる。ブラジキニンは疼痛、炎症、浮腫および血管新生の主要メディエーターである。

【0003】

キニノーゲンはキニン、例えばブラジキニンおよびカリクレインの前駆体である。2つの型のヒトキニノーゲン、高分子量キニノーゲン (HMWK) および低分子量キニノーゲン (LMWK) が存在し、それらはスプライシングバリエーションである。HMWKは凝固および炎症に対する補助因子として主に作用し、pKa1媒介ブラジキニン生成のための好ましい基質である。HMWKおよびLMWKはどちらもシステインプロテアーゼインヒビターである。

【発明の概要】

【0004】

血漿カリクレイン (pKa1) は接触系のセリンプロテアーゼ成分であり、循環血液中の主なブラジキニン生成酵素である。接触系は異質または負電荷を持つ表面への曝露での第XIIa因子、または内皮細胞表面上でのプロリルカルボキシペプチターゼにより活性化される (Sainz I. M. et al., Thromb Haemost 98, 77-83, 2007)。血漿カリクレインの活性化は、第XII因子のそのフィードバック活性化による内因性凝固を増幅し、炎症促進性ノナペプチドブラジキニンの産生により炎症を増強させる。循環血液中の主なキニノーゲンとして、pKa1は脈管構造内でのブラジキニンの生成に大きな役割を果たす。C1インヒビタータンパク質 (C1-INH)、血漿カリクレインの主な天然インヒビターにおける遺伝的欠損により、遺伝性血管浮腫 (HAE) が引き起こされる。HAE患者は未知のトリガーによりしばしば誘発される有痛性浮腫の急性発作に苦しんでいる (Zuraw B. L. et al., N Engl J Med 359, 1027-1036, 2008)。動物モデルにおける薬理作用薬の使用または遺伝学的研究を通して、血漿カリクレイン-キニン系 (血漿KKS) は様々な疾患に関連している。

【0005】

本明細書に記載されるように、ウエスタンブロットアッセイは、特異的に (例えば、優先的に) 無傷のキニノーゲンまたは切断されたキニノーゲンのいずれかに結合し、任意で、LMWKに結合しない検出試薬 (例えば、抗体) を使用する、無傷の (1-鎖) および切断された (2-鎖) 高分子量キニノーゲン (HMWK) の検出のために開発された。そのような検出試薬は、患者血漿中の1-鎖および2-鎖HMWKの相対量をモニタするために使用することができる。この方法を適用することにより、患者試料中の切断されたキニノーゲンのレベル (例えば、パーセンテージ) は、過剰なpKa1活性化により媒介さ

10

20

30

40

50

れることが知られている疾患状態、例えば浮腫性HAE発作において上昇することが見出された。他の疾患を有する患者の血漿中の切断されたキニノーゲンパーセントはその後、試験することができ、活性pKa1が疾患と関連するかどうか決定される。試験され、健康な血漿に比べ、切断されたキニノーゲンの上昇を有することが示された他の疾患としては、関節リウマチ(RA)、潰瘍性大腸炎(UC)、およびクローン病が挙げられる。

【0006】

したがって、本開示の1つの態様は、pKa1媒介障害の危険がある、またはこれを有する被験体を同定するための方法に関し、方法は下記を含む：(a)例えば、ウエスタンブロットアッセイにより、被験体の試料(例えば、血液試料または血漿試料)中の、切断されたキニノーゲン(例えば、HMWK)のレベルおよび無傷のキニノーゲン(例えば、HMWK)のレベルを測定すること；(b)試料中の、切断されたキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、無傷のキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、または両方を決定すること；ならびに(c)切断されたキニノーゲンの値、無傷のキニノーゲンの値、または両方が基準値から逸脱する場合、被験体をpKa1媒介障害の危険がある、またはこれを有するとして同定すること。いくつかの例では、切断されたキニノーゲンのパーセンテージが決定され、試料中の切断されたキニノーゲンのパーセンテージが基準値にある、またはそれを超える場合、被験体は、標的疾患の危険がある、またはこれを有するとして同定される。

10

【0007】

いくつかの実施形態では、切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルは、切断されたまたは無傷のキニノーゲンのいずれかに特異的に(例えば、優先的に)結合する検出剤(例えば、抗体)により測定される。そのような検出剤(例えば、抗体)は、無傷のおよび切断されたキニノーゲンの両方に結合することができるが、LMWKに結合しない。他の実施形態では、切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルは、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合する検出剤(例えば、抗体)により測定される。1つの例では、検出試薬は、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する抗体である。別の例では、検出剤は、LMWK中に存在しない、切断されたキニノーゲンの軽鎖のC末端に結合する抗体である

20

【0008】

pKa1媒介障害は遺伝性血管浮腫(HAE)、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、またはクローン病とすることができる。被験体が、pKa1媒介障害の危険がある、またはこれを有するとして同定される場合、本明細書に記載される方法はさらに有効量のpKa1阻害剤を被験体に投与することを含むことができる。いくつかの例では、pKa1阻害剤はDX-88、EPIKAL-2またはDX-2930である。

30

【0009】

いくつかの実施形態では、試料は、pKa1媒介障害の症状を有する被験体由来であり、限定はされないが、浮腫、腫脹の再発性発作、腫脹(前記腫脹は完全にまたは主に末梢性である)、蕁麻疹、感染の証拠がない場合の発赤、疼痛、および腫脹；またはヒスタミンに媒介されない浮腫が挙げられる。他の実施形態では、試料は、試料を採取した時点でpKa1媒介障害の症状を有さない、pKa1媒介障害の症状の病歴を有さない、またはpKa1媒介障害の病歴を有さない被験体由来である。あるいは、または加えて、被験体は、抗ヒスタミン療法、コルチコステロイド療法、または両方に耐性がある。

40

【0010】

別の態様では、本開示は、障害がpKa1阻害剤による治療の影響を受けやすいかどうかを決定するための方法を提供し、方法は下記を含む：(a)障害を有する被験体の試料(例えば、血液試料または血漿試料)中の切断されたキニノーゲン(例えば、HMWK)のレベルおよび無傷のキニノーゲン(例えば、HMWK)のレベルを測定すること；(b)試料中の、切断されたキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、無傷のキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、または両方を決定すること；ならびに(c)切断

50

されたキニノーゲンの値、無傷のキニノーゲンの値、または両方が基準値から逸脱する場合、障害を、pKa1阻害剤による治療の影響を受けやすいとして同定すること。1つの例では、切断されたキニノーゲンのパーセンテージが決定され、切断されたキニノーゲンのパーセンテージが基準値にある、またはそれを超える場合、疾患は治療の影響を受けやすいとして同定される。

【0011】

いくつかの実施形態では、切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルは、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合する検出剤（例えば、抗体）により測定される。いくつかの例では、検出試薬は、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する抗体である。他の実施例では、検出試薬は、切断されたキニノーゲンの軽鎖のC末端に結合する抗体である。本明細書で記載される方法のいずれにおいても、無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルはウエスタンブロットアッセイにより測定することができる。

10

【0012】

障害が、pKa1阻害剤の治療の影響を受けやすいとして同定された場合、方法はさらに被験体に有効量のpKa1阻害剤を投与することを含むことができ、これらとしては、DX-88、EPIKAL-2、またはDX-2930が挙げられるが、それらに限定されない。

20

【0013】

さらに別の態様では、本開示は、被験体におけるpKa1媒介障害の治療を評価するための方法を提供し、方法は下記を含む：(a)治療前後または治療の過程に被験体から採取された試料（例えば、血液試料または血漿試料）中の、切断されたキニノーゲン（例えば、HMWK）のレベルおよび無傷のキニノーゲン（例えば、HMWK）のレベルを測定すること；(b)同じ試料中の切断されたおよび無傷のキニノーゲンのレベルに基づき、各試料中の切断されたキニノーゲンの値（例えば、パーセンテージ）、無傷のキニノーゲンの値（例えば、パーセンテージ）、または両方を決定すること；ならびに(c)治療の前後または治療の過程にわたる、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンの値の変化に基づいて治療の有効性を評価すること。例えば、治療後または治療の過程にわたる切断されたキニノーゲンパーセンテージの減少は、治療が被験体に対して有効であることを示す。いくつかの実施形態では、治療は被験体に有効量のpKa1阻害剤、例えば、DX-88、EPIKAL-2またはDX-2930を投与することを含む。

30

【0014】

本明細書で記載される評価方法のいずれにおいても、切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルは、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合する検出剤（例えば、抗体）により測定することができる。いくつかの例では、検出試薬は無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する抗体である。他の例では、検出剤は切断されたキニノーゲンの軽鎖のC末端に結合する抗体である。本明細書で記載される方法のいずれにおいても、無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルはウエスタンブロットアッセイにより測定することができる。

40

【0015】

いくつかの実施形態では、pKa1媒介障害は遺伝性血管浮腫（HAE）、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、またはクローン病である。

【0016】

さらに、本開示は、試料中の、切断されたキニノーゲンの値、無傷のキニノーゲンの値、または両方を決定するための方法を提供し、方法は下記を含む：(a)無傷のおよび切断されたキニノーゲンを含む試料（例えば、血液試料または血漿試料）を検出試薬と、検出剤と無傷のおよび切断されたキニノーゲンの間の相互作用を可能にする条件下で接触させることであって、検出剤は無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異

50

的に結合し、または切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合する、こと；(b)それらの検出試薬との相互作用に基づき、試料中の切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルを測定すること；ならびに(c)切断されたキニノーゲンおよび無傷のキニノーゲンのレベルに基づき、試料中の、切断されたキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、無傷のキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、または両方を決定すること。いくつかの実施形態では、検出試薬は抗体、例えば、切断されたキニノーゲンと比べて無傷のキニノーゲンに特異的に結合する抗体、または切断されたキニノーゲンの軽鎖のC末端に結合する抗体である。いくつかの実施形態では、無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンの量はウエスタンブロットアッセイにより測定される。

10

【0017】

下記もまた、本開示の範囲内にある：(i)治療に必要な被験体に、有効量の、本明細書で記載されるpKa1阻害剤を投与することを含む、pKa1媒介疾患を治療するための方法であって、被験体は、基準値から逸脱する、切断されたキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、無傷のキニノーゲンの値(例えば、パーセンテージ)、または両方を有する、方法、(ii)被験体のpKa1媒介疾患を治療するのに使用するための医薬組成物であって、組成物はpKa1阻害剤および薬学的に許容される担体を含み、被験体は、基準値と比べて、切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンの逸脱した値を有する、医薬組成物、ならびに(iii)pKa1媒介疾患、例えば、HAEを治療するのに使用するための薬剤を製造するための医薬組成物の使用。いくつかの実施形態では、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンの値は、試料中の、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのパーセンテージである。

20

【0018】

下記実施形態もまた、本開示の範囲内にある：

【0019】

被験体、例えば、pKa1媒介またはブラジキニン媒介障害の危険がある、またはこれらを患う被験体を評価する方法が、本明細書で提供される。提供される方法により、評価および治療において有用な、血漿カリクレイン媒介血管浮腫(KMA)、またはpKa1により媒介される他の疾患を有する患者の分析が可能になる。

30

【0020】

本開示の実施形態は、バイオマーカーおよび、患者、例えば、血漿カリクレインにより生成されるブラジキニンにより引き起こされる浮腫を患う患者の同定および治療におけるその使用を提供する。本明細書で開示される方法、組成物および装置は、多くの点で有用である。例えば、pKa1マーカーのレベルは、上昇した接触系活性化と関連する障害を同定するために使用することができる。初期スクリーニングに続いて、例えば、疾患の前臨床モデルにおいて、血漿カリクレイン阻害剤(例えばDX-88、EPIKAL2、またはDX-2930)によるインビトロまたはインビボ試験を用いて実施することができる。本明細書で開示されるマーカーはまた、薬学的バイオマーカーとして、または別のやり方で、被験体のカリクレイン阻害剤に対する応答をモニタするために使用することができる。本明細書で開示されるマーカーはコンパニオン診断で使用することができ、血漿カリクレインにより媒介される疾患の治療が可能になり、pKa1媒介またはブラジキニン媒介障害、例えば、下記の予防的療法中の用量が管理される：HAE、ヒスタミン非依存性特発性血管浮腫、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、ループス、アルツハイマー病、敗血症性ショック、熱傷、脳虚血/再灌流傷害、脳浮腫、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、黄斑浮腫、血管炎、動脈または静脈血栓症、補助人工心臓またはステントと関連する血栓症、血栓症を伴うヘパリン誘導血小板減少症、血栓塞栓性疾患、および不安定狭心症を伴う冠動脈心疾患、浮腫、眼疾患、痛風、腸疾患(intestinal bowel disease)、口腔粘膜炎、神経障害性疼痛、炎症痛、脊柱管狭窄-変性脊椎疾患、術後イレウス、大動脈瘤、変形性関節症、遺伝性血管浮腫、肺塞栓症、脳卒中、頭部外傷またはペリ腫瘍(peritumor)脳浮腫、敗血症、急性中大脳動脈(M

40

50

C A) 虚血性イベント(脳卒中)、再狭窄(例えば、血管形成術後)、全身性エリテマトーデス腎炎(systemic lupus erythematositis nephritis)、自己免疫疾患、炎症疾患、心血管疾患、神経疾患、タンパク質ミスフォールディングと関連する疾患、血管新生と関連する疾患、高血圧性腎症および糖尿病性腎症、アレルギー性および呼吸器疾患(例えばアナフィラキシー、喘息、慢性閉塞性肺疾患、急性呼吸促進症候群、嚢胞性線維症、持続性、鼻炎)および組織傷害(例えば火傷または化学的損傷)。

【0021】

本開示は被験体を評価または治療する、例えば、pKa1媒介障害、例えば、ブラジキニン媒介血管浮腫をヒスタミン媒介障害から区別する、またはpKa1媒介障害の将来の発作を予想する方法を提供し、これは、本明細書で開示される、pKa1活性化と関連する1つ以上のマーカー(pKa1マーカー)、例えば、無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルを取得する、例えば決定すること、これによって、前記被験体を評価または治療することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、ヒスタミン媒介炎症反応と関連する1つ以上のマーカー(H-マーカー)、例えば、トリプターゼのレベルを取得する、例えば、検出することを含む。

10

【0022】

いくつかの実施形態では、前記pKa1媒介障害はHAE、IAE、IBD、またはIBSである。いくつかの実施形態では、前記pKa1媒介障害は下記から選択される：ヒスタミン非依存性特発性血管浮腫、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、ループス、アルツハイマー病、敗血症性ショック、熱傷、脳虚血/再灌流傷害、脳浮腫、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、黄斑浮腫、血管炎、動脈または静脈血栓症、補助人工心臓またはステントと関連する血栓症、血栓症を伴うヘパリン誘導血小板減少症、血栓塞栓性疾患、および不安定狭心症を伴う冠動脈心疾患、浮腫、眼疾患、痛風、腸疾患、口腔粘膜炎、神経障害性疼痛、炎症痛、脊柱管狭窄-変性脊椎疾患、術後イレウス、大動脈瘤、変形性関節症、遺伝性血管浮腫、肺塞栓症、脳卒中、頭部外傷またはペリ腫瘍脳浮腫、敗血症、急性中大脳動脈(MCA)虚血性イベント(脳卒中)、再狭窄(例えば、血管形成術後)、全身性エリテマトーデス腎炎、自己免疫疾患、炎症疾患、心血管疾患、神経疾患、タンパク質ミスフォールディングと関連する疾患、血管新生と関連する疾患、高血圧性腎症および糖尿病性腎症、アレルギー性および呼吸器疾患(例えばアナフィラキシー、喘息、慢性閉塞性肺疾患、急性呼吸促進症候群、嚢胞性線維症、持続性、鼻炎)および組織傷害(例えば火傷または化学的損傷)。

20

30

【0023】

本開示はまた、被験体を評価または治療する方法を提供し、前記被験体はpKa1媒介障害、例えば、ブラジキニン媒介血管浮腫、およびヒスタミン関連障害の両方と一致する症状を有し、方法は下記を含む：a)任意で、前記被験体が、pKa1媒介障害およびヒスタミン関連障害の1つまたは両方と一致する症状、例えば、浮腫または腹部不快感を有することを決定すること；b)前記被験体が前記症状のために抗ヒスタミン療法で治療されていない場合、それから、前記被験体を抗ヒスタミン療法で治療すること；c)pKa1活性化と関連する1つ以上のマーカー(pKa1マーカー)、例えば、無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルを取得する、例えば、検出すること；d)前記レベルがあらかじめ決められた判断基準を満たす場合、例えば、それが基準レベルにある、またはそれを超える場合：被験体をカリクレイン阻害剤療法のために選択すること；またはカリクレイン阻害剤を前記被験体に投与し、これによって、前記被験体を評価または治療すること。いくつかの実施形態では、方法は被験体をカリクレイン阻害剤療法のために選択することを含む。ある一定の実施形態では、方法はカリクレイン阻害剤を前記被験体に投与することを含む。特定の実施形態では、カリクレイン阻害剤療法のための被験体の選択；またはカリクレイン阻害剤を前記被験体に投与することは、被験体が前記抗ヒスタミン療法に反応しないことを決定する前に起こり、例えば、抗ヒスタミン療法による前記治療の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10時間以内に起こる。いくつ

40

50

かの実施形態では、前記被験体が p K a l 媒介障害およびヒスタミン関連障害の両方と一致する症状を有することを決定すること、ならびに p K a l マーカーのレベルを決定するための前記患者由来の試料の取得は、互いの 30 分、1、2 または 3 時間以内；またはヘルスケア提供者への同じ訪問において起こる。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、前記 p K a l 阻害剤は D X - 8 8、D X - 2 9 3 0、または E p i K a l - 2 から選択される。

【 0 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、方法は、ヒスタミン媒介炎症反応と関連する 1 つ以上のマーカー（H - マーカー）のレベルを取得する、例えば、決定することを含む。ある一定の実施形態では、前記被験体は p K a l 媒介障害に対する易罹患性について評価される。ある一定の実施形態では、前記被験体は p K a l 媒介障害、例えば、浮腫、例えば、H A E の、例えば、これと一致する症状を有する。ある一定の実施形態では、前記被験体は望まれない p K a l 活性化により特徴付けられる障害の症状を有し、前記被験体は抗ヒスタミン療法が投与されている。特定の実施形態では、前記抗ヒスタミン療法は、本明細書で開示される決定工程の前後 1、2、3、4、5、6、7、8、8 または 10 時間以内に投与される。特定の実施形態では、方法はさらに、抗ヒスタミン療法を、例えば、本明細書で開示される評価または決定前後、または中に前記被験体に投与することを含む。

10

【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態では、前記決定または評価に応答して、カリクレイン阻害剤を前記被験体に投与すること。ある一定の実施形態では、前記被験体は下記症状または特性の 1 つ以上または全てを有し：腫脹の再発性発作；腫脹、ここで前記腫脹は完全にまたは主に末梢性であり、例えば、被験体は著しい腹部または気道腫脹を有さず；蕁麻疹；感染の証拠がない場合の発赤、疼痛、および腫脹；抗ヒスタミン薬またはコルチコステロイド療法に応答することができず；またはヒスタミンに媒介されない浮腫を有する。ある一定の実施形態では、前記被験体は持続性または再発性浮腫を有し、抗ヒスタミンおよびステロイド療法の 1 つまたは両方に対し非応答性である。ある一定の実施形態では、被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D、または I B S の病歴を有さず；被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D、または I B S の病歴を有し、被験体は H A E の病歴を有さず；被験体は H A E の病歴を有し；被験体は I A E の病歴を有さず；被験体は I A E の病歴を有し；被験体は I B D または I B S の病歴を有さず；被験体は I B D または I B S の病歴を有し；被験体はヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有さず；被験体は、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有し；被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有さず、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有さず；または被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有さず、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有し；被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有し、ヒスタミン媒介障害、食物アレルギーの病歴を有さず；または被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有し、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有する。

20

30

40

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態では、被験体は、例えば、予防療法において、例えば、H A E ために、カリクレイン阻害剤で治療されており、被験体のカリクレイン阻害剤に対する応答が評価され、またはモニタされ、および任意で、前記モニタリングに応じて、療法が選択され、または投与され、例えば、決定に応じて、カリクレイン阻害剤の用量が調整される。いくつかの実施形態では、p K a l マーカーの決定は、コンパニオン診断との関連で実施され、任意で、決定に基づいて治療薬の投与が与えられ、または保留される。ある一定の実施形態では、対応して、前記治療は切迫急性発作、例えば H A E または I E A 発作を同定することに依存する。特定の実施形態では、前記被験体は特発性血管浮腫に対する易罹

50

患性について評価される。特定の実施形態では、前記評価は、前記被験体が p K a l 媒介障害、例えば、ブラジキニン媒介障害、例えば、p K a l 媒介血管浮腫、またはヒスタミン媒介障害、例えば、アレルギー性食物反応を患っているかを決定することを含む。

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態では、被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E または I A E の病歴を有さない。いくつかの実施形態では、被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E または I A E の病歴を有する。いくつかの実施形態では、被験体は p K a l 媒介障害の病歴、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S を有さず；被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有し、被験体は H A E の病歴を有さず；被験体は H A E の病歴を有し；被験体は I A E の病歴を有さず；被験体は I A E の病歴を有し；被験体は I B D または I B S の病歴を有さず；被験体は I B D または I B S の病歴を有し；被験体は、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有さず；被験体はヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有し；被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有さず、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有さず；または被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有さず、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有し；被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有し、ヒスタミン媒介障害、食物アレルギーの病歴を有さず；または被験体は p K a l 媒介障害、例えば、H A E、I A E、I B D または I B S の病歴を有し、ヒスタミン媒介障害、例えば、食物アレルギーの病歴を有する。

10

20

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態では、p k a マーカー、例えば、本明細書で開示される p K a l マーカー、は抗体に基づく試薬により検出される。ある一定の実施形態では、p K a l マーカーは、サンドイッチ免疫 - アッセイにより検出される。ある一定の実施形態では、方法は、例えば、電気泳動 (e l e c t r o p h o r i e t i c) 分離アッセイ、例えば、ウエスタンブロットにより、キニノーゲン、例えば、無傷のまたは切断されたキニノーゲンの 1 つまたは両方のレベルを取得する、例えば、検出することを含む。いくつかの実施形態では、p K a l マーカー、例えば、キニノーゲンは、分析物の他の生成物からの分離、例えば、ウエスタンブロットによる、例えば、電気泳動分離に依存するアッセイにおいて検出される。

30

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態では、p K a l マーカーは、サンドイッチ免疫 - アッセイにより検出され、第 2 の p K a l マーカー、例えば、キニノーゲンは、分析物の他の生成物からの分離、例えば、ウエスタンブロットによる、例えば、電気泳動分離に依存するアッセイにおいて検出される。ある一定の実施形態では、p K a l マーカーの検出は定性的である。ある一定の実施形態では、p K a l マーカーの検出は定量的である。特定の実施形態では、無傷のキニノーゲンおよび切断されたキニノーゲンのレベルがそれぞれ検出される。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態では、方法は、p K a l マーカー、例えば、無傷のキニノーゲンまたは切断されたキニノーゲンのレベルを基準値と比較することを含む。ある一定の実施形態では、前記基準値は H A E における、例えば、1 以上の H A E 被験体における前記 p K a l マーカーのレベルの関数である。ある一定の実施形態では、前記基準値は、発作中の H A E における、例えば、急性発作中の 1 以上の H A E 被験体における、前記 p K a l マーカーのレベルの関数である。ある一定の実施形態では、前記基準値は I A E における、例えば、1 以上の I A E 被験体における p K a l マーカーのレベルの関数である。ある一定の実施形態では、前記基準値は急性発作中の I A E における、例えば、急性発作中の 1 以上の I A E 被験体における p K a l マーカーのレベルの関数である。ある一定の実施形態では、前記基準値は H A E または I A E がいない場合の、例えば、H A E または I A E の病歴がない 1 以上の被験体における p K a l マーカーのレベルの関数である。

40

【 0 0 3 2 】

50

特定の実施形態では、方法は、例えば、比較に応じて、被験体を分類する、例えば、被験体を、pKa1 媒介障害の危険に対して分類すること、または前記被験体に療法を投与する、または保留することを含む。ある一定の実施形態では、方法は、例えば、比較に応じて、前記被験体に対する治療を選択することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、例えば、比較に応じて、前記被験体に療法、例えば下記を投与する、または保留することを含む：カリクレイン結合剤；ブラジキニンB2 受容体アンタゴニスト；またはC1-INH 補充剤。特定の実施形態では、前記治療はpKa1 阻害剤、例えば、DX-88；Epika1-2、およびDX-2930 から選択されるpKa1 阻害剤の投与である。
【0033】

いくつかの実施形態では、前記被験体由来の試料は、例えば下記からの2つ以上のマーカーのための捕捉剤を含む基材と接触させられ：pKa1 マーカーまたはH マーカー、例えば、抗H マーカー抗体；任意で、少なくとも1つの捕捉剤は、pKa1 マーカーのための捕捉剤である。

【0034】

いくつかの実施形態では、方法は、前記被験体から、試料、例えば、血液または血漿試料を取得することを含む。

【0035】

いくつかの実施形態では、第1の捕捉剤（第1のマーカーのため）および第2の捕捉剤（第2のマーカーのため）が基材上に配置され、第1のマーカーの存在に対するシグナルは第2のマーカーの存在に対するシグナルから区別することができる。ある一定の実施形態では、前記第1の捕捉剤（第1のマーカーのため）は、第1の位置またはアドレスに配置され、前記第2の捕捉剤（第2のマーカーのため）は、第2の位置またはアドレスに配置される。特定の実施形態では、前記第1の位置またはアドレスおよび前記第2の位置またはアドレスは前記基材上で重ならない。ある一定の実施形態では、前記第1の捕捉剤は第1のpKa1 マーカーのためである。ある一定の実施形態では、前記第1の捕捉剤は第1のpKa1 マーカーのためであり、前記第2の捕捉剤は第2のpKa1 マーカーのためである。ある一定の実施形態では、前記第1の捕捉剤はpKa1 マーカーのためであり、前記第2の捕捉剤はH-マーカーのためである。

【0036】

ある一定の実施形態では、方法は、基材を検出可能な、例えば、抗体と接触させ、pKa1 マーカーの存在または量を決定することを含む。ある一定の実施形態では、前記抗体は、着色生成物を生成する、光子を放出する、光子を吸収する、基材を変化させる、または基材の導電率を変化させる部分で標識される。ある一定の実施形態では、前記抗体は、電気化学発光を利用する部分で標識される。ある一定の実施形態では、前記抗体は、レジニウム (resinium) で標識される。特定の実施形態では、前記基材はメソスケールディスカバリ (meso scale discovery) 装置において提供される。特定の実施形態では、前記基材は、血液および血漿の1つまたは両方と共に使用するのに好適なディップスティック装置として提供される。特定の実施形態では、前記第1の捕捉剤および前記第2の捕捉剤は、共通のまたは流動的に接続されたチャンバ、例えば、1つのチャンバ、例えば、1つのウェルまたは凹み、マルチチャンバ装置、例えば、マルチウェルプレート中に配置される。特定の実施形態では、前記第1の捕捉剤および前記第2の捕捉剤は基材上にプリントされる。

【0037】

いくつかの実施形態では、第1のpKa1 マーカーのための前記捕捉剤は前記基材上の第1の位置にあり、第2のpKa1 マーカーのための前記捕捉剤は前記基材上の第2の位置にあり、前記第1および第2の位置は、前記基材上に、第1のpKa1 マーカーの存在に対するシグナルが、第2のpKa1 マーカー由来のシグナルから区別できるように配置される。ある一定の実施形態では、前記基材は第3の位置に第3のマーカーのための捕捉剤を含み、第3の位置は、前記基材上に、第3のマーカーの存在に対するシグナルが前記第1および第2のマーカー由来のシグナルから区別できるように配置される。

10

20

30

40

50

【0038】

いくつかの実施形態では、試料中の p K a l マーカーのレベルの決定は、基材の前記試料との接触の 1、2、3、4、または 5 時間以内に実施することができる。いくつかの実施形態では、試料中の 2 つの p K a l マーカーのレベルの決定は基材の前記試料との接触の 1、2、3、4、または 5 時間以内に実施することができる。いくつかの実施形態では、2 つの p K a l マーカーのレベルの決定は、同時に実施されるアッセイにおいて行われ、例えば、試験のためのインキュベーションまたは他の間隔は、互いに重なる。

【0039】

別の態様では、本発明は、例えば、本明細書に記載される複数の p K a l マーカーのための捕捉剤を含む基材を提供する。

10

【0040】

さらなる態様では、本発明は、障害が p K a l 阻害剤による治療の影響を受けやすいかどうかを決定する方法を提供し、方法は下記を含み：例えば、前記障害を患う被験体、または前記障害のための動物モデルにおいて、例えば、本明細書に記載される 1 つまたは複数の p K a l マーカーのレベルを評価すること；決定されたレベルを基準と比較すること、ここで、あらかじめ決められた判断基準を満たすレベル、例えば、それが基準レベルにある、またはそれを超える場合、障害は p K a l 阻害剤による治療の影響を受けやすいことを示す。いくつかの実施形態では、方法はカリクレイン阻害剤の影響を、インビトロまたはインビボで、または前記障害の動物モデルにおいて評価することを含む。

【0041】

20

別の態様では、本発明は、下記を含む、p K a l 媒介障害、例えば、ブラジキニン媒介障害を有する被験体を治療する方法を提供する：例えば、本明細書に記載される方法により、本明細書に記載される p K a l マーカーのレベルを評価すること、決定すること、ならびに前記評価に応じて、治療を選択すること、例えば、カリクレイン阻害剤の投与量または投与頻度の 1 つまたは両方を選択すること。いくつかの実施形態では、方法はカリクレイン阻害剤を前記被験体に投与することを含む。いくつかの実施形態では、前記患者は、前記評価前に、カリクレイン阻害剤が投与されている。ある一定の実施形態では、方法は、前記選択された用量または頻度でカリクレイン阻害剤を投与することを含む。

【0042】

30

さらなる態様では、本発明は、下記を含む、障害が p K a l 阻害剤による治療の影響を受けやすいかどうかを決定する方法を提供し：例えば、前記障害を患う被験体、または前記障害のための動物モデルにおいて、例えば、本明細書に記載される 1 つまたは複数の p K a l マーカーのレベルを評価すること；決定されたレベルを基準と比較すること、ここで、あらかじめ決められた判断基準を満たすレベルは、例えば、それが基準レベルにある、またはそれを超える場合、障害は p K a l 阻害剤による治療の影響を受けやすいことを示す。いくつかの実施形態では、方法はカリクレイン阻害剤の影響を、インビトロまたはインビボで、または前記障害の動物モデルにおいて評価することを含む。

【0043】

40

別の態様では、発明は、最小限の接触活性化で、試料、例えば、血液を採取するための方法および装置を特徴とする。一実施形態では、発明は、その中に、本明細書に記載される捕捉試薬、例えば、カリクレイン阻害剤、例えば、配列が D X - 8 8 と同様のポリペプチド、例えば、D X - 8 8 と、1、2、または 5 以下のアミノ酸残基だけ異なるもの、例えば、E P I K A L - 2 が配置された容器を特徴とする。容器は、例えば、開口部、開口、セプタム、などを有するように構成され、よって、試料、例えば、血液の被験体からの採取および試料中の p K a l 関連マーカー、例えば、p K a l の捕捉試薬との結合が、同じ容器内で可能になる。結合された種、例えば、p K a l の測定は同じ容器内で実施することができる、あるいは実施形態では、基材は容器から測定前に除去され、例えば、測定は別の装置上または内で実施することができる。実施形態では、容器の体積は 0 . 5 - 1 0 0、0 . 5 - 5 0、. 5 - 1 0、1 - 1 0 0、1 - 5 0、1 - 2 5 m l である。一実施形態では、捕捉試薬、例えば、p K a l 捕捉試薬は容器の内表面に配置される。捕捉試薬は

50

表面に結合された第1の特異的結合パートナーおよび捕捉試薬に結合された第2の特異的結合パートナーにより表面に結合させることができる。特異的結合パートナーの例はビオチンおよびアビジンである。一実施形態ではビオチン化捕捉試薬、例えば、pKa1捕捉試薬、例えば、カリクレイン阻害剤、例えば、配列がDX-88と同様のポリペプチド、例えば、DX-88と、1、2、または5以下のアミノ酸残基だけ異なるもの、例えば、Epika1-2がアビジンでコートされた容器の表面上に配置される。

【0044】

本開示は、評価および治療において有用な、血漿カリクレイン媒介血管浮腫(KMA)、またはpKa1により媒介される他の疾患を有する患者を同定することができるバイオマーカーを提供する。

10

【0045】

バイオマーカーによるpKa1活性化を提示することが示された患者は、pKa1阻害剤、例えばDX-88、HAEと関連する急性浮腫性発作の治療に対して認可されたpKa1の小タンパク質阻害剤による治療の候補となる。他のpKa1阻害剤としてはDX-2930(完全ヒト抗体阻害剤である)が挙げられる。いくつかの実施形態では、バイオマーカーによるpKa1活性化を提示することが示された患者は、ブラジキニンB2受容体アンタゴニスト、例えば、インカチバント(Incatibant)(Firazyr(登録商標))による治療の候補となる。いくつかの実施形態では、バイオマーカーによるpKa1活性化を提示することが示された患者は、C1-INH補充剤、例えば、精製ヒト低温殺菌ナノ濾過C1-INH濃縮物(Beriner(登録商標))による治療の候補となる。

20

【0046】

発明の実施形態はバイオマーカーおよび患者、例えば、血漿カリクレインにより生成されるブラジキニンにより引き起こされる浮腫を患う患者の同定および治療におけるその使用を提供する。本明細書で開示される方法、組成物および装置は、多くの点で有用である。例えば、pKa1マーカーのレベルは上昇した接触系活性化と関連する障害を同定するために使用することができる。例えば、疾患の前臨床モデルにおいて、初期スクリーニングに続いて、インビトロまたはインビボで血漿カリクレイン阻害剤(例えばDX-88、EPKAL-2、またはDX-2930)による試験を実施することができる。本明細書で開示されるマーカーはまた、薬力学的バイオマーカーとして、またはそうでなければ、被験体のカリクレイン阻害剤に対する応答をモニタするために使用することができる。本明細書で開示されるマーカーはコンパニオン診断で使用することができ、血漿カリクレインにより媒介される疾患の治療が可能になり、HAEの予防療法中の投与が管理され、または切迫急性HAE発作が同定される。

30

【0047】

本出願を通して引用される参考文献、登録特許、公開された、または公開されていない特許出願を含む全ての引用文献ならびに以下で列挙されるものの内容はこれにより、本明細書で言及される目的または主題のために、その全体が明確に参照により組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【0048】

40

【図1】血漿カリクレインの接触系活性化に関与する要素を示した図である。

【図2】ウエスタンブロット分析による切断されたキニノーゲン検出を示す図である。試料をSDS-PAGE(3-8%トリス-酢酸)を用いて、還元条件下で分析し、続いて、PVDf膜に転写し、免疫ブロットした。レーン1-50nM無傷のキニノーゲン;レーン2-50nM切断されたキニノーゲン;レーン3-50nM低分子量キニノーゲン;レーン4-1:20クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿(ガラス採取管);レーン5-1:20クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿(プラスチック)カリクレイン処理;レーン6-1:20クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿(プラスチック);レーン7-1:20クエン酸ナトリウム添加ヒト血漿(プラスチック)20nM 2鎖キニノーゲン添加。

【図3】発作中に得られた患者試料中の無傷のキニノーゲン(すなわち、1-鎖)の検出

50

を示す。患者血漿試料をアンチプロテアーゼカクテルを含むクエン酸塩添加血漿管中に採取した。

【図4】1-鎖HMWKおよびpKa1による切断後の2-鎖HMWKのドメイン構造の概略図、および切断されたキニノーゲンの軽鎖に結合する抗体を用いてHMWKの鎖-1および鎖-2を検出するウエスタンブロットを示す。C1 = 1-鎖HMWK、C2 = 2-鎖HMWK、G = ガラス、P = プラスチック。

【図5】半定量的アッセイとしての精製HMWKのLICOR検出を示す。精製ヒトHMWKおよび切断されたHMWKを90 μg/mL ~ 5.6 μg/mLでHMWK欠損ヒト血漿中滴定した。試料を1:20でTBSおよび試料ローディング緩衝液(DTTを有する)中に希釈した。希釈試料を4-12%ビス-トリスゲル上で泳動させ、電気泳動後、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキング後、ブロットをマウス抗ヒトHMWK抗体(クローン#11H05)(HMWKの軽鎖に特異的である)およびヤギ抗マウスIR染料680を用いて可視化した。ゲルをLI-COR Odyssey IRスキャナを用いて走査し、これはIR染料680の励起シグナルを検出することができる。

【図6】HAE患者試料のウエスタンブロットおよびLICOR分析を示す図であり、HAE患者試料は切断されたHMWKのより高い内在性レベルを示すことが証明される。基礎および発作HAE患者血漿はどちらも、Licor分析によると、無病血漿に比べてより高いパーセントの切断されたHMWKを有した。分析される血漿試料をアンチプロテアーゼ溶液中に採取し、これは、同じ患者由来の、同じ採取時間でのクエン酸ナトリウム添加血漿試料と比べると、HAE患者血漿をさらなる接触活性化から保護した。グラフ中のエラーバーは標準偏差を表す。

【図7】FXIIa活性化条件の評価を示すウエスタンブロットおよびグラフを示す。図7A:異なる濃度のFXIIaにより異なる温度(氷対37)およびインキュベーション時間(10対30分)で活性化させた正常ヒト血漿のLicor検出を有するウエスタンブロットである。レーン1:分子量マーカー;レーン2:精製1-鎖および2-鎖HMWK;レーン3:正常ヒト血漿;レーン4:正常ヒト血漿+2.5 nM FXIIa、10分間、37;レーン5:正常ヒト血漿+2.5 nM FXIIa、30分間、37;レーン6:正常ヒト血漿+2.5 nM FXIIa、10分間、氷上;レーン7:正常ヒト血漿+2.5 nM FXIIa、30分間、氷上;レーン8:正常ヒト血漿+5 nM FXIIa、10分間、37;レーン9:正常ヒト血漿+5 nM FXIIa、30分間、37;レーン10:正常ヒト血漿+5 nM FXIIa、10分間、氷上;レーン11:正常ヒト血漿+5 nM FXIIa、30分間、氷上;レーン12:正常ヒト血漿+7.5 nM FXIIa、10分間、37;レーン13:正常ヒト血漿+7.5 nM FXIIa、30分間、37;レーン14:正常ヒト血漿+7.5 nM FXIIa、10分間、氷上;レーン15:正常ヒト血漿+7.5 nM FXIIa、30分間、氷上。図7B: Licorシグナル強度を使用して決定した各レーンにおける2-鎖HMWKのパーセント[% 2-鎖HMWK = (46 kDaシグナル + 56 kDaシグナル) / (46 kDaシグナル + 56 kDaシグナル + 110 kDaシグナル)]。

【図8】pKa1活性のFXIIa活性化に対するDX-88およびDX-2930の阻害効果を示すウエスタンブロットおよびグラフを示す。図8A:ヒト血漿にエクスピボで添加されると、エカランチドおよびDX-2930はpKALによるHMWKの切断を阻害することを示すウエスタンブロット分析である。図8B: FXIIaの存在下での、切断されたHMWKの生成に対するDX-88およびDX-2930の効果を示すチャートである。プールされたクエン酸ナトリウム添加ヒト血漿を、DX-2930またはエカランチドのいずれかにより、1370 ~ 34.3 nMの範囲の濃度で前処理した。全ての試料(未処理試料を含む)を、2.5 nM FXIIaの添加により活性化させた。酵素をその後、プロテアーゼインヒビターカクテルの添加により阻害した。等モル濃度のエカランチドおよびDX-2930は、未処理血漿試料に比べると、プールされたヒト血漿中で、切断されたHMWKの量を同等に低減させる。C = 25 nM 1および2鎖HMWK; N = 正常血漿; + = 活性化ヒト血漿(薬物なし)。

10

20

30

40

50

【図9】潰瘍性大腸炎（UC）および関節リウマチ（RA）を有する患者における接触系活性化のウエスタンブロット分析を示す。レーン1：分子量マーカー；レーン2：精製1-鎖および2-鎖HMWK；レーン3～5：正常ヒト血漿；レーン6～10：UC患者由来の血漿；レーン11～15：RA患者由来の血漿。各レーン中の試料に関するさらなる詳細は表3に提供される。

【図10】クローン病（CD）を有する患者における接触系活性化のウエスタンブロット分析を示す。レーン1：分子量マーカー；レーン2：精製1-鎖および2-鎖HMWK；レーン3～5：正常ヒト血漿；レーン6～10：CD患者由来の血漿。各レーン中の試料に関するさらなる詳細は表4に提供される。

【発明を実施するための形態】

【0049】

定義

便宜上、本発明をさらに説明する前に、明細書、実施例および添付の特許請求の範囲において使用される一定の用語をここで規定する。他の用語は、明細書中で現れるように規定される。

【0050】

単数形「1つの（a、an）」および「その（the）」は、文脈で明確に別記されない限り、複数の言及物を含む。

【0051】

本明細書では、「取得する」または「取得すること」は、物理的実体または値を「直接取得する」または「間接的に取得する」ことにより、物理的実体の所有物、または値、例えば、数値を得ることを示す。「直接取得する」は、物理的実体または値を得るために、プロセスを実施する（例えば、試料に対してアッセイまたは試験を実施する、またはその用語が本明細書で規定されるように「試料を分析する」）ことを意味する。「間接的に取得する」は、別の関係者または供給源（例えば、物理的実体または値を直接取得した第三者研究室）から物理的実体または値を受領することを示す。物理的実体を直接取得することは、プロセス実施する、例えば、試料を分析することを含み、これは物理的物質、例えば、開始材料における物理的変化を含む。例示的な変化は、2つ以上の開始材料から物理的実体を製造すること、物質をせん断またはフラグメント化すること、物質を分離または精製すること、2つ以上の別々の実体を合わせて混合物にすること、共有または非共有結合を破壊または形成することを含む化学反応を実施することを含む。値を直接取得することは、試料または別の物質の物理的変化を含むプロセス実施すること、例えば、物質、例えば、試料、分析物、試薬における物理的変化を含む分析プロセスを実施すること（時として、本明細書では、「物理分析」と呼ばれる）、分析法、例えば、下記の1つ以上を含む方法を実施することを含む：物質、例えば、分析物、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体を、別の物質から分離または精製すること；分析物、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体を別の物質、例えば、緩衝液、溶媒、または反応物と組み合わせること；または例えば、分析物の第1および第2の原子の間で、共有または非共有結合を破壊または形成することにより、分析物、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体の構造を変化させること；または例えば、試薬の第1および第2の原子の間で、共有または非共有結合を破壊または形成することにより、試薬、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体の構造を変化させること。

【0052】

本明細書では、試料を「分析すること」は、試料または別の物質、例えば、開始材料における物理的変化を含むプロセス実施することを含む。例示的な変化は、2つ以上の開始材料から物理的実体を製造すること、物質をせん断またはフラグメント化すること、物質を分離または精製すること、2つ以上の別々の実体を合わせて混合物にすること、共有または非共有結合を破壊または形成することを含む化学反応を実施することを含む。試料を分析することは、物質、例えば、試料、分析物、または試薬における物理的変化を含む分析プロセスを実施すること（時として、本明細書では、「物理分析」と呼ばれる）、分析

10

20

30

40

50

法、例えば、下記の1つ以上を含む方法を実施することを含むことができる：物質、例えば、分析物、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体を、別の物質から分離または精製すること；分析物、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体を別の物質、例えば、緩衝液、溶媒、または反応物と組み合わせること；または例えば、分析物の第1および第2の原子の間で、共有または非共有結合を破壊または形成することにより、分析物、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体の構造を変化させること；または、例えば、試薬の第1および第2の原子の間で、共有または非共有結合を破壊または形成することにより、試薬、またはそのフラグメントもしくは他の誘導体の構造を変化させること。

【0053】

「アゴニスト」という用語は、本明細書では、タンパク質の生理活性を模倣するまたは上方制御する（例えば、増強するまたは補充する）作用物質を示すことが意味される。アゴニストは、野生型タンパク質または野生型タンパク質の少なくとも1つの生理活性を有するその誘導体とすることができる。アゴニストはまた、タンパク質の少なくとも1つ生理活性を増加させる化合物とすることができる。アゴニストはまた、ポリペプチドの別の分子、例えば、標的ペプチドまたは核酸との相互作用を増加させる化合物とすることができる。

10

【0054】

「アンタゴニスト」という用語は、本明細書では、タンパク質の少なくとも1つ生理活性を下方制御する（例えば、抑制するまたは阻害する）作用物質を示すことが意味される。アンタゴニストは、タンパク質と別の分子、例えば、標的ペプチドまたは酵素基質の間の相互作用を阻害するまたは減少させる化合物とすることができる。アンタゴニストはまた、存在する発現タンパク質の量を低減させるまたは阻害する化合物とすることができる。典型的に、タンパク質または遺伝子を阻害することは、タンパク質または遺伝子の発現または関連活性を少なくとも10%またはそれ以上、例えば、20%、30%、40%、または50%、60%、70%、80%、90%またはそれ以上だけ低減させること、または、本明細書に記載される、または当技術分野で認識される1つ以上の方法により測定すると、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍またはそれ以上超の発現または関連活性の減少を示す。

20

【0055】

本明細書では、「結合親和性」は見かけの会合定数または K_a を示す。 K_a は解離定数（ K_d ）の逆数である。結合タンパク質は、例えば、特定の標的分子に対して少なくとも 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} および 10^{11} M^{-1} の結合親和性を有し得る。第2の標的に比べて第1の標的への、結合タンパク質のより高い親和性結合は、第2の標的への結合に対する K_a （または数値 K_d ）よりも高い第1の標的への結合に対する K_a （またはより小さな数値 K_d ）により示すことができる。そのような場合、結合タンパク質は、第2の標的（例えば、第2の立体構造にある同じタンパク質またはその模倣物；または第2のタンパク質）に比べ、第1の標的（例えば、第1の立体構造にあるタンパク質またはその模倣物）に対して特異性を有する。結合親和性の差（例えば、特異性または他の比較に対して）は少なくとも1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、91、100、500、1000、または 10^5 倍とすることができる。

30

40

【0056】

結合親和性は、平衡透析、平衡結合、ゲル濾過、ELISA、表面プラズモン共鳴、またはスペクトロスコピー（例えば、蛍光アッセイを使用する）を含む様々な方法により決定することができる。結合親和性を評価するための例示的な条件はトリス-緩衝液（50 mM トリス、150 mM NaCl、5 mM CaCl_2 、pH 7.5）中である。これらの技術を使用して、結合されたおよび遊離の結合タンパク質の濃度を、結合タンパク質（または標的）濃度の関数として測定することができる。結合された結合タンパク質の濃度（[結合]）は、遊離の結合タンパク質の濃度（[遊離]）および標的上の結合タンパク質ための結合部位の濃度に関連し、（N）は下記式による、結合部位数/標的分子であ

50

る：

[結合] = $N \cdot [遊離] / ((1 / K_a) + [遊離])$ 。

【0057】

K_a の正確な決定をすることは、必ずしも必要ではないが、時として、例えば、ELISAまたはFACS分析などの方法を使用して決定された、親和性の量的測定値を得ることは十分であり、 K_a に比例するので、よって、比較に使用することができ、例えば親和性がより高いかどうか、例えば、2倍高いかを決定することができ、例えば、機能アッセイ、例えば、インビトロまたはインビボアッセイにおける活性により、親和性の質的測定値、または親和性の推論が得られる。

【0058】

「結合タンパク質」という用語は、標的分子と相互作用することができるタンパク質を示す。この用語は、「リガンド」と同じ意味で使用される。「血漿カリクレイン結合タンパク質」は、血漿カリクレインと、相互作用することができる（例えば、結合する）タンパク質を示し、特に、血漿カリクレインと優先的にまたは特異的に相互作用する、および/またはこれを阻害するタンパク質を含む。タンパク質は、タンパク質がなく、同じ条件下での血漿カリクレインの活性と比べて、血漿カリクレインの活性の減少が引き起こされた場合、血漿カリクレインを阻害する。いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質は抗体である。

【0059】

「捕捉試薬」という用語は、そのリガンドに特異的に結合する部分を示す。

【0060】

本明細書では、「複合体」または「複合体形成」という用語は、互いに対して特異的親和性を有するメンバー間の複合体を示す。

【0061】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられたものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野において規定されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、 γ -分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。

【0062】

生体高分子に対するモチーフ配列は、変更されたアミノ酸とすることができる位置を含むことができる。例えば、そのような文脈中の記号「X」は一般に、他に特に規定がなければ、任意のアミノ酸（例えば、20の天然アミノ酸のいずれか）を示し、例えば、任意のシステインでないアミノ酸を示す。他の許容されるアミノ酸はまた、例えば、丸括弧およびスラッシュを使用して示すことができる。例えば、「(A/W/F/N/Q)」は、アラニン、トリプトファン、フェニルアラニン、アスパラギン、およびグルタミンがその特定の位置で許容されることを意味する。

【0063】

本明細書では、「検出試薬」は、検出される部分に結合する部分を示す。典型的には、これは、シグナル、例えば、蛍光を発生させ、または測定可能な化合物を生成する。

【0064】

「エピトープ」は、結合タンパク質（例えば、Fabまたは全長抗体などの抗体）により結合される標的化合物上の部位を示す。標的化合物がタンパク質である場合、部位はアミノ酸成分から完全に構成され、タンパク質のアミノ酸の化学修飾部分（例えば、グリコシル部分）から完全に構成され、またはそれらの組み合わせから構成され得る。オーバーラップエピトープは少なくとも1つの共通のアミノ酸残基、グリコシル基、リン酸基、硫

10

20

30

40

50

酸基、または他の分子特徴を含む。

【0065】

第1の結合タンパク質（例えば、抗体）は、第1の結合タンパク質が第2の結合タンパク質が結合する標的化合物上の同じ部位に結合する、または第2の結合タンパク質が結合する部位と重なる（例えば、アミノ酸配列または他の分子特徴（例えば、グリコシル基、リン酸基、または硫酸基）の観点から、例えば、50%、60%、70%、80%、90%、または100%重なる）部位に結合する場合、第2の結合タンパク質（例えば、抗体）と「同じエピトープに結合する」。

【0066】

第1の結合タンパク質（例えば、抗体）は、第1の結合タンパク質のそのエピトープへの結合が（例えば、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、またはそれ以上だけ）そのエピトープに結合する第2の結合タンパク質の量を減少させる場合、第2の結合タンパク質（例えば、抗体）と「結合のために競合する」。競合は直接的（例えば、第1の結合タンパク質は、第2の結合タンパク質により結合されるエピトープと同じ、または重なるエピトープに結合する）、または間接的（例えば、第1の結合タンパク質のそのエピトープへの結合が、標的化合物において立体変化を引き起こし、これが、第2の結合タンパク質のそのエピトープに結合する能力を減少させる）とすることができる。

【0067】

本明細書では、「機能的」生体分子は、特性および/または活性（これによって、特徴付けられる）を示す形態の生体分子である。

【0068】

2つの配列の間の「相同性」または「配列同一性」の計算（これらの用語は、本明細書で同じ意味で使用される）は下記の通り実施される。配列は最適比較目的のために整列される（例えば、ギャップを最適整列のために第1および第2のアミノ酸または核酸配列の1つまたは両方に導入することができ、非相同配列は比較目的のために無視することができる）。最適整列は12のギャップペナルティ、4のギャップ伸長ペナルティ、および5のフレームシフトギャップペナルティを有する、Blossum62スコア行列を有するGCGソフトウェアパッケージにおけるGAPプログラムを使用して、ベストスコアとして決定される。対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドがその後、比較される。第1の配列内のある位置が第2の配列内の対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドにより占められている場合、そうすると、分子はその位置で同一である（本明細書では、アミノ酸または核酸「同一性」はアミノ酸または核酸「相同性」に等しい）。2つの配列間のパーセント同一性はそれらの配列により共有される同一位置の数の関数である。

【0069】

好ましい実施形態では、比較目的のために整列された基準配列の長さは基準配列の長さの少なくとも30%、好ましくは少なくとも40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、またはさらにより好ましくは少なくとも70%、80%、90%、92%、95%、97%、98%、または100%である。例えば、基準配列は免疫グロブリン可変ドメイン配列の長さであってもよい。

【0070】

本明細書では、「低ストリンジェンシー、中ストリンジェンシー、高ストリンジェンシー、または超高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする」という用語は、ハイブリダイゼーションおよび洗浄のための条件を記載する。ハイブリダイゼーション反応を実施するためのガイダンスはCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6において見出すことができる。水性および非水性法がその文献で記載されており、いずれかを使用することができる。本明細書で言及される特定のハイブリダイゼーション条件は下記の通りである：(1) 6X塩化ナトリウム/クエン

10

20

30

40

50

酸ナトリウム (SSC) 中約 45 で低ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて 0.2X SSC、0.1% SDS 中、少なくとも 50 で 2 回洗浄 (低ストリンジェンシー条件では、洗浄の温度は 55 まで増加させることができる) ; (2) 6X SSC 中約 45 で中ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて 0.2X SSC、0.1% SDS 中、60 で 1 回以上の洗浄 ; (3) 6X SSC 中約 45 で高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、続いて 0.2X SSC、0.1% SDS 中、65 で 1 回以上の洗浄 ; ならびに (4) 超高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、0.5M リン酸ナトリウム、7% SDS、65、続いて 0.2X SSC、1% SDS で 65 にて 1 回以上の洗浄である。超高ストリンジェンシー条件 (4) が好ましい条件であり、他に特に規定がなければ、使用すべき条件である。開示は低、中、高、または超高ストリンジェンシーを用いて、本明細書で記載される核酸またはその相補体、例えば、本明細書で記載される結合タンパク質をコードする核酸にハイブリダイズする核酸を含む。核酸は、基準核酸の長さと同じ長さまたはその 30、20、もしくは 10% 以内とすることができる。核酸は本明細書で記載される免疫グロブリン可変ドメイン配列をコードする領域に対応することができる。

10

【0071】

「単離組成物」は、単離組成物が得られ得る天然試料の少なくとも 90% の少なくとも 1 つ構成成分から除去された組成物を示す。人工的にまたは自然に生成された組成物は対象となる種または種の集団が重量 - 重量ベースで少なくとも 5、10、25、50、75、80、90、92、95、98、または 99% 純粋である場合、「少なくともある程度の純度を有する組成物」とすることができる。

20

【0072】

本明細書では、「インビトロ」という用語は、多細胞生物内ではなく、人工環境、例えば、試験管または反応槽中、細胞培養物中、などで起こるイベントを示す。

【0073】

本明細書では、「インビボ」という用語は、多細胞生物、例えばヒトまたは非ヒト動物内で起こるイベントを示す。

【0074】

「単離組成物」は、単離組成物が得られ得る天然試料の少なくとも 90% の少なくとも 1 つ構成成分から除去された組成物を示す。人工的にまたは自然に生成された組成物は、対象となる種または種の集団が重量 - 重量ベースで少なくとも 5、10、25、50、75、80、90、92、95、98、または 99% 純粋である場合、「少なくともある程度の純度を有する組成物」とすることができる。

30

【0075】

「単離」タンパク質は、単離タンパク質が得られ得る天然試料の少なくとも 90% の少なくとも 1 つ構成成分から除去されたタンパク質を示す。タンパク質は対象となる種または種の集団が重量 - 重量ベースで少なくとも 5、10、25、50、75、80、90、92、95、98、または 99% 純粋である場合、「少なくとも」ある程度の純度を有することができる。

【0076】

「カリクレイン」という用語 (例えば、血漿カリクレイン) は、ペプチダーゼ (タンパク質中のペプチド結合を切断する酵素)、セリンプロテアーゼファミリーのサブグループを示す。血漿カリクレインはキニノーゲンを切断し、キニン、強力な炎症促進性ペプチドを生成させる。

40

【0077】

「カリクレイン阻害剤」という用語は、カリクレインを阻害する任意の作用物質または分子を示す。例えば、DX - 88 (本明細書では「PEP - 1」とも呼ばれる) は血漿カリクレイン (NP__000883) の強力な ($K_i < 1 \text{ nM}$) 特異的な阻害剤である。(例えば、WO95/21601号またはWO2003/103475号も参照されたい)

50

【 0 0 7 8 】

本明細書では「DX-2922」という用語は、「X101-A01」という用語と同じ意味で使用される。この抗体の他のバリエーションは以下に記載される。

【表1】

抗体同定	説明
X63-G06	ROLIC を使用して発見された非生殖系列 Fab、M160-G12 と同じ HC であるが異なる LC
X81-B01	生殖系列 IgGHEK 293T 細胞において産生される
X101-A01	生殖系列 IgGCHO 細胞において産生される、X81-B01 と同じ HC および LC 配列
DX-2922	X101-A01 に対する別の命名法

10

【 0 0 7 9 】

本明細書では「DX-2930」という用語は、「X124-G01」という用語と同じ意味で使用される。この抗体の他のバリエーションは以下に記載される。

【表2】

抗体同定	説明
M162-A04	ファージディスプレイを用いて発見された非生殖系列 Fab
M199-A08	M162-A04 の親和性成熟により誘導される重鎖 CDR3 変異 Fab
X115-F02	293T 細胞において産生される生殖系列 Fab、X124-G01 と同じ可変重鎖
X124-G01 または DX-2930	CHO 細胞において産生される生殖系列 IgG、HC の C 末端 Lys が X124-G01 において除去されていることを除き、X115-F02 と同じ LC および HC 配列(DX-2930 としても知られている)

20

30

【 0 0 8 0 】

「モジュレーター」という用語は、調節を引き起こすことができる、ポリペプチド、核酸、巨大分子、複合体、分子、小分子、化合物、種など（天然起源または非天然起源）、または生物学的材料、例えば細菌、植物、真菌、または動物細胞もしくは組織から製造される抽出物を示す。モジュレーターは、アッセイに含めることにより、機能的特性、生物活性またはプロセス、またはそれらの組み合わせの阻害剤または活性化剤としての潜在活性に対して評価することができる（直接または間接的に）（例えば、アゴニスト、部分アゴニスト、部分アゴニスト、インバースアゴニスト、アンタゴニスト、抗菌薬、微生物感染または増殖の阻害剤、など）。そのようなアッセイでは、多くのモジュレーターが、1度にスクリーニングされ得る。モジュレーターの活性は知られており、未知であり、または一部知られている可能性がある。

40

【 0 0 8 1 】

「非必須」アミノ酸残基は、結合剤、例えば、抗体の野生型配列から、生物活性を消滅させることなく、またはより好ましくは、これを実質的に変化させることなく、変化させることができる残基であり、一方、「必須」アミノ酸残基を変更すると、活性の実質的な損失となる。

【 0 0 8 2 】

対象の方法により治療される「患者」「被験体」または「宿主」（これらの用語は同じ

50

意味で使用される)はヒトまたは非ヒト動物のいずれかを意味することができる。いくつかの実施形態では、被験体は、カリクレイン媒介障害、例えば、ブラジキニン媒介障害、例えば、遺伝性血管浮腫(HAE)の疑いがある、またはその危険がある、またはこれを感じる。いくつかの実施形態では、被験体は、下記の危険がある、またはこれを感じる:ヒスタミン非依存性特発性血管浮腫、関節リウマチ、クローン病、潰瘍性大腸炎、ループス、アルツハイマー病、敗血症性ショック、熱傷、脳虚血/再灌流傷害、脳浮腫、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、黄斑浮腫、血管炎、動脈または静脈血栓症、補助人工心臓またはステントと関連する血栓症、血栓症を伴うヘパリン誘導血小板減少症、血栓塞栓性疾患、および不安定狭心症を伴う冠動脈心疾患、浮腫、眼疾患、痛風、腸疾患、口腔粘膜炎、神経障害性疼痛、炎症痛、脊柱管狭窄-変性脊椎疾患、術後イレウス、大動脈瘤、変形性関節症、遺伝性血管浮腫、肺塞栓症、脳卒中、頭部外傷もしくはペリ腫瘍脳浮腫、敗血症、急性中大脳動脈(MCA)虚血性イベント(脳卒中)、再狭窄(例えば、血管形成術後)、全身性エリテマトーデス腎炎、自己免疫疾患、炎症疾患、心血管疾患、神経疾患、タンパク質ミスフォールディングと関連する疾患、血管新生と関連する疾患、高血圧性腎症および糖尿病性腎症、アレルギー性および呼吸器疾患(例えばアナフィラキシー、喘息、慢性閉塞性肺疾患、急性呼吸促進症候群、嚢胞性線維症、持続性、鼻炎)および組織傷害(例えば火傷または化学的損傷)。

10

【0083】

「プレカリクレイン」および「血漿プレカリクレイン」という用語は、本明細書で同じ意味で使用され、活性血漿カリクレインのチモーゲン形態を示し、これはプレカリクレインとしても知られている。

20

【0084】

被験体において疾患を「防止すること」または「防止する」という用語は、被験体を医薬治療、例えば、薬物の投与に供し、疾患の少なくとも1つの症状を防止することを示し、すなわち、望まれない病状(例えば、宿主動物の疾患または他の望まれない状態)の臨床徴候前に投与され、そのため、宿主は望まれない病状の発症に対して保護される。疾患を「防止すること」はまた、「予防」または「予防的治療」と呼ばれ得る。

【0085】

本明細書では、「実質的に同一」(または「実質的に相同」)という用語は、第2のアミノ酸または核酸配列に対し、十分な数の同一または等価の(例えば、同様の側鎖を有する、例えば、保存アミノ酸置換)アミノ酸残基またはヌクレオチドを含む第1のアミノ酸または核酸配列を示すために本明細書で使用され、そのため、第1および第2のアミノ酸または核酸配列は、同様の活性、例えば、結合活性、結合優先、または生物活性を有する(または有するタンパク質をコードする)。抗体の場合、第2の抗体は同じ特異性を有し、同じ抗原に対し、少なくとも50%、少なくとも25%、または少なくとも10%の親和性を有する。

30

【0086】

本明細書で開示される配列と同様または相同の配列(例えば、少なくとも約85%配列同一性)もまた、本出願の一部である。いくつかの実施形態では、配列同一性は約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上とすることができる。

40

【0087】

加えて、核酸セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件(例えば、高ストリンジентハイブリダイゼーション条件)下で、ストランドの相補体にハイブリダイズする場合、実質的な同一性が存在する。核酸は全細胞中、細胞溶解物中、または部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。

【0088】

生体高分子のためのモチーフ配列は、変更されたアミノ酸とすることができる位置を含むことができる。例えば、そのような文脈中の記号「X」は一般には、他に特に規定がなければ、任意のアミノ酸(例えば、20の天然アミノ酸のいずれか)を示し、例えば、任

50

意のシステインでないアミノ酸を示す。他の許容されるアミノ酸はまた、例えば、丸括弧およびスラッシュを使用して示すことができる。例えば、「(A/W/F/N/Q)」は、アラニン、トリプトファン、フェニルアラニン、アスパラギン、およびグルタミンがその特定の位置で許容されることを意味する。

【0089】

統計学的有意性は、任意の当技術分野で知られている方法により決定することができる。例示的な統計検定としては下記が挙げられる：スチューデントT検定、マンホイットニーのUノンパラメトリック検定、およびウィルコクソンノンパラメトリック統計検定。いくつかの統計的に有意な関係は0.05または0.02未満のP値を有する。「誘導する」、「阻害する」、「増強する」、「上昇させる」、「増加させる」、「減少させる」などという用語（例えば、2つの状態間の区別可能な質的または量的な差異を示す）は、2つの状態間の差異、例えば、統計的に有意な差異を示し得る。

10

【0090】

本明細書では、「試料」は、被験体由来の組織、例えば、血液、血漿またはタンパク質を含む組成物を示す。試料は被験体から得られた初期末加工試料ならびにその後加工処理された、例えば、部分的に精製されたまたは保存された形態の両方を含む。例示的な試料としては、血液、血漿、涙、または粘液が挙げられる。いくつかの実施形態では、試料は血液または血漿試料である。

【0091】

「治療的有效用量」は、好ましくは、測定可能なパラメータ、例えば、血漿カリクレイン活性を、統計的に有意な程度または少なくとも約20%だけ、より好ましくは少なくとも約40%だけ、さらにより好ましくは少なくとも約60%だけ、さらにより好ましくは少なくとも約80%だけ、未治療被験体に比べ調節する。化合物の、測定可能なパラメータ、例えば、疾患関連パラメータを調節する能力は、ヒト障害および病状における効力を予測する動物モデル系において評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、化合物のパラメータをインビトロで調節する能力を検査することにより評価することができる。

20

【0092】

被験体において疾患（または病状）を「治療すること」または疾患を有する被験体を「治療すること」は、被験体を医薬治療、例えば、薬物の投与に供し、疾患の少なくとも1つの症状が治癒され、軽減され、または減少されることを示す。

30

【0093】

被験体において疾患を「防止すること」という用語は、被験体を医薬治療、例えば、薬物の投与に供し、よって、疾患の少なくとも1つの症状が防止されることを示し、すなわち、望まれない病状の臨床徴候（例えば、宿主動物の疾患または他の望まれない状態）前に投与され、よって、宿主は、望まれない病状を発症しないように保護される。疾患を「防止すること」は「予防」または「予防的治療」とも呼ばれ得る。

【0094】

「予防的有效用量」は、投与時または必要とされる期間の間に、所望の予防的結果を達成するのに有効な量を示す。典型的には、予防的用量は被験体において疾患前に、またはその初期段階に使用されるので、予防的有效用量は治療的有效量より少ない。

40

【0095】

アルファベットまたは数字見出しを含む見出しは、理解および解釈を容易にするためのものにすぎず、反対のことを示す表現がない限り、時間的順序または優先度の序列を課すものではない。

【0096】

切断されたおよび無傷のHMWKの検出

血漿カリクレインは、大部分がその基質、高分子量キニノーゲン(HMWK)に結合されたプレカリクレインと呼ばれる不活性チモーゲンとして循環する。刺激に応じて、FXIIは、FXIIaに活性化される。FXIIaはプレカリクレインを切断し、活性血漿

50

カリクレインを形成させる（図1）。循環プレカリクレインのおよそ75 - 90%がHMWKに、HMWKのドメイン6との非活性部位相互作用により結合される。遊離のおよびHMWK - 結合された活性pKa1は、切断されたHMWKおよびブラジキニンを生成させる。血漿カリクレイン活性化のバイオマーカーが表2に示される。バイオマーカーの適合性は、HAEの急性発作の存在下、およびそれなしのそのレベルに従い証明することができる。これらのバイオマーカーのレベルもまた、ブラジキニン媒介浮腫またはpKa1活性により媒介される他の疾患の発作中に変化され得る。表2を参照されたい。

【0097】

表2 . KMAと関連するバイオマーカー

表2はpKa1またはブラジキニン媒介障害に対して被験体を評価するための表2および本明細書のどこかに記載される方法により評価することができるマーカーを提供する。表2はpKa1またはブラジキニン媒介障害と関連するマーカーのレベルにおける変化の方向を示す。

【表3】

バイオマーカー	アッセイ	正常に対するHAE患者における基礎レベル	接触活性化によるΔ	コメント
無傷のHMWK	ELISA、ウエスタンブロット	不変	減少	試験は、APTTをキニノーゲン欠損血漿と共に、またはイムノアッセイを用いて無傷のキニノーゲンを測定するのに有効である : www.diapharma.com/downloads/68201025811.pdf
切断されたHMWK	ELISA、ウエスタンブロット	増加	増加	切断されたキニノーゲンは、HAE発作中に、約47%総キニノーゲンまで増加し得る。切断されたキニノーゲンはまた、敗血症、硬変中に上昇する。 アッセイは下記のいずれかを使用することができる a) 無傷のキニノーゲンとは対照的に切断されたキニノーゲンに特異的な抗体; または b) 切断されたおよび無傷のキニノーゲンを分離および定量することができるアッセイフォーマット(例えばウエスタンブロット)。このアッセイは循環する抗pKa1抗体に対しては感応せず、細胞表面に結合された活性pKa1が限局性ブラジキニン媒介血管浮腫における主な犯人であるかどうか依存しない。

【0098】

本開示は、少なくとも一部、患者試料中の特定の形態のNMWKの値（例えば、切断されたHMWKのパーセンテージ）が、ある一定のpKa1媒介疾患（例えば、HAE）お

10

20

30

40

50

よび自己免疫疾患（例えば、RA、UC、およびクローン病）と関連するという発見に基づく。よって、切断されたHMWK、無傷のHMWK、または両方の値（例えば、パーセンテージ）は、そのような疾患を有する、またはその危険がある被験体を同定する、pKa1阻害剤による治療の影響を受けやすい可能性のある障害を同定する、1つ以上のpKa1阻害剤を含む疾患治療の有効性を評価するためのバイオマーカーとして使用することができる。

【0099】

検出試薬

いくつかの実施形態では、HMWKの1つの形態に、HMWKの他の形態と比べて特異的に（優先的に）結合する検出試薬（例えば、抗体）を、試料（候補患者由来の生体試料（例えば、血液試料または血漿試料）とすることができる）中の切断されたHMWKのレベルを決定するための本明細書に記載されるアッセイ法において使用することができる。1つの例では、検出試薬は無傷のHMWKと比べて切断されたHMWKに特異的に結合する抗体である。別の例では、検出試薬は切断された形態と比べて無傷のHMWKに特異的に結合する抗体である。あるいは、または加えて、抗体は、切断されたHMWKの軽鎖のC末端に特異的に結合する。そのような抗体はHMWKをLMWKから区別するために使用することができ、というのも、LMWKは選択的スプライシングによる切断されたHMWKの軽鎖のC末端フラグメントを含まないからである。

【0100】

抗原またはエピトープに「特異的に結合する」検出試薬は、当技術分野においてよく理解された用語であり、そのような特異的結合を決定するための方法もまた、当技術分野でよく知られている。抗体などの検出試薬は、別の標的よりも、より頻繁に、より迅速に、より大きな持続期間でおよび/またはより大きな親和性で特定の標的抗原と反応または結合する場合、「特異的結合」を示すと言われる。検出試薬は、他の物質（例えば、無傷のHMWK）に結合するよりも、より大きな親和性、結合活性で、より迅速に、および/またはより大きな持続期間で結合する場合、標的抗原（例えば、切断されたHMWK）またはそのエピトープに「特異的に結合する」。例えば、抗原（例えば、切断されたHMWKまたは切断されたHMWKの軽鎖のC末端）またはその中の抗原エピトープに特異的に（または優先的に）結合する抗体は、この標的抗原に、他の抗原（例えば、無傷のHMWK）または同じ抗原中の他のエピトープに結合するよりも、より大きな親和性、結合活性で、より迅速に、および/またはより大きな持続期間で結合する抗体である。この定義を読めば、例えば、第1の標的抗原に特異的に結合する抗体は、特異的にまたは優先的に第2の標的抗原に結合しても、しなくてもよいことも理解される。そのようなものとして、「特異的結合」または「優先的結合」は、必ずしも排他的結合を要求しない（が、これを含むことができる）。一般に、必ずしもではないが、結合への言及は優先的結合を意味する。いくつかの例では、標的抗原またはそのエピトープに「特異的に結合する」抗体は、他の抗原または同じ抗原中の他のエピトープに結合しなくてもよい。

【0101】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるアッセイ法において使用するための抗体は、標的抗原または抗原エピトープ（例えば、切断されたキニノーゲン、無傷のHMWK、または切断されたキニノーゲンの軽鎖のC末端）に対し好適な結合親和性を有する。本明細書では、「結合親和性」は、見かけの会合定数または K_A を示す。 K_A は解離定数（ K_D ）の逆数である。本明細書に記載される抗体は、少なくとも 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} M、またはそれ以下の結合親和性（ K_D ）を有し得る。増加した結合親和性は減少した K_D に対応する。第2の抗原に比べて第1の抗原に対してより高い抗体の親和性結合は、第2の抗原への結合に対する K_A （または数値 K_D ）よりも、第1の抗原への結合に対するより高い K_A （またはより小さな数値 K_D ）により示すことができる。そのような場合、抗体は第2の抗原に比べ、第1の抗原に対して特異性を有する。結合親和性の差異（例えば、特異性または他の比較に対する）は、少なくとも1.5、2、3、4、5、10、15、20、37.5、50、70、80、9

10

20

30

40

50

1、100、500、1000、10,000または 10^5 倍とすることができる。

【0102】

本明細書では、「抗体」という用語は、少なくとも1つの免疫グロブリン可変ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列を含むタンパク質を示す。例えば、抗体は重(H)鎖可変領域(本明細書では、VHと省略)、および軽(L)鎖可変領域(本明細書では、VLと省略)を含むことができる。別の例では、抗体は2つの重(H)鎖可変領域および2つの軽(L)鎖可変領域を含む。「抗体」という用語は、抗体の抗原結合フラグメント(例えば、単鎖抗体、FabおよびsFabフラグメント、 $F(ab')_2$ 、Fdフラグメント、Fvフラグメント、scFv、およびドメイン抗体(dAb)フラグメント(de Wildt et al., Eur J Immunol. 1996; 26(3): 629-39.))ならびに完全抗体を含む。抗体はIgA、IgG、IgE、IgD、IgM(ならびにそのサブタイプ)の構造的特徴を有し得る。抗体は任意の起源由来とすることができるが、霊長類(ヒトおよび非ヒト霊長類)ならびに霊長類化が好ましい。

10

【0103】

VHおよびVL領域は、「フレームワーク領域」(「FR」)と呼ばれるより保存された領域が散在された「相補性決定領域」(「CDR」)と呼ばれる超可変性の領域に、さらに細分することができる。フレームワーク領域およびCDRの範囲は正確に規定されている(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242、およびChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917を参照されたい、www.hgmp.mrc.ac.ukも参照されたい)。Kabat定義が本明細書で使用される。各VHおよびVLは、典型的には3つのCDRおよび4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで下記順序で配列される: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

20

【0104】

抗体のVHまたはVL鎖はさらに、重または軽鎖定常領域の全てまたは一部を含むことができ、よって、それぞれ、重または軽免疫グロブリン鎖が形成される。1つの実施形態では、抗体は2本の重免疫グロブリン鎖および2本の軽免疫グロブリン鎖の四量体であり、ここで、重および軽免疫グロブリン鎖は、例えば、ジスルフィド結合により相互接続される。IgGでは、重鎖定常領域は3つの免疫グロブリンドメイン、CH1、CH2およびCH3を含む。軽鎖定常領域はCLドメインを含む。重および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は典型的には、抗体の宿主組織または因子、例えば免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第1成分(C1q)への結合を媒介する。免疫グロブリンの軽鎖は または 型とすることができる。1つの実施形態では、抗体はグリコシル化される。抗体は抗体依存性細胞傷害および/または補体媒介細胞傷害に対して機能的であり得る。

30

40

【0105】

抗体の1つ以上の領域はヒトまたは効果的にヒトとすることができる。例えば、可変領域の1つ以上はヒトまたは効果的にヒトとすることができる。例えば、CDRの1つ以上はヒト、例えば、HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、およびLC CDR3とすることができる。軽鎖CDRの各々はヒトとすることができる。HC CDR3はヒトとすることができる。フレームワーク領域の1つ以上、例えば、HCまたはLCのFR1、FR2、FR3、およびFR4はヒトとすることができる。例えば、Fc領域はヒトとすることができる。1つの実施形態では、全てのフレームワーク領域はヒトであり、例えば、ヒト体細胞、例えば、免疫グロブリンを産生する造血細胞または非造血細胞により産生される抗体のフレームワークの配列を有する

50

。1つの実施形態では、ヒト配列は、例えば、生殖系列核酸によりコードされる生殖系列配列である。1つの実施形態では、選択されるF a bのフレームワーク(F R)残基は、ほとんどの同様の霊長類生殖系列遺伝子、とりわけヒト生殖系列遺伝子における対応する残基のアミノ酸型に変換することができる。定常領域の1つ以上はヒトまたは効果的にヒトとすることができる。例えば、免疫グロブリン可変ドメイン、定常領域、定常ドメイン(C H 1、C H 2、C H 3、C L 1)、または抗体全体の少なくとも70、75、80、85、90、92、95、98、または100%はヒトまたは効果的にヒトとすることができる。

【0106】

抗体の全てまたは一部は免疫グロブリン遺伝子またはそのセグメントによりコードされ得る。例示的なヒト免疫グロブリン遺伝子としては、 κ 、 λ (I g A 1およびI g A 2)、 μ 、 δ (I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4)、 α 、 β および μ 定常領域遺伝子、ならびに多くの免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。全長免疫グロブリン「軽鎖」(約25 K D aまたは約214アミノ酸)は、N H 2末端(約110アミノ酸)で可変領域遺伝子、およびC O O H -末端で定常領域遺伝子によりコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」(約50 K D aまたは約446アミノ酸)は、同様に、可変領域遺伝子(約116アミノ酸)および他の前記定常領域遺伝子の1つ、例えば、 κ (約330アミノ酸をコードする)によりコードされる。ヒトH Cの長さは、H C C D R 3が約3アミノ酸残基から35アミノ酸残基超まで変動するので、かなり変動する。

【0107】

全長抗体の「抗原結合フラグメント」という用語は、対象となる標的に特異的に結合する能力を保持する全長抗体の1つ以上のフラグメントを示す。全長抗体の「抗原結合フラグメント」という用語内に含まれる結合フラグメントの例としては、下記が挙げられる：(i) F a bフラグメント、V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなる一価フラグメント；(i i) F (a b ')₂フラグメント、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのF a bフラグメントを含む二価フラグメント；(i i i) V HおよびC H 1ドメインからなるF dフラグメント；(i v) 抗体の単一アームのV LおよびV HドメインからなるF vフラグメント、(v) d A bフラグメント(W a r d e t a l . , (1989) N a t u r e 341 : 544 - 546)、これはV Hドメインから構成される；ならびに(v i) 機能性を保持する、単離された相補性決定領域(C D R)。さらに、F vフラグメントの2つのドメイン、V LおよびV Hは別々の遺伝子によりコードされるが、それらは、組換え方法を使用して、単一タンパク質鎖として形成させることができる合成リンカーにより一緒にすることができ、この場合、V LおよびV H領域が対合し、単鎖F v (s c F v)として知られる一価分子を形成する。例えば、米国特許5,260,203号、4,946,778号、および4,881,175号；B i r d e t a l . (1988) S c i e n c e 242 : 423 - 426；ならびにH u s t o n e t a l . (1988) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 85 : 5879 - 5883を参照されたい。

【0108】

抗体フラグメントは任意の適切な技術、例えば当業者に知られている従来技術を使用して得ることができる。「単一特異抗体」という用語は、特定の標的、例えば、エピトープに対して単一の結合特異性および親和性を示す抗体を示す。この用語は「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」を含み、これらは、本明細書では、抗体がどのように作製されたかに関係なく、単一分子組成の抗体またはそのフラグメントの調製物を示す。

【0109】

本明細書では、「ヒト化」免疫グロブリン可変領域は、十分な数のヒトフレームワークアミノ酸位置を含むように改変された免疫グロブリン可変領域を示し、そのため、免疫グロブリン可変領域は、正常ヒトにおいて免疫原性応答を誘発しない。「ヒト化」免疫グロブリンの説明としては、例えば、U . S . 6 , 4 0 7 , 2 1 3号およびU . S . 5 , 6 9

10

20

30

40

50

3, 762号が挙げられる。

【0110】

阻害定数 (K_i) は阻害剤効力の測定基準を提供する；これは酵素活性を半分だけ低減させるのに必要とされる阻害剤の濃度であり、酵素または基質濃度に依存しない。見かけの K_i ($K_{i,app}$) は、異なる基質濃度で、異なる濃度の阻害剤（例えば、阻害結合タンパク質）の反応の程度（例えば、酵素活性）に対する阻害効果を測定することにより得られ；阻害剤濃度の関数としての擬一次速度定数の変化を Morrison 式（式1）にフィッティングすると、見かけの K_i 値の推定値が得られる。 K_i は、 $K_{i,app}$ 対基質濃度のプロットの線形回帰分析から抽出した y 切片から得られる。

【数1】

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

式1

式中 v = 測定した速度； v_o = 阻害剤がない場合の速度； $K_{i,app}$ = 見かけの阻害定数； I = 総阻害剤濃度；ならびに E = 総酵素濃度。

【0111】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される検出試薬は検出可能な標識にコンジュゲートさせることができ、検出試薬の対象となる抗原（例えば、切断された HMWK および無傷の HMWK）への結合は、検出可能な標識から放出されたシグナルの強度に基づいて決定することができる。あるいは、検出試薬に特異的な二次抗体を使用することができる。1つ以上の抗体が検出可能な標識に結合され得る。当技術分野で知られている任意の好適な標識が本明細書に記載されるアッセイ法において使用され得る。いくつかの実施形態では、検出可能な標識はフルオロフォアを含む。本明細書では、「フルオロフォア」という用語（「蛍光標識」または「蛍光染料」とも呼ばれる）は、規定励起波長の光エネルギーを吸収し、異なる波長の光エネルギーを放出する部分を示す。いくつかの実施形態では、検出部分は酵素であり、またはこれを含む。いくつかの実施形態では、酵素は、無色基質から着色生成物を生成させるもの（例えば、 α -ガラクトシダーゼ）である。

【0112】

高分子量キニノーゲン

高分子量キニノーゲン (HMWK) は血漿中に、およそ 110 kDa の分子量を有する単一ポリペプチド (1-鎖) 多ドメイン (ドメイン 1-6) タンパク質として存在する (図4)。HMWK はドメイン 4 内で pKa1 により切断され、9 アミノ酸の、炎症促進性ペプチドブラジキニンおよび HMWK の 2-鎖形態 (切断されたキニノーゲン) が放出される。HMWK の 2 鎖は重鎖 (これは、HMWK のドメイン 1-3 を含む)、および軽鎖 (これは HMWK のドメイン 5 および 6 を含む) である。重および軽鎖は、それぞれ、およそ 56 および 46 キロダルトンの分子量を有する。図4。

【0113】

無傷の HMWK

無傷の高分子量キニノーゲン (HMWK) は、本明細書では「無傷のキニノーゲン」とも呼ばれ、例えば、凝固薬または免疫学的方法、例えば、ラジオイムノアッセイを使用してアッセイすることができる (例えば、Kerbiroiu - Nabias, D.M., Br J Haematol, 1984, 56(2): 2734-86 を参照されたい)。ヒト HMWK の軽鎖に対するモノクローナル抗体は知られている。例えば、Reddigari, S.R. & Kaplan, A.P., Blood, 1999, 74: 695-702 を参照されたい。発色性基質に依存する HMWK のためのアッセイもまた使用することができる。例えば、Scott, C.F. et al.

10

20

30

40

50

Thromb Res, 1987, 48(6):685-700; Gallimore, M. J. et al. Thromb Res, 2004, 114(2):91-96を参照されたい。

【0114】

HMWKをコードするヒト遺伝子はキニノーゲン1(KNG1)である。KNG1は転写およびその代わりにスプライシングされ、mRNAが形成され、これはHMWKまたは低分子量キニノーゲン(LMWK)のいずれかをコードする。HMWKの例示的なタンパク質配列が以下で提供される：

> gi|156231037|ref|NP_001095886.1|キニノーゲン-1アイソフォーム1前駆体[ホモサピエンス]

10

MKLITILFLCSRLLLLSLTQESQSEEIDCNDKDLFKAVIDAALKKYNSQNSQNSNQFVLYRITTEATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDPCVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPNTSPELEETLHTITKLNNAENNAFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVVVPWEKKIYPTVNCQPLGMSLMKRPPGFSFPRSSRIGEIKEETTVSPPHTSMAQAQDEERDSGKEQGHTRRHWDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGHKFKLDDDDLEHQGGHVLHDHGHKHKHGHGHGHKHKNGKNGKNGKNGWKTTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLIATMMPPISPAIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPSDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTTQMKESYYFDLTDGLS(S E Q I D N O : 1)

20

【0115】

切断されたHMWK

切断された高分子量キニノーゲン(HMWK)は、本明細書では「切断されたキニノーゲン」とも呼ばれ、例えば、実施例1、および3~7に記載される方法、例えば、ウエスタンブロットを使用して評価することができる。いくつかの実施形態では、切断されたHMWKの軽鎖は評価することができる。切断されたHMWKに結合する抗体、例えば切断されたHMWKの軽鎖(例えば、C末端残基を含むエピトープ)に結合する抗体を使用することができる。1つの例はマウスmAbクローン11H05である。加えて、切断されたHMWKは質量分析を使用して評価することができる。切断されたHMWKのレベルを評価するための免疫ブロット技術が当技術分野で知られている。、例えば、Buhler R. et al. Blood Coagul Fibrinolysis, 1995, 6(3):223-232を参照されたい。

30

【0116】

切断されたキニノーゲンの重および軽鎖の例示的な配列が以下で提供される。

> 切断されたキニノーゲン-1重鎖

QESQSEEIDCNDKDLFKAVIDAALKKYNSQNSQNSNQFVLYRITTEATKTVGSDTFYSFKYEIKEGDPCVQSGKTWQDCEYKDAAKAATGECTATVGKRSSTKFSVATQTCQITPAEGPVVTAQYDCLGCVHPISTQSPDLEPILRHGIQYFNNNTQHSSLFMLNEVKRAQRQVVAGLNFRITYSIVQTNCSKENFLFLTPDCKSLWNGDTGECTDNAYIDIQLRIASFQNCDIYPGKDFVQPPTKICVGCPRDIPNTSPELEETLHTITKLNNAENNAFYFKIDNVKKARVQVVAGKKYFIDFVARETTCSKESNEELTESCETKKLGQSLDCNAEVVVPWEKKIYPTVNCQPLGMSLMK(S E Q I D N O : 2)

40

> 切断されたキニノーゲン-1軽鎖

SSRIGEIKEETTVSPPHTSMAQAQDEERDSGKEQGHTRRHWDWGHEKQRKHNLGHGHKHERDQGHGHQRGHGLGHGHEQQHGLGHGHKFKLDDDDLEHQGGHVLHDHGHKHKHGHGHGHKHKNGKNGKNGKNGWKTTEHLASSEDSTTPSAQTQEKTEGPTPIPSLAKPGVTVTFSDFQSDLI

50

ATMMPPISPAPIQSDDDWIPDIQIDPNGLSFNPSDFPDTTSPKCPGRPWKSVSEINPTT
QMKESYYFDLTDGLS (S E Q I D N O : 3)

【 0 1 1 7 】

アッセイフォーマット

本明細書で開示されるバイオマーカーの値（例えば、絶対量もしくはレベルまたは相対量もしくはレベル、例えばパーセンテージ）、または本明細書で開示されるバイオマーカーの値の変化は、本明細書で記載されるアッセイおよび/または当技術分野で知られているアッセイを使用して評価することができる。いくつかの実施形態では、被験体由来の試料中の切断されたキニノーゲンのパーセンテージは本明細書で記載される方法のいずれかにおいて使用される。

10

【 0 1 1 8 】

バイオマーカーのレベルを評価するために使用することができるアッセイとしては、例えば、イムノアッセイ、例えば、ウエスタンブロット、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）（例えば、サンドイッチELISA）、ラジオイムノアッセイ、電気化学発光に基づく検出アッセイ、および関連技術が挙げられる。質量分析に基づくアプローチもまた使用することができる。発色性基質に依存するアッセイもまた使用することができる。アッセイ、例えば、ウエスタンブロットアッセイはさらに定量的イメージングシステム、例えば、LICORイメージング技術の使用を含み、これは市販されている（例えば、LICOR Biosciences製のOdyssey（登録商標）CLx赤外線イメージングシステムを参照されたい）。いくつかの実施形態では、電気化学発光検出アッセイまたは電気化学発光およびパターンアレイ技術の組み合わせに依存するアッセイが使用される（例えば、Meso Scale Discovery（MSD）からのECLまたはMULTI-ARRAY技術アッセイ）。

20

【 0 1 1 9 】

本明細書では、「測定すること」または「測定」あるいは「検出すること」または「検出」という用語は、試料内の物質の存在、非存在、分量または量（有効量とすることができる）を評価することを意味し、そのような物質の質的または量的濃度レベルの誘導、または他の方法で、被験体のものの値またはカテゴリー化を評価することが含まれる。

【 0 1 2 0 】

いくつかの実施形態では、提供されるアッセイは、ハイスループットプラットフォームで実施することができる。いくつかの実施形態では、マルチウェルプレート、例えば、24 -、48 -、96 -、384 -またはそれ以上のウェルプレートがハイスループットアッセイのために使用され得る。個々のアッセイは各ウェルで並行して実施することができる。よって、アッセイスループットを増加させるためには、複数のウェルを並行して測定するためにプレートリーダーを使用することが一般に望ましい。いくつかの実施形態では、複数のウェル（例えば、4、16、24、48、96、384、またはそれ以上のウェル）を並行してイメージングすることができるプレートリーダーを、このプラットフォームのために使用することができる。例えば、市販のプレートリーダー（例えば、PerkinElmer、Waltham、MAから入手可能なプレート：：視覚システム）が使用され得る。このプレートリーダーは動力学に基づく蛍光分析が可能である。プレート：：視覚システムは、高収集効率光学を有し、並行して96ウェルを分析するために設計された特別な光学を有する。追加の好適なパラレルプレートリーダーとしては下記が挙げられるが、それらに限定されない：SAFIRE（Tecan、San Jose、CA）、FLIPRETETRA（登録商標）（Molecular Devices、Union City、CA）、FDSS7000（Hamamatsu、Bridgewater、NJ）、およびCellLux（Perkin Elmer、Waltham、MA）。いくつかの実施形態では、発明のハイスループットスクリーニングアッセイは自動化される（例えば、ロボットアッセイに適合される）。

30

40

【 0 1 2 1 】

キット

50

本開示はまた、そのようなものを含む試料、例えば、ヒト患者由来の生体試料中の切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンを評価するために使用するためのキットを提供する。そのようなキットは他の形態、および任意で、対照としての切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンと比べて、切断されたキニノーゲンまたは無傷のキニノーゲンのいずれかに特異的に結合する検出試薬を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットはさらに、検出試薬の切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンへの結合を検出するための二次抗体および/または試薬を含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、キットは本明細書に記載される方法のいずれかにしたがって使用するための説明書を含むことができる。含められる説明書は、試料（ヒト患者から採取した生体試料とすることができる）中の切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルを測定するためのキットに含まれる構成要素の使用の仕方の記載を含むことができる。

10

【0123】

キットの使用に関する説明書は一般に、各構成要素の量および本明細書に記載されるアッセイ法を実施するのに好適な条件に関する情報を含む。キット中の構成要素は単位用量、バルクパッケージ（例えば、多回投与パッケージ）、またはサブユニット用量とすることができる。発明のキット中で供給される説明書は典型的にはラベルまたは添付文書（例えば、キットに含まれる紙シート）にかかれた説明書であるが、機械可読説明書（例えば、磁気または光記憶ディスク上で運ばれる説明書）もまた許容される。

20

【0124】

ラベルまたは添付文書は、キットは切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルを評価するために使用されることを示す。説明書は本明細書に記載される方法のいずれかを実施するために提供され得る。

【0125】

この発明のキットは好適なパッケージング内にある。好適なパッケージングとしては、バイアル、瓶、ジャー、可撓性パッケージング（例えば、密封 Mylar またはプラスチックバッグ）、などが挙げられるが、それらに限定されない。特定の装置、例えば吸入器、経鼻投与装置（例えば、アトマイザ）または注入装置、例えばミニポンプと組み合わせて使用するためのパッケージもまた企図される。キットは無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は静注用溶液バッグまたは皮下注射針により穿刺可能な栓を有するバイアルであってもよい）。容器もまた、無菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は静注用溶液バッグまたは皮下注射針により穿刺可能な栓を有するバイアルであってもよい）。

30

【0126】

キットは任意で、追加の構成要素、例えば緩衝剤および解釈情報を提供し得る。普通は、キットは容器および容器上のまたはこれと関連するラベルまたは添付文書（複数可）を含む。いくつかの実施形態では、本開示は以上で記載されるキットの内容物を含む製造物品を提供する。

【0127】

疾患診断および予後におけるアッセイ法の適用

本明細書に記載されるアッセイ法およびキットは疾患の評価、例えば、疾患の診断または予後のために適用することができる。評価は被験体を、本明細書に記載される疾患、例えば、pKa1 媒介障害、例えば H A E および自己免疫疾患、例えば R A、U C、およびクローン病の危険がある、またはこれを有するとして同定することを含み得る。評価はまた、疾患の治療をモニタすること、例えば pKa1 媒介障害、例えば H A E に対する治療の有効性を評価することを含み得る。さらに、評価は pKa1 阻害剤により治療することができる疾患を同定することを含み得る。

40

【0128】

A. 診断

50

いくつかの実施形態では、アッセイ法およびキットは、候補被験体（例えば、p K a l 媒介障害、例えばH A Eまたは自己免疫疾患、例えばR A、U C、およびクローン病を有する疑いがあるヒト患者）から採取した生体試料（例えば、血液試料または血漿試料）中の切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルを決定するために実施される。切断されたキニノーゲンのレベルはその後、試料中の、無傷のキニノーゲンまたはキニノーゲンの総量のいずれかと比較することができ、試料中の、切断されたキニノーゲンの値（例えば、パーセンテージ）、無傷のキニノーゲンの値、または両方が決定される。切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンの値は、基準値と比較することができ、被験体がp K a l 媒介障害、例えばH A Eまたは自己免疫疾患、例えばR A、U C、およびクローン病を有するか、またはその危険があるかどうか決定される。例えば、切断されたキニノーゲンのパーセンテージが基準数字にある、またはそれより高い場合、被験体は、p K a l 媒介障害、例えばH A E、R A、U C、およびクローン病を有する、またはその危険があるとして同定することができる。あるいは、無傷のキニノーゲンのパーセンテージが基準数字にある、またはそれより低い場合、被験体はp K a l 媒介障害、例えばH A E、R A、U C、およびクローン病を有する、またはその危険があるとして同定することができる。

10

【0129】

基準値は切断されたキニノーゲンパーセンテージの対照レベルとすることができる。いくつかの実施形態では、対照レベルは、対照試料、例えば健康な被験体または健康な被験体の集団（好ましくは候補被験体と同じ種である）から得られた試料（例えば、血液または血漿試料）中の切断されたキニノーゲンのパーセンテージである。本明細書では、健康な被験体は、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルが測定される時に、見かけ上、標的疾患（例えば、p K a l 媒介障害、例えばH A Eまたは自己免疫疾患、例えばR A、U S、およびクローン病）を有さない、または疾患の病歴を有さない被験体である。

20

【0130】

対照レベルはまた、あらかじめ決められたレベルとすることができる。そのようなあらかじめ決められたレベルは、標的疾患を有さない、またはその危険がない被験体の集団における切断されたキニノーゲンのパーセンテージを表すことができる。これはまた、標的疾患を有する被験体の集団における切断されたキニノーゲンのパーセンテージを表すことができる。

30

【0131】

あらかじめ決められたレベルは様々な形態をとることができる。例えば、単一のカットオフ値、例えば中央値または平均とすることができる。いくつかの実施形態では、そのようなあらかじめ決められたレベルは比較群に基づいて確立することができ、例えばその場合、1つの規定された群は標的疾患を有することが知られており、別の規定された群は標的疾患を有さないことが知られている。あるいは、あらかじめ決められたレベルは範囲、例えば、あらかじめ決められた百分率内の対照集団における切断されたキニノーゲンのパーセンテージを表す範囲とすることができる。

40

【0132】

本明細書で記載される対照レベルはルーチン技術により決定することができる。いくつかの例では、対照レベルは、対照試料（本明細書で記載される）について、従来の方法（例えば、本明細書で記載される試験試料中の、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルを得るための同じアッセイ）を実施することにより得ることができる。他の実施例では、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルは、対照集団のメンバーから得ることができ、結果は、例えば、コンピューターによるプログラムにより分析することができ、対照集団における、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルを表す対照レベル（あらかじめ決められたレベル）が得られる。

【0133】

候補被験体から得られた試料中の切断されたキニノーゲンのパーセンテージを、本明細

50

書で記載される基準値と比較することにより、候補被験体が p K a l 媒介疾患（例えば、H A E または自己免疫疾患、例えば R A、U C、およびクローン病）を有するか、またはその危険があるかどうかについて決定することができる。例えば、候補被験体の試料中の切断されたキニノーゲンのパーセンテージが、基準値から逸脱する（例えば、基準値と比べて増加した）場合、候補被験体は疾患を有する、またはその危険があるとして同定され得る。基準値が標的疾患を有する被験体の集団における切断されたキニノーゲンのパーセンテージ範囲を表す場合、範囲内にある候補の試料中の切断されたキニノーゲンのパーセンテージは、候補被験体が標的疾患を有するか、またはその危険があることを示す。

【0134】

本明細書では、「上昇したレベルまたは基準値を超えるレベル」は、切断されたキニノーゲンのレベル/パーセンテージが、基準値、例えば、対照試料中の切断されたキニノーゲンのレベル/パーセンテージの予め決められた閾値より高いことを意味する。対照レベルは本明細書で詳細に記載される。切断されたキニノーゲンの上昇したパーセンテージは、基準値より、例えば、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500% またはそれ以上高い切断されたキニノーゲンパーセンテージを含む。切断されたキニノーゲンの上昇したパーセンテージはまた、ゼロ状態（例えば、試料中の捕捉試薬に結合した切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンなし、または検出不能）から非ゼロ状態（例えば、いくらかの、または検出可能な切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲン）への現象の増加を含む。

10

20

【0135】

本明細書では、「減少したパーセンテージ/レベルまたは基準値より低いパーセンテージ/レベル」は切断されたパーセンテージ/レベルが基準値、例えば対照試料中の切断されたキニノーゲンの予め決められた閾値より低いことを意味する。対照レベルは本明細書で詳細に記載される。切断されたキニノーゲンの減少したレベルは、基準値より、例えば、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500% またはそれ以上低い切断されたキニノーゲンを含む。捕捉試薬に結合した切断されたキニノーゲンの減少したレベルはまた、非ゼロ状態（例えば、試料中のいくらかの、または検出可能な切断されたキニノーゲン）からゼロ状態（例えば、試料中の切断されたキニノーゲンなし、または検出不能）への現象の減少を含む。

30

40

【0136】

いくつかの実施形態では、候補被験体は p K a l 媒介障害、例として、例えば H A E または自己免疫疾患、例えば R A、U C、およびクローン病の症状を有するヒト患者である。例えば、被験体は浮腫、腫脹（ここで、前記腫脹は完全にまたは主に末梢性である）；蕁麻疹；感染の証拠がない場合の発赤、疼痛、および腫脹；ヒスタミンに媒介されない浮腫、腫脹の再発性発作、またはそれらの組み合わせを有する。他の実施形態では、被験体は、試料を採取した時点で p K a l 媒介障害の症状を有さず、は p K a l 媒介障害の症状の病歴を有さず、または p K a l 媒介障害、例えば H A E の病歴を有さない。さらに他の実施形態では、被験体は、抗ヒスタミン療法、コルチコステロイド療法、または両方に耐性がある。

【0137】

(i) H A E

いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン活性が関与する疾患または病状は遺伝性血管浮腫（H A E）である。遺伝性血管浮腫（H A E）は「クインケ浮腫」、C 1 エステラーゼインヒビター欠損、C 1 インヒビター欠損、および遺伝性血管神経性浮腫（H A N E）としても知られている。H A E は、重篤な腫脹の再発性エピソード（血管浮腫）により特徴付けられ、これは、例えば、肢、顔、生殖器、胃腸管、および気道に影響し得る。H A E の症状としては、例えば、腕、脚、唇、眼、舌、および/または咽頭における腫脹；咽頭腫脹および突然の嘔声に関与し得る気道閉塞；明らかな原因のない腹部疝痛の反復工

50

ピソード；および/または腸の腫脹（重篤であり、腹部痙痛、嘔吐、脱水、下痢、疼痛、および/またはショックにつながる）がある）が挙げられる。このHAEを有する個体の約3分の1が発作中に輪状紅斑と呼ばれるかゆみのない皮膚発疹を発症する。

【0138】

気道の腫脹は生命を危うくする可能性があり、いくらかの患者において死因となっている。死亡率は15 - 33%と推定される。HAEにより、約15,000 - 30,000救急部来診/年に到達している。

【0139】

外傷またはストレス、例えば、歯科手順、疾病（例えば、風邪およびインフルエンザなどのウイルス病）、月経、および外科手術は血管浮腫の発作を引き起こし得る。HAEの急性発作を防止するために、患者は前に発作を引き起こした特定の刺激を回避しようと努めることができる。しかしながら、多くの場合、発作はトリガーがわからないまま起こる。典型的に、HAE症状は最初に幼児期に現れ、思春期の間に悪化する。平均して、未治療の個体は、1~2週毎に発作を有し、ほとんどのエピソードは約3~4日続く（ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema）。発作の頻度および持続期間は、遺伝性血管浮腫を有する人々の間で、さらに同じファミリー内の人々の間で大きく変動する。

10

【0140】

I、IIおよびIII型として知られている3つの型のHAEが存在する。HAEは、50,000の人々のうちの1人が罹患すること、I型は症例の約85パーセントを占め、II型は症例の約15パーセントを占め、III型は非常にまれであると推定される。III型は最も最近説明された型であり、女性においてのみ起こると元々考えられていたが、罹患した男性を有するファミリーが同定されている。

20

【0141】

HAEは常染色体優性パターンで遺伝し、そのため、罹患した人間は突然変異を一人の罹患した親から受け継ぐことができる。遺伝子中の新たな突然変異もまた起こる可能性があり、よって、HAEはまた、それらのファミリーにおいて障害の病歴のない人々において起こり得る。症例の20 - 25%が新しい自然突然変異に起因すると推定される。

【0142】

SERPING1遺伝子における突然変異は遺伝性血管浮腫I型およびII型を引き起こす。SERPING1遺伝子は、C1インヒビタータンパク質を作るための指示を提供し、それは、炎症を制御するために重要である。C1インヒビターは炎症を促進するある一定のタンパク質の活性をブロックする。遺伝性血管浮腫I型を引き起こす突然変異は、血液中のC1インヒビターのレベルを低減させる。対照的に、II型を引き起こす突然変異により、異常に機能するC1インヒビターが産生される。適正なレベルの機能的C1インヒビターがないと、過剰量のブラジキニンが生成される。ブラジキニンは、血管壁を通過して体組織中への流体の漏れを増加させることにより、炎症を促進する。体組織中での流体の過剰蓄積は、遺伝性血管浮腫I型およびII型を有する個体において見られる腫脹のエピソードを引き起こす。

30

【0143】

F12遺伝子における突然変異は、遺伝性血管浮腫III型のいくつかの症例と関連する。F12遺伝子は、凝固因子XIIを作るための指示を提供する。血液凝固（凝固）において重要な役割を果たすことに加えて、第XII因子はまた、炎症の重要な刺激物質であり、ブラジキニンの産生に関与する。F12遺伝子におけるある一定の突然変異により、増加した活性を有する第XII因子が産生される。その結果、より多くのブラジキニンが生成され、血管壁はより漏出性となり、腫脹のエピソードが誘発される。遺伝性血管浮腫III型の他の症例の原因は未知のままである。1つ以上のいまだ同定されていない遺伝子における突然変異はこれらの症例における障害の一因である可能性がある。

40

【0144】

HAEは同様に、アレルギーまたは他の医学的状態に起因する血管浮腫の他の形態を提

50

示する可能性があるが、これは、原因および治療が著しく異なっている。遺伝性血管浮腫がアレルギーと誤診された場合、最も一般的には抗ヒスタミン薬、ステロイド、および/またはエピネフリンで治療され、これらは典型的にはHAEにおいて無効であるが、エピネフリンは生命を危うくする反応に対して使用することができる。誤診はまた、腹部腫脹を有する患者に対し不必要な試験手術をもたらし、何人かのHAE患者では、腹部疼痛が心因性と間違っ て診断されている。

【0145】

HAEの症状は、例えば、質問表、例えば、患者、臨床医、または家族により記入される質問表を用いて評価することができる。そのような質問表は当技術分野で知られており、例えば、視覚的アナログスケールが挙げられる。例えば、McMillan, C. V. et al. Patient. 2012; 5(2): 113-26を参照されたい。

10

【0146】

(ii) 関節リウマチ

関節リウマチ(RA)は関節腫脹および疼痛を引き起こす自己免疫性、慢性炎症疾患であり、普通は関節破壊が起こる。RAは一般に、疾患活動性の「再燃」が疾患症状の緩解によって中断される、再発/緩解過程をたどる。RAは多くの追加の炎症性障害、例えば下記と関連する: シェーグレン症候群(涙および唾液腺の炎症により引き起こされるドライアイおよびマウス)、胸膜炎(深呼吸および咳嗽時に疼痛を引き起こす胸膜の炎症)、リウマトイド結節(肺内で発症する炎症の結節性部位)、心膜炎(横になるまたは前かがみになると疼痛を引き起こす心膜の炎症)、フェルティ症候群(RAと共に観察される脾腫および白血球減少症、被験体が感染しやすくなる)、および血管炎(血流をブロックする可能性のある血管の炎症)。血漿カリクレインは関節リウマチに關与する。

20

【0147】

活性RAの症状としては、疲労、食欲不振、微熱、筋肉および関節痛、ならびにこわばりが挙げられる。筋肉および関節のこわばりは、通常朝に、および不活動期間後に最も顕著である。再燃中、関節は、一般に滑膜炎の結果として、頻繁に赤くなり、腫脹し、痛み、および圧痛がある。

【0148】

関節リウマチのための治療は、薬物療法、安静、関節強化運動、および関節保護の組み合わせを含む。2つのクラスの薬物療法が関節リウマチの治療において使用される: 抗炎症「第一選択薬物」および「疾患修飾性抗リウマチ薬」(DMARD)。第一選択薬物としては、NSAID(例えば、アスピリン、ナプロキセン、イブプロフェン、およびエトドラク)およびコルチゾン(コルチコステロイド)が挙げられる。DMARD、例えば金(例えば、金塩、金チオグルコース、金チオマレート、経口金)、メトトレキサート、スルファサラジン、D-ペニシラミン、アザチオプリン、シクロホスファミド、クロランブシル、およびシクロスポリン、レフルノミド、エタネルセプト、インフリキシマブ、アナキンラ、およびアダリムマブ、およびヒドロキシクロロキンは疾患緩解を促進し、進行性関節破壊を防止するが、これらは抗炎症薬ではない。

30

【0149】

RAおよびRAの症状を評価するのに有用なスケールとしては、例えば、関節リウマチ重症度スケール(RASS; Bardwell et al., (2002) Rheumatology 41(1): 38-45)、SF-36関節炎特異健康インデックス(ASHI; Ware et al., (1999) Med. Care. 37(5 Suppl): MS40-50)、関節炎衝撃測定スケールまたは関節炎衝撃測定スケール2(AIMSまたはAIMS2; Meenan et al., (1992) Arthritis Rheum. 35(1): 1-10); スタンフォード健康評価質問表(HAQ)、HAQII、または改変HAQ(例えば、Pincus et al., (1983) Arthritis Rheum. 26(11): 1346-53を参照されたい)が挙げられる。

40

50

【0150】

(i i i) 腸疾患 (I B D) - クロウン病および潰瘍性大腸炎

炎症性腸疾患 (I B D) は大腸および、場合によっては、小腸の炎症状態の群である。I B D の主要な形態はクロウン病および潰瘍性大腸炎 (U C) である。ずっと少ない症例には他の形態の I B D が関与している：コラーゲン大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、便流変更性大腸炎、ベーチェット症候群、感染性大腸炎、および不確定大腸炎。クロウン病と U C の間の主な違いは炎症性変化の位置および性質である。クロウン病は口から肛門までの胃腸管の任意の部分に影響する可能性があるが (スキップ病変) 、症例の大部分は回腸末端において始まる。潰瘍性大腸炎は、対照的に、結腸および直腸に限定される。顕微鏡的に、潰瘍性大腸炎は粘膜 (腸の上皮層) に限定されるが、クロウン病は腸壁全体に影響する。最後に、クロウン病および潰瘍性大腸炎は異なった割合で腸外徴候を与える (例えば肝臓障害、関節炎、皮膚徴候および眼障害) 。

10

【0151】

I B D の症状としては、腹部疼痛、嘔吐、下痢、血便、体重減少、体重増加および様々な関連する愁訴または疾患 (関節炎、壊疽性膿皮症、原発性硬化性胆管炎) が挙げられる。診断は、一般に病理学的病変の生検を伴う大腸内視鏡検査による。

【0152】

I B D のための治療は、重症度のレベルによって、症状を制御するために免疫抑制を必要とする場合がある。免疫抑制剤、例えばアザチオプリン、メトトレキサート、または 6 - メルカプトプリンが使用され得る。より一般的には、I B D の治療には、メサラミンの一形態が必要とされる。しばしば、ステロイドが疾患再燃を制御するために使用されており、かつては、維持薬物として許容されていた。生物製剤、例えばインフリキシマブは、クロウン病または潰瘍性大腸炎を有する患者を治療するために使用されてきた。重篤な症例は、外科手術、例えば腸切除、狭窄形成あるいは一時的または永久的人工肛門造設または回腸瘻造設を必要とする場合がある。I B D のための別の医薬治療は様々な形態で存在するが、しかしながら、そのような方法は、長期のステロイド曝露または外科的切除を回避するために、基礎病変を制御することに集中する。通常、治療は、高い抗炎症効果を有する薬物、例えばプレドニゾンを投与することにより開始される。炎症がうまく制御されるとすぐに、患者は通常、より軽い薬物、例えばアサコール - またはメサラミン - に切り換えられ、疾患が緩解で維持される。うまくいかなければ、前記免疫抑制剤薬物のメサラミン (抗炎症効果も有し得る) との組み合わせが、患者によって、投与されることがあり、またはされないこともある。

20

30

【0153】

(i v) 他の p K a 1 媒介またはブラジキニン媒介障害

血漿カリクレイン活性と関連する他の例示的な疾患または病状としては下記が挙げられる：ヒスタミン非依存性特発性血管浮腫、関節リウマチ、クロウン病、潰瘍性大腸炎、ループス、アルツハイマー病、敗血症性ショック、熱傷、脳虚血 / 再灌流傷害、脳浮腫、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、黄斑浮腫、血管炎、動脈または静脈血栓症、補助人工心臓またはステントと関連する血栓症、血栓症を伴うヘパリン誘導血小板減少症、血栓塞栓性疾患、および不安定狭心症を伴う冠動脈心疾患、浮腫、眼疾患、痛風、腸疾患、口腔粘膜炎、神経障害性疼痛、炎症痛、脊柱管狭窄 - 変性脊椎疾患、術後イレウス、大動脈瘤、変形性関節症、遺伝性血管浮腫、肺塞栓症、脳卒中、頭部外傷もしくはペリ腫瘍脳浮腫、敗血症、急性中大脳動脈 (M C A) 虚血性イベント (脳卒中) 、再狭窄 (例えば、血管形成術後) 、全身性エリテマトーデス腎炎、自己免疫疾患、炎症疾患、心血管疾患、神経疾患、タンパク質ミスフォールディングと関連する疾患、血管新生と関連する疾患、高血圧性腎症および糖尿病性腎症、アレルギー性および呼吸器疾患 (例えばアナフィラキシー、喘息、慢性閉塞性肺疾患、急性呼吸促迫症候群、嚢胞性線維症、持続性、鼻炎) および組織傷害 (例えば火傷または化学的損傷) 。

40

【0154】

本明細書で記載される p K a 1 媒介障害を有する、またはその危険があるとして同定さ

50

れた被験体は好適な治療、例えば本明細書で記載されるものに供することができる。

【0155】

B. 治療有効性評価

本明細書で記載されるアッセイ法はまた、 pK_{a1} 媒介障害（例えば、HAE）に対する治療の有効性を評価するために適用することができる。例えば、複数の生体試料（例えば、血液または血漿試料）は治療前後または治療の過程のいずれかに、治療が実施される被験体から採取することができる。切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルは、本明細書で記載されるアッセイ方法のいずれかにより測定することができる。切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンの値（例えば、パーセンテージ）はこれに応じた決定することができる。切断されたキニノーゲンのパーセンテージが治療後または治療の過程にわたって減少した（初期に採取された試料中のものと比べた場合の、後に採取された試料中の切断されたキニノーゲンパーセンテージ）または無傷のキニノーゲンのパーセンテージが治療後または治療の過程にわたって増加した場合、治療が有効であることを示す。いくつかの例では、治療は治療薬、例えば本明細書で記載されるカリクレイン結合剤、本明細書で記載されるブラジキニンB2受容体アンタゴニスト、または本明細書で記載されるC1-INH補充剤を含む。治療薬の例としては、DX-2930またはDX88が挙げられるが、それらに限定されない。

10

【0156】

被験体が、治療に応答しないとして同定された場合、より高い用量および/または投与頻度の治療薬が同定された被験体に投与される。いくつかの実施形態では、治療に応答する、またはさらなる治療は必要ないとして同定された被験体においては、治療薬の用量または投与頻度が維持され、低くされ、または中止される。あるいは、異なる治療を、第1の治療に応答しないと見出された被験体に適用することができる。

20

【0157】

pK_{a1} 阻害剤による治療の影響を受けやすい障害の同定

切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンの値はまた、 pK_{a1} 阻害剤により治療可能であり得る障害を同定するために頼ることができる。この方法を実施するために、標的疾患を有する被験体から採取した試料（例えば、血液試料または血漿試料）中の切断されたキニノーゲンのレベルおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルは、好適なアッセイ、例えば、本明細書で記載されるもの、例えばウエスタンブロットアッセイに測定することができる。切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンの値、例えばパーセンテージは本明細書で記載されるように決定することができる。切断されたキニノーゲンおよび/または無傷のキニノーゲンの値は、本明細書で記載される基準値と比較することができる。切断されたキニノーゲン/無傷のキニノーゲンの値が、基準値から逸脱する場合（例えば、上昇したまたは減少した）、 pK_{a1} 阻害剤は、疾患の治療に有効であり得ることを示す。例えば、切断されたキニノーゲンのパーセンテージが治療後または治療の過程にわたって減少する場合、治療は有効であるとして同定することができる。あるいは、無傷のキニノーゲンのパーセンテージが治療後または治療の過程にわたって増加する場合、治療は有効であると同定される。

30

【0158】

いくつかの実施形態では、切断されたおよび/または無傷のキニノーゲンのレベルは、キニノーゲンの他の形態と比べて、切断されたキニノーゲンまたは無傷のキニノーゲンのいずれかに特異的に結合する検出試薬（例えば、抗体）を使用して測定することができる。いくつかの例では、抗体は、無傷のキニノーゲンと比べて切断されたキニノーゲンに特異的に結合する。他の実施例では、抗体は、切断されたキニノーゲンの軽鎖のC末端に特異的に結合する。

40

【0159】

疾患が pK_{a1} 阻害剤の影響を受けやすい（これにより治療することができる）と同定された場合、方法はさらに、疾患を有する被験体に有効量の pK_{a1} 阻害剤、例えば、DX-88、EPIKAL-2、またはDX-2930を投与することを含むことができる

50

。

【0160】

治療

本明細書で記載される方法のいずれかにより同定される、 pK_{a1} 媒介またはブラジキニン媒介障害の危険がある、またはこれを患う（例えば、有する）被験体は任意の適切な治療薬で治療することができる。いくつかの実施形態では、提供される方法は、提供されるアッセイ、例えば、バイオマーカー検出のアウトプットに基づき、被験体に対する治療を選択することを含む。

【0161】

いくつかの実施形態では、方法は、アッセイ、例えば、バイオマーカー検出のアウトプットに基づき、被験体への投与のための、治療薬、例えば、本明細書で記載されるカリクレイン結合剤、例えば、本明細書で記載されるブラジキニンB2受容体アンタゴニスト、例えば、本明細書で記載されるC1-INH補充剤を選択すること、または投与することの1つまたは両方を含む。

10

【0162】

いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質またはポリペプチドは被験体に投与される。いくつかの実施形態では、カリクレイン結合剤はカリクレイン阻害剤、例えば、ペプチド、小分子阻害剤、カリクレイン抗体、またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、ブラジキニンB2受容体のアンタゴニストが被験体に投与される。いくつかの実施形態では、C1-INH補充治療薬が被験体に投与される。

20

【0163】

治療薬、例えば、カリクレイン阻害剤、例えば、ブラジキニンB2受容体アンタゴニスト、例えば、C1-INH補充剤は、血漿カリクレインおよび/またはブラジキニン活性が関与する疾患または病状の治療のための併用療法の一部としての別の療法と共に投与することができる。例えば、カリクレイン阻害剤、ブラジキニンB2受容体アンタゴニスト、またはC1-INH補充剤の1つ以上、例えば、カリクレイン阻害剤、ブラジキニンB2受容体アンタゴニストまたはC1-INH補充剤の1つ以上と、別の療法との併用療法が、複数の異なる構造で提供され得る。第1の薬剤は、他の療法の投与前後に投与され得る。場合によっては、第1の薬剤および別の療法（例えば、治療薬）は同時に、または時間的に非常に近接させて（例えば、注射間の短い間隔で、例えば同じ治療セッション中）投与される。第1の薬剤および他の療法はまた、より大きな時間間隔で投与され得る。

30

【0164】

血漿カリクレイン結合剤

血漿カリクレイン結合剤（例えば、結合タンパク質、例えば、ポリペプチド、例えば、阻害ポリペプチド、例えば、抗体、例えば、阻害抗体、または他の結合剤、例えば、小分子）は様々な疾患および病状、例えば、血漿カリクレイン活性が関与する疾患および病状に有用な治療薬である。例えば、いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン活性が関与する疾患または病状は遺伝性血管浮腫（HAE）である。いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質またはポリペプチドは pK_{a1} 媒介またはブラジキニン媒介障害の危険があるまたはこれを患う被験体に投与される。

40

【0165】

カリクレイン、または組織および/または血漿カリクレインの多くの有用なタンパク質阻害剤はクニツドメインを含む。本明細書では、「クニツドメイン」は少なくとも51のアミノ酸を有し、少なくとも2つ、好ましくは3つのジスルフィドを含むポリペプチドドメインである。ドメインは1番目と6番目のシステイン、2番目と4番目、および3番目と5番目のシステインがジスルフィド結合を形成するように折り畳まれ（例えば、58のアミノ酸を有するクニツドメインでは、システインは、以下で提供されるBPTI相同配列の番号に従い、アミノ酸5、14、30、38、51、および55に対応する位置に存在することができ、ジスルフィドは、位置5と55、14と38、および30と51のシステイン間で形成し得る）、または、2つジスルフィドが存在する場合、それらは

50

それらのシステインの対応するサブセット間で形成することができる。個々のシステイン間のスペーシングは、以下で提供されるBPTI配列の番号付けに従い、以下に対応する位置の間の下記のスペーシングの7、5、4、3、2、1または0アミノ酸内とすることができる：5～55、14～38、および30～51。BPTI配列は任意の一般的なクニツドメイン中の特定の位置を示す基準として使用することができる。対象となるクニツドメインのBPTIとの比較は、最適整列を同定することにより実施することができ、この場合、整列されたシステインの数が最大化される。

【0166】

BPTIのクニツドメインの3D構造(高分解能)が知られている。X線構造の1つはBrookhavenタンパク質データバンクに「6PTI」として登録されている。いくつかのBPTIホモログの3D構造が知られている(Eigenbrot et al., (1990) Protein Engineering, 3(7):591-598; Hynes et al., (1990) Biochemistry, 29:10018-10022)。少なくとも81のクニツドメイン配列が知られている。既知のヒトホモログは組織因子経路インヒビター(TFPI)としても知られているLACIの3つくニツドメイン(Wun et al., (1988) J. Biol. Chem. 263(13):6001-6004; Girard et al., (1989) Nature, 338:518-20; Novotny et al., (1989) J. Biol. Chem., 264(31):18832-18837)インター-トリプシンインヒビター、APP-Iの2つくニツドメイン(Kido et al., (1988) J. Biol. Chem., 263(34):18104-18107)、コラーゲン由来のクニツドメイン、TFPI-2の3つのクニツドメイン(Sprecher et al., (1994) PNAS USA, 91:3353-3357)、肝細胞増殖因子アクチベータインヒビター1型のクニツドメイン、肝細胞増殖因子アクチベータインヒビター2型のクニツドメイン、米国特許公開番号第2004-0152633号において記載されるクニツドメインを含む。LACIは3つのクニツドメインを含む、39kDaの分子量を有するヒト血清リン糖タンパク質である(表1におけるアミノ酸配列)。

10

20

【表 4】

表 1 : 例示的な天然クニツドメイン

LACI: (SEQ ID NO. 4)	<p>1 <u>MIYTMKKVHA</u> <u>LWASVCLLLN</u> <u>LAPAPLN</u>Ads eedehtiit dtelpplklM</p> <p>51 HSFCAFKADD GPCCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN</p> <p>QNRFESLEEC</p> <p>101 KKMCTRDnan riiktllqqe <u>kpdfC</u><u>fleed</u> <u>pgiC</u><u>rgyitr</u> <u>yfynnqtkqC</u></p> <p>151 <u>erfkyggClg</u> <u>nmnnfetlee</u> <u>CkniCedgpn</u> <u>gfqvdnygtq</u> <u>lnavnnsltp</u></p> <p>201 qstkvpslfe <u>fhgpswCltp</u> <u>adrglCrane</u> <u>nrfyynsvig</u> <u>kCrp</u><u>fkysgC</u></p> <p>251 <u>ggnennftsk</u> <u>qeClraCkkg</u> <u>fiqriskggl</u> <u>iktkrkrkkq</u> <u>rvkiayeeif</u></p> <p>301 vknm</p> <p>シグナル配列(1-28)を大文字で記し、下線を引く LACI-K1(50-107)を大文字で記す LACI-K2(121-178)に下線を引く LACI-K3(211-270)を太字で記す</p>	10
BPTI (SEQ ID NO.5)	<p>1 2 3 4 5</p> <p>1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678</p> <p>RPDFCLEPPYT<u>GPC</u>KARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRN<u>NFK</u>SAEDC</p> <p>MRT<u>CGGA</u></p>	20

【 0 1 6 7 】

上記クニツドメインはLACI-K1(残基50~107)、LACI-K2(残基121~178)、およびLACI-K3(213~270)と呼ばれる。LACIのcDNA配列は、Wunら(J. Biol. Chem., 1988, 263(13):6001-6004)において報告されている。Girardら(Nature, 1989, 338:518-20)は3つくニツドメインの各々のP1残基が変化された突然変異研究を報告している。LACI-K1はF.VIIaが組織因子と複合体化した時に第VIIa因子(F.VIIa)を阻害し、LACI-K2は第Xa因子を阻害する。

30

【 0 1 6 8 】

例示的なクニツドメインを含むタンパク質としては下記が挙げられ、丸括弧内はSWISS-PROT受入番号である：

40

- A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),
- A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAISC (Q95241),
- AMBP_PLEPL (P36992), APP2_HUMAN (Q06481), APP2_RAT (P15943),
- AXP1_ANTAF (P81547), AXP2_ANTAF (P81548), BPT1_BOVIN (P00974),
- BPT2_BOVIN (P04815), CA17_HUMAN (Q02388), CA36_CHICK (P15989),
- CA36_HUMAN (P12111), CRPT_BOOMI (P81162), ELAC_MACEU (O62845),
- ELAC_TRIVU (Q29143), EPP1_HUMAN (O95925), EPP1_MOUSE (Q9DA01),
- HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
- IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
- IMAP_DROFU (P11424), IP52_ANESU (P10280), ISC1_BOMMO (P10831),

50

ISC2_BOMMO (P10832), ISH1_STOHE (P31713), ISH2_STOHE (P81129),
 ISIK_HELPO (P00994), ISP2_GALME (P81906), IVB1_BUNFA (P25660),
 IVB1_BUNMU (P00987), IVB1_VIPAA (P00991), IVB2_BUNMU (P00989),
 IVB2_DABRU (P00990), IVB2_HEMHA (P00985), IVB2_NAJNI (P00986),
 IVB3_VIPAA (P00992), IVBB_DENPO (P00983), IVBC_NAJNA (P19859),
 IVBC_OPHHA (P82966), IVBE_DENPO (P00984), IVBI_DENAN (P00980),
 IVBI_DENPO (P00979), IVBK_DENAN (P00982), IVBK_DENPO (P00981),
 IVBT_ERIMA (P24541), IVBT_NAJNA (P20229), MCPI_MELCP (P82968),
 SBPI_SARBU (P26228), SPT3_HUMAN (P49223), TKD1_BOVIN (Q28201),
 TKD1_SHEEP (Q29428), TXCA_DENAN (P81658), UPT1_PIG (Q29100),
 AMBP_BOVIN (P00978), AMBP_HUMAN (P02760), AMBP_MERUN (Q62577),
 AMBP_MESAU (Q60559), AMBP_MOUSE (Q07456), AMBP_PIG (P04366),
 AMBP_RAT (Q64240), IATR_HORSE (P04365), IATR_SHEEP (P13371),
 SPT1_HUMAN (O43278), SPT1_MOUSE (Q9R097), SPT2_HUMAN (O43291),
 SPT2_MOUSE (Q9WU03), TFP2_HUMAN (P48307), TFP2_MOUSE (O35536),
 TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),
 TFPI_RABBIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

【 0 1 6 9 】

様々な方法を使用して配列データベースからクニツドメインを同定することができる。例えば、クニツドメインの既知のアミノ酸配列、コンセンサス配列、またはモチーフ (例えば、ProSite Motif) は、GenBank配列データベース (国立バイオテクノロジー情報センター、国立衛生研究所、Bethesda MD) に対して、例えば、BLASTを使って; HMM (隠れマルコフモデル) のPfamデータベースに対して、例えば、Pfam検索用のデフォルトパラメータを使って; SMARTデータベースに対して; またはProDomデータベースに対して検索することができる。例えば、Pfam Release 9のPfam受入番号PF00014は、多くのクニツドメインおよびクニツドメインを同定するためのHMMを提供する。Pfamデータベースの説明は、Sonhammer et al. (1997) Proteins 28 (3): 405 - 420において見出すことができ、HMMの詳細な説明は、例えば、Gribskov et al. (1990) Meth. Enzymol. 183: 146 - 159; Gribskov et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 4355 - 4358; Krogh et al. (1994) J. Mol. Biol. 235: 1501 - 1531; およびStultz et al. (1993) Protein Sci. 2: 305 - 314において見出すことができる。Schultz et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5857 and Schultz et al. (2000) Nucl. Acids Res 28: 231において記載されるHMMのSMARTデータベース (Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE)。SMARTデータベースは、HMMer2検索プログラムの隠れマルコフモデルを使ったプロファイリングによって同定されたドメインを含む (R. Durbin et al. (1998) Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press)。データベースはまた、アノテーションが付され、モニタされる。ProDomタンパク質ドメインデータベースは相同ドメインの自動編集から構成される (Corpet et al. (1999), Nucl. Acids Res. 27: 263 - 267)。ProDomの最新バージョンは、SWISS-PROT38およびTREMBLタンパク質データベースの再帰的PSI-BLAST検索を使用して構築される (Altschul et al. (1997) Nu

10

20

30

40

50

cleic Acids Res. 25:3389-3402; Gouzy et al. (1999) *Computers and Chemistry* 23:333-340)。データベースは自動的に、各ドメインについてコンセンサス配列を生成する。Prositeではクニツドメインがモチーフとして列挙され、クニツドメインを含むタンパク質が同定される。例えば、Falquet et al. *Nucleic Acids Res.* 30:235-238 (2002) を参照されたい。

【0170】

クニツドメインは、主として、2フループ領域(「結合ループ」)中のアミノ酸を使って標的プロテアーゼと相互作用する。第1のループ領域は、BPTIのアミノ酸13-20にほぼ相当する残基間にある。第2のループ領域はBPTIのアミノ酸31-39にほぼ相当する残基間にある。クニツドメインの例示的なライブラリは、第1のおよび/または第2ループ領域中の1つ以上のアミノ酸位置を変化させる。カリクレインと相互作用するクニツドメインをスクリーニングする、または改善された親和性バリエーションを選択するのに、変化させるのが特に有用な位置としては、下記が挙げられる: BPTIの配列に関して13、15、16、17、18、19、31、32、34、および39位。これらの位置の少なくともいくらかは、標的プロテアーゼと密接に接触すると予想される。他の位置、例えば、3次元構造において前記位置に隣接する位置を変化させることもまた有用である。

10

【0171】

クニツドメインの「フレームワーク領域」は、クニツドメインの一部である残基であるが、第1および第2の結合ループ領域中の残基、すなわち、BPTIのアミノ酸13-20およびBPTIの31-39にほぼ相当する残基を特に除外した残基であると規定される。反対に、結合ループ中ではない残基は、より広い範囲のアミノ酸置換(例えば、保守的および/または非保守的置換)を許容し得る。

20

【0172】

1つの実施形態では、これらのクニツドメインは、ヒトリボタンパク質関連凝固インヒビター(LACI)タンパク質のクニツドメイン1を含む、ループ構造のバリエーション形態である。LACIは3つの内部の、明確に定義された、ペプチドループ構造を含み、それらはパラダイムクニツドメインである(Girard, T. et al., 1989, *Nature*, 338:518-520)。本明細書に記載される、LACIのクニツドメイン1のバリエーションはスクリーニングされ、単離されており、カリクレインに増強された親和性および特異性で結合する(例えば、米国特許第5,795,865号および6,057,287号を参照されたい)。これらの方法はまた、他のクニツドメインフレームワークに適用することができ、カリクレイン、例えば、血漿カリクレインと相互作用する他のクニツドメインが得られる。カリクレイン機能の有用なモジュレーターは、典型的には、カリクレイン結合および阻害アッセイを使用して決定されるように、カリクレインに結合および/または阻害する。

30

【0173】

いくつかの態様では、カリクレイン結合剤(例えば、結合タンパク質、例えば、ポリペプチド、例えば、阻害ポリペプチド、例えば、抗体、例えば、阻害抗体、または他の結合剤、例えば、小分子)は血漿カリクレインの活性形態に結合する。いくつかの実施形態では、カリクレイン結合剤、血漿カリクレイン、例えば、ヒト血漿カリクレインおよび/またはマウスカリクレインに結合し、阻害する。

40

【0174】

血漿カリクレイン結合タンパク質は全長(例えば、IgG(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(例えば、IgA1、IgA2)、IgD、およびIgE)とすることができ、または抗原結合フラグメント(例えば、Fab、F(ab')₂またはscFvフラグメント)のみを含むことができる。結合タンパク質は2つの重鎖免疫グロブリンおよび2つの軽鎖免疫グロブリンを含むことができ、または単鎖抗体とすることができ、血漿カリクレイン結合タンパク質は組換えタンパク質、例えば

50

ヒト化、CDRグラフト、キメラ、脱免疫化、またはインビトロ生成抗体とすることができ、任意でヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の定常領域を含み得る。1つの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質はモノクローナル抗体である。

【0175】

いくつかの実施形態では、カリクレイン結合タンパク質は血漿カリクレイン、例えば、ヒト血漿カリクレインおよび/またはマウスカリクレインに結合し、阻害する。例示的な血漿カリクレイン結合タンパク質は米国公開第20120201756号(その全内容は参照により本明細書に組み込まれる)で開示される。いくつかの実施形態では、カリクレイン結合タンパク質は、下記からなる群より選択される抗体の軽および/または重鎖を有する抗体(例えば、ヒト抗体)である: M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書ではDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書ではDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04。いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質は、M162-A04、M160-G12、M142-H08、X63-G06、X101-A01(本明細書ではDX-2922とも呼ばれる)、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X81-B01、X67-D03、X67-G04、X115-B07、X115-D05、X115-E09、X115-H06、X115-A03、X115-D01、X115-F02、X124-G01(本明細書ではDX-2930とも呼ばれる)、X115-G04、M29-D09、M145-D11、M06-D09およびM35-G04と競合し、またはこれと同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質はDX-2930である。

10

20

【0176】

DX-2930の重鎖および軽鎖可変領域配列が以下で提供される。

DX-2930重鎖可変領域:

EVQLLES G GGLVQP G G S L R L S C A A S G F T F S H Y I M M W V R Q A
P G K G L E W V S G I Y S S G G I T V Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A Y R R I G V P R R D E F D I W G Q G T M V T V
S S (S E Q I D N O : 6)

30

DX-2930軽鎖可変領域:

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S W L A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y K A S T L E S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P
D D F A T Y Y C Q Q Y N T Y W T F G Q G T K V E I (S E Q I D N O : 7)

【0177】

いくつかの態様では、血漿カリクレインの活性形態に結合する、カリクレイン結合ポリペプチド(例えば、阻害ポリペプチド)。例示的なポリペプチド血漿カリクレイン剤が、下記において開示される: 米国特許第5,795,865号、米国特許第5,994,125号、米国特許第6,057,287号、米国特許第6,333,402号、米国特許第7,628,983号、および米国特許第8,283,321号、米国特許第7,064,107号、米国特許第7,276,480号、米国特許第7,851,442号、米国特許第8,124,586号、米国特許第7,811,991号、および米国公開第20110086801号(それらの各々の全内容が参照により本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、カリクレイン結合ポリペプチドはDX-88である(非天然起源のカリクレイン阻害剤、KALBITOR(登録商標)(エカランチド)としても知られている、SEQ ID NO: 8)。いくつかの実施形態では、カリクレイン阻害剤は、SEQ ID NO: 8のアミノ酸3-60の約58-アミノ酸配列を含み、または

40

50

これから構成され、またはDX-88ポリペプチドはSEQ ID NO: 8の60-アミノ酸配列を有する。

G l u A l a M e t H i s S e r P h e C y s A l a P h e L y s
 A l a A s p A s p G l y P r o C y s A r g A l a A l a H i s
 P r o A r g T r p P h e P h e A s n I l e P h e T h r A r g
 G l n C y s G l u G l u P h e I l e T y r G l y G l y C y s
 G l u G l y A s n G l n A s n A r g P h e G l u S e r L e u
 G l u G l u C y s L y s L y s M e t C y s T h r A r g A s p (S E Q I D N O : 8)

【0178】

いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質はEPIKAL-2 (SEQ ID NO: 9) であり、これは58残基アミノ酸配列 (SEQ ID NO: 8の残基3-60に対応する) を有し、IleのSerへの残基34での、およびGluのGlyへの残基39でのアミノ酸置換を有する非天然起源のカリクレイン阻害剤である。EPIKAL-2の配列が以下に示される：

E p i K a l 2 : M e t H i s S e r P h e C y s A l a P h e L y s
 A l a A s p A s p G l y P r o C y s A r g A l a A l a H i s
 P r o A r g T r p P h e P h e A s n I l e P h e T h r A r g
 G l n C y s G l u G l u P h e S e r T y r G l y G l y C y s
 G l y G l y A s n G l n A s n A r g P h e G l u S e r L e u
 G l u G l u C y s L y s L y s M e t C y s T h r A r g A s p
 (S E Q I D N O : 9)

【0179】

いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質は、本明細書で記載される結合タンパク質に対し、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質は、HCおよび/またはLCフレームワーク領域 (例えば、HCおよび/またはLC FR 1、2、3、および/または4) において、本明細書で記載される結合タンパク質に対し、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質はHCおよび/またはLC CDR (例えば、HCおよび/またはLC CDR 1、2、および/または3) において、本明細書で記載される結合タンパク質に対し、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有することができる。いくつかの実施形態では、血漿カリクレイン結合タンパク質は、定常領域 (例えば、CH 1、CH 2、CH 3、および/またはCL 1) において、本明細書で記載される結合タンパク質に対し、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上の配列同一性を有することができる。

【0180】

いくつかの態様では、小分子は血漿カリクレインの活性形態に結合する。

【0181】

ブラジキニンB2受容体アンタゴニスト

いくつかの実施形態では、ブラジキニンB2受容体アンタゴニストは被験体に投与される。例示的なブラジキニンB2受容体アンタゴニストとしては、インカチバント (F i r a z y r (登録商標)) が挙げられ、これは10アミノ酸を含むペプチド模倣薬であり、これは、天然ブラジキニンのブラジキニンB2受容体への結合をブロックする。

【0182】

C1-INH補充剤

いくつかの実施形態では、補充C1-INH剤は被験体に投与される。例示的なC1-

10

20

30

40

50

I N H 補充剤は、公的に入手可能であり、例えば、B e r i n e r t (登録商標)が挙げられ、これは、精製ヒト低温殺菌ナノ濾過C 1 - I N H 濃縮物である。

【0183】

実施例

実施例1：切断されたキニノーゲン

接触系の分析に基づいて、切断されたキニノーゲンは接触系活性化を測定するのに好適なバイオマーカーである。切断されたキニノーゲンは以前、H A E 発作中、硬変において、および敗血症中接触系活性化の結果として、上昇したことが示されている。抗体ファージディスプレイライブラリを、無傷のキニノーゲンの枯渇と組み合わせて、切断されたキニノーゲンに対してパニングした。並行してマウスを、切断されたキニノーゲンおよびハイブリドーマ細胞株から得られたモノクローナル抗体により免疫化した。どちらの試みも、切断されたおよび無傷のキニノーゲンの両方に結合する多くの異なるモノクローナル抗体を提供したが、切断されたキニノーゲンのみに結合する抗体は提供されなかった。

10

【0184】

多くの抗体を、ウエスタンブロットアッセイにおける適合性においてスクリーニングし、いくつかは、うまく働くと同定され、図2に示されるマウスm A b (クローン11H05)が含まれる。このアッセイは、ヒト血漿試料中の切断されたキニノーゲンを検出することができることが明らかである。さらに、図2のデータにより、ガラス中での血漿採取は、接触活性化およびキニノーゲン切断を防止するのに十分であることが確認される。

20

【0185】

質量分析に基づくアプローチもまた、患者血漿中の切断されたキニノーゲンを検出するために使用することができる。このアプローチでは、1つの免疫がキニノーゲンを患者試料から吸着し、溶離されたキニノーゲンをタンパク分解的に消化し、ペプチドフラグメントをL C - M C により分析する。

【0186】

実施例2：無傷のおよび切断されたキニノーゲン

ウエスタンブロットを使用して、発作中に得られ、アンチプロテアーゼカクテルを含むクエン酸塩添加血漿管中に採取した、患者由来の血漿は、無傷のキニノーゲン(すなわち、1-鎖)の量の減少を示すことを示した(図3)。切断されたキニノーゲン(すなわち、2-鎖)の増加が観察された。

30

【0187】

実施例3：切断されたキニノーゲンのレベルを測定するためのアッセイ

無傷の(1-鎖)および切断された(2-鎖)高分子量キニノーゲン(H M W K)の検出のためのウエスタンブロットアッセイを、L i c o r 検出を使用してさらに最適化させた。本明細書に記載されるこのアッセイは、動物を2-鎖H M W K で免疫化し、ハイブリドーマ融合物を1-鎖および2-鎖H M W K の両方に対し、E L I S A によりスクリーニングすることにより、ハイブリドーマ技術により生成されたマウスモノクローナル抗体(クローン11H05)を使用する。11H05m A b をウエスタンブロットアッセイにおけるその性能、H M W K の軽鎖に特異的に結合し、重鎖に結合しないその能力に基づいて選択した。軽鎖バインダーが好ましく、というのも、軽鎖は他の血漿キニノーゲン(低分子量キニノーゲン、L M W K)に存在しないからであり、それはp K a 1 基質ではない。アッセイはまた、血漿をプラスチック管に採取する重要性を証明するために使用され、というのも、ガラス管中での採取は接触系活性化となってしまったからである(図4)。

40

【0188】

いくつかの例では、下記材料および条件を本明細書に記載されるウエスタンブロットアッセイにおいて使用した：

【0189】

材料

X C e l l S u r e L o c k (登録商標)ミニセル、L i f e T e c h n o l o g i e s (I n v i t r o g e n)、C a t . # E I 0 0 0 1

50

Gel Box パワーサプライ
 iBlot (登録商標) ウェスタンブロットイングトランスファー装置、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # IB1001
 iBlot (登録商標) トランスファースタック、ニトロセルローズ、ミニ、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # IB301001
 Matrix Laboratories Impact 2 多チャンネルピペッター、または等価物
 Rainin Pipetman、様々な体積範囲、Rainin、Cat # : P-10、P-20、P-100、P-200、および P-1000、または等価物 10
 チャートレコーダを備えた - 80 フリーザー
 チャートレコーダを備えた - 20 フリーザー
 チャートレコーダを備えた 2 - 8 冷蔵庫
 0.22 μm ポリエーテルスルホン (PES) Filter Systems、Corning、Cat # 431096 または等価物
 脱イオンおよび精製水 (DI 水)、Ricca Chemical、Cat # 9150-5、または等価物
 NuPAGE 7% トリス - 酢酸ゲル、15 ウェル、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # EA03555 Box
 トリス - 酢酸 SDS 泳動用緩衝液 (20X)、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # LA0041 20
 NuPAGE 試料還元剤 (10X)、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # NP0009
 NuPAGE 試料緩衝液 (4X)、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # NP0007
 NuPAGE 4 - 12% ビス - トリスゲル、15 ウェル、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # NP0336 BOX
 MES SDS 泳動用緩衝液 (20X)、Life Technologies (Invitrogen)、Cat. # NP0002
 Odyssey ブロッキング緩衝液、LI-COR、Cat. # 927 - 40000 30
 Tween 20、Sigma、Cat. # P1379
 リン酸緩衝生理食塩水 pH 7.4、Sigma、Cat # P-3813 または等価物
 トリス、Fisher Scientific、Cat. # T393 - 5000
 塩化ナトリウム、JT Baker、Cat. # 3624 - 19
 6N 塩酸、EMD、Cat. # HX0603M - 6
 3M 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 5.2、Teknova、Cat. # S0296
 ウシ血清アルブミン (BSA)、IgG および プロテアーゼなし、Jackson ImmunoResearch、Cat. # 001 - 000 - 162
 マウスモノクローナル抗 LC HMWK 抗体クローン、クローン 11H05 (#16) 40
 、1.4 mg/mL、Dyax
 ヤギ抗マウス IRDye 680RD、LI-COR、Cat. # 926 - 68070
 Odyssey 1 色分子量マーカー、LI-COR、Cat. # 928 - 40000
 0
 アンチプロテアーゼインヒビターカクテル (10X)、Dyax により提供
 第 XI Ia 因子、1.47 mg/mL (21.6 μM)、Enzyme Research Labs、Dyax により提供
 キニノーゲン欠損血漿、Hyphen-Biomed、Dyax により提供
 単鎖 HMWK、1.61 mg/mL、Enzyme Research Labs、Cat. # HK2700
 2 - 鎖 HMWK、2.01 mg/mL、Enzyme Research Labs、 50

C a t . # H K 2 3 6 2

正常ヒト血漿試料、H A E 患者試料、および B i o r e c l a m a t i o n 試料、D y a x により提供

D X 2 9 3 0、D y a x、L o t # P U R D X 1 - L 0 1、3 2 . 1 m g / m L
D X 8 8、D y a x、L o t # B 2 0 0 7 - 0 2 9、1 0 . 1 m g / m L

【 0 1 9 0 】

プロトコル概略：

【 表 5 】

非還元試験試料調製	非還元試験試料は 5 μ L の 4X 試料緩衝液を 15 μ L の約 5%試験試料に添加することにより調製する。試料を、95 $^{\circ}$ Cまで 5 分加熱する。試料を簡単に言うと遠心分離し、全ての縮合物を試験試料マイクロ遠心チューブ蓋から除去する。	10
ゲルローディングおよび泳動	還元試料を 4-12%ビス-トリスゲルを使用して泳動させ、非還元試料を 7%トリス-酢酸ゲルを使用して泳動させる。1 色タンパク質マーカーを各ゲルのレーン 1 にロードする。QC 試料を、各ゲルのレーン 2 にロードする。還元および非還元試験試料を、適切なゲル型のレーン 3-15 にロードする。ゲルを 125V で約 75 分泳動させる。	
ゲル転写	各ゲルを、ニトロセルロース膜に iBlot トランスファースタック、ミニおよび iBlot を使用して転写する。ゲルおよびトランスファースタックを iBlot に添加した後、プログラム P0 を選択し、約 7 分間実行させる。転写が完了した後、膜を 20mL の Odyssey ブロッキング緩衝液を含むプラスチックトレイに移す。	20
膜ブロッキング	膜を 20mL の Odyssey ブロッキング緩衝液でブロックする。膜をブロッキング緩衝液と共に、プレートシェーカー上で 1 時間インキュベートする。	
マウス抗 HMWK LC mAb 調製および添加	マウス抗 HMWK LC mAb を 1 μ g/mL まで 0.2%Tween-20 を含む Odyssey ブロッキング緩衝液中で希釈する。ブロッキング緩衝液を各膜から廃棄する。20mL の体積の 1 μ g/mL 一次抗体溶液を各膜に添加し、膜をプレートシェーカー上で 1 時間、室温でインキュベートする。	30
ヤギ抗マウス IRDye680 調製および添加	ヤギ抗マウス IRDye680 を 1:15,000 希釈で調製する。ヤギ抗マウス IRDye680 を最初に 1:10 希釈で調製し、続いて 1:1,500、1:15,000 の最終希釈とする。ヤギ抗マウス IRDye680 を 0.2%Tween-20 を含む Odyssey ブロッキング緩衝液中で調製する。二次抗体溶液を各膜に添加し、膜をプレートシェーカー上で 1 時間、室温でインキュベートする。	
膜読み取り	PBS ですすいだ後、膜を Li-Cor Odyssey 上に置き、膜を読み取る。	40
膜洗浄	一次抗体インキュベーションおよび二次抗体インキュベーション後に、膜を、0.1%Tween-20 を含む PBS で、1 回の洗浄あたり 5 分、洗浄し、合計 4 回の洗浄とする。	

【 0 1 9 1 】

m A b 1 1 H 0 5 の 1 - 鎖および 2 - 鎖 H M W K を検出する能力を評価するために、精製タンパク質を H M W K 欠損血漿中に、正常血漿中で観察されるレベルを含む濃度で、添加した (図 5)。還元条件下、1 1 H 0 5 は、1 - 鎖を、2 - 鎖 H M W K よりも高い感度で検出することが明らかになった。2 つの形態の H M W K に対する m A b の感度差を説明することにより、このアッセイを使用して、患者血漿中の 1 - 鎖および 2 - 鎖 H M W K

の濃度を正確に定量することができる。あるいは、パーセント2 - 鎖シグナルは、接触活性化が関与する疑いがある血漿試料中で決定することができ、正常で健康な個体由来の血漿と比較することができる。この後者のアプローチを使用すると、アッセイを使用して異なる疾患由来の試料をスクリーニングし、接触系活性化と関連する疾患を同定することができる。

【0192】

アッセイ間および内精度および正確さ試験もまた実施した。非還元および還元条件の両方で、許容可能にアッセイを実施し、試験したパラメータ全てにわたり、25%のパーセントCV値が生成された。

【0193】

凍結 - 解凍安定性試験もまた、正常ヒト血漿に対して実施した。HMWKは、0と3の間の凍結 - 解凍サイクルでは分解しないと考えられることが決定された。

【0194】

ウエスタンブロットアッセイを遺伝性血管浮腫(HAE)、過剰な接触系活性化およびpKa1活性により引き起こされることが知られている疾患を有する患者由来の血漿試料を使用して検証した。図6に示されるように、HAE血漿中の切断されたHMWKのパーセンテージはおよそ20%であり、これは正常血漿よりも著しく高い。HAE発作中、このアッセイを使用して検出されるパーセント切断されたHMWKはさらに上昇する。このデータは明らかに、静止状態(基礎)疾患状態中の、HAE血漿中の切断されたHMWKの増加を証明する。よって、アッセイは治療的pKa1阻害剤の有効性を、それらが切断されたキノーゲンの正常レベルを回復させる程度の評価を介して、モニタするために使用することができる。

【0195】

負電荷を持つ表面または粒子、例えばリン脂質またはポリリン酸は、接触系の有効な活性化剤であることが知られており、これにより、活性pKa1の形成および1 - 鎖HMWKのタンパク質分解からのブラジキニンの生成が引き起こされる。HAE発作において接触系活性化を引き起こす生理的表面のアイデンティティは知られていない。しかしながら、HAE発作は、FXIIa生成と関連する。荷電物質、例えばデキストラン硫酸またはカオリンではなく、FXIIaの接触系開始剤としての使用により、より再現性の高い接触系活性化および最適化アッセイ性能が可能になる。FXIIaの濃度および反応条件を、HAE患者で観察されるパーセント切断されたキノーゲンに近似させるように決定した(約20 - 50%) (図7、表1)。

10

20

30

【表 6】

表 1 - F X I I a 処理ヒト血漿試料の L i c o r シグナル強度*

第XIIa因子活性化条件の還元比較								
FXIIa Conc. (nM)	インキュベーション Temp.	インキュベーション時間 (min)	単鎖	2-鎖 (56 kDa)	2-鎖 (46 kDa)	総シグナル	レーン中の %2-鎖	未処理シグナルからの %2-鎖
0	N/A	N/A	29500	202	300	30002	1.7%	N/A
2.5	37 °C	10	21900	4010	2370	28280	22.6%	25.8%
2.5	37 °C	30	19500	4240	2370	26110	25.3%	33.9%
2.5	Ice	10	20900	447	1220	22567	7.4%	29.2%
2.5	Ice	30	8160	3380	3950	15490	47.3%	72.3%
5	37 °C	10	9020	4070	2950	16040	43.8%	69.4%
5	37 °C	30	8480	4070	3770	16320	48.0%	71.3%
5	Ice	10	13300	3270	2780	19350	31.3%	54.9%
5	Ice	30	2220	5220	9420	16860	86.8%	92.5%
7.5	37 °C	10	4200	5610	6920	16730	74.9%	85.8%
7.5	37 °C	30	4530	6310	7560	18400	75.4%	84.6%
7.5	Ice	10	12100	2510	2520	17130	29.4%	59.0%
7.5	Ice	30	260	4340	12300	16900	98.5%	99.1%

レーン中の%2-鎖: 2-鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和

未処理シグナルからの%2-鎖: 1-(処理単鎖シグナル/未処理単鎖シグナル)

* 図5におけるウエスタンブロットからの試料のシグナル分析。

【 0 1 9 6 】

2.5 nM の F X I I a 濃度および最適化反応条件を使用して、15人の男性および15人の女性由来の正常ヒト血漿を、10 μg/mL の D X - 2 9 3 0 (p K a 1 活性の強力な抗体阻害剤) の存在または非存在下で検査し、およびパーセント 2 - 鎖 H M W K を決定した(表 2)。アッセイは血漿中の H M W K タンパク質分解の血漿カリクレイン阻害を検出することができることが明らかである。D X - 2 9 3 0 はこのアッセイにおいてエカランチド、H A E 発作の治療のための認可された p K a 1 阻害剤とおよそ等価の効力を示すことが示された(図 8)。このインビトロアッセイにおけるエカランチドと等しい効力は、等価の薬物レベルが H A E において等しく有効であり得ることを示唆する。

【表 7】

表 2. レーン中の 2 - 鎖の平均パーセント、還元および非還元値*

試料	レーン中の%2-鎖の平均パーセント			
	XIIa (nM)	DX2930 (μg/mL)	還元	非還元
男性平均	0	0	16.1%	32.0%
	2.5	0	42.0%	61.2%
	2.5	10	29.5%	43.6%
女性平均	0	0	9.6%	21.5%
	2.5	0	43.8%	50.2%
	2.5	10	26.4%	30.3%

* 15人の男性および15人の女性由来の血漿の平均。

【 0 1 9 7 】

潰瘍性大腸炎 (U C) および関節リウマチ (R A) を有する患者由来の試料もまた、こ

10

20

30

40

50

のウエスタンブロットアッセイを使用して試験した。患者血漿試料を *Bioreclamation* から取得し、プラスチック管内の抗凝固薬中に採取した。切断されたキニノーゲンのパーセントは、UC および RA 患者の両方において、正常対照患者に比べ上昇することが見出された (図 9、表 3)。

【表 8】

表 3. 潰瘍性大腸炎および関節リウマチ試料のウエスタンブロット分析の概要

レーン	K2EDTAおよびクエン酸ナトリウムにおける還元疾患状態試料, 潰瘍性大腸炎および関節リウマチ							
	試料	抗凝固薬	疾患	HMWK シグナル				レーン中の%2-鎖
				単鎖 (110 kDa)	2-鎖 (56 kDa)	2-鎖 (46 kDa)	総シグナル	
1	分子量	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
2	1-鎖および2-鎖	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
3	A3005, N17	アンチプロテアーゼ	正常	20500	775	366	21641	5.3%
4	BRH745075	クエン酸ナトリウム	正常	18700	1340	802	20842	10.3%
5	BRH745056	クエン酸ナトリウム	正常	24200	893	782	25875	6.5%
6	BRH715036	K2EDTA	潰瘍性大腸炎	17400	3030	1340	21770	20.1%
7	BRH715037	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	17400	1220	694	19314	9.9%
8	BRH715038	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	N/A	2140	10300	12440	100.0%
9	BRH715039	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	14100	1700	596	16396	14.0%
10	BRH715040	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	13300	1170	2070	16540	19.6%
11	BRH715041	K2EDTA	関節リウマチ	N/A	N/A	4950	4950	100.0%
12	BRH715042	K2EDTA	関節リウマチ	88	N/A	9250	9338	99.1%
13	BRH715043	K2EDTA	関節リウマチ	N/A	N/A	6900	6900	100.0%
14	BRH715044	クエン酸ナトリウム	関節リウマチ	N/A	N/A	2850	2850	100.0%
15	BRH715045	クエン酸ナトリウム	関節リウマチ	6600	1860	1520	9980	33.9%

10

20

【 0 1 9 8 】

クローン病 (CD) を有する患者由来の試料もまた、ウエスタンブロットアッセイを使用して試験した。患者血漿試料を *Bioreclamation* から取得し、プラスチック管内の抗凝固薬中に採取した。切断されたキニノーゲンのパーセントは、正常対照患者に比べ、CD 患者において上昇することが見出された (図 10、表 4)。

30

【表 9】

表 4. クローン病試料のウエスタンブロット分析の概要

レーン	試料	抗凝固薬	疾患	HMWK シグナル				レーン中の%2-鎖	
				単鎖 (150 kDa)	単鎖 (110 kDa)	2-鎖 (56 kDa)	2-鎖 (46 kDa)		
1	分子量	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
2	1-鎖および2-鎖	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
3	A2992, N14	クエン酸ナトリウム	正常	704	12900	384	576	14564	6.6%
4	BRH745047	クエン酸ナトリウム	正常	1560	5820		192	7572	2.5%
5	BRH745076	クエン酸ナトリウム	正常	5720	12300	382	480	18882	4.6%
6	BRH715026	K2EDTA	クローン病	N/A	12100	1230	1950	15280	20.8%
7	BRH715027	K2EDTA	クローン病	N/A	16300	668	1550	18518	12.0%
8	BRH715028	K2EDTA	クローン病	N/A	6650	504	2250	9404	29.3%
9	BRH715029	K2EDTA	クローン病	1900	14100	N/A	680	16680	4.1%
10	BRH715030	K2EDTA	クローン病	N/A	1320	3230	6020	10570	87.5%

40

【 0 1 9 9 】

実施例 4 : F X I I a および D X 2 9 3 0 の正常ヒト血漿 (NHP) 試料に対する効果目的 :

50

この実験の目的は、DX-2930のFXIIa接触系活性化に対する効果を決定することであった。DX2930は血漿カリクレイン阻害することができ、FXIIaによる治療に応じて、測定される2-鎖対1-鎖比を減少させる。5人の男性および5人の女性由来のクエン酸ナトリウム添加NHP試料を、未処理で、FXIIa活性化後、および、試料を10 μ g/mLのDX-2930で前処理した場合のFXIIa活性化後に試験した。各試料セットを非還元および還元条件下でアッセイした。

【0200】

手順：

試料調製

1. NHP試料を凍結貯蔵から取り出し、室温に平衡化させた。下記男性NHP試料を試験した：BRH745050、BRH745051、BRH745052、BRH745053、およびBRH745054。下記女性試料を試験した：BRH745065、BRH745066、BRH745067、BRH745068、およびBRH745069。 10
 2. DX2930を、3.35 μ LのDX2930ストック(Lot#PURDX1-L01、32.1mg/mL)を496.65 μ Lの1X TBSに添加することにより、215 μ g/mLで調製した。
 3. FXIIa溶液の1:10中間体を、5 μ LのFXIIaストック溶液(25,300nM)を45 μ LのTBSに添加することにより調製した。56.25nMのFXIIa溶液を、4.45 μ Lの1:10中間体を195.55 μ LのTBSに添加することにより調製した。 20
 4. 各NHP試料を10 μ g/mLのDX2930を用いて、2 μ Lの215 μ g/mL DX2930溶液を41 μ LのNHPに添加することにより調製した。
 5. 各NHP試料を、2.5nMのFXIIaを用いて、2 μ Lの56.25nM FXIIa溶液を43 μ Lの各NHP試料に、DX2930あり、およびなしで添加することにより調製した。
 6. 試料を、FXIIaと共に37 $^{\circ}$ Cで10分インキュベートした。反応を、5 μ Lの10Xアンチプロテアーゼインヒビターを添加することにより停止させた。
 7. 各NHP試料、FXIIaあり、DX2930およびFXIIaあり、ならびに未処理試料を、5 μ Lの試料を95 μ LのTBSに添加することにより、5%血漿まで希釈した。 30
 8. 非還元試料を、5 μ Lの4X試料緩衝液を15 μ Lの試料に添加することにより調製した。
 9. 還元試料を5 μ Lの4X試料緩衝液および2 μ Lの10X還元剤を13 μ Lの試料に添加することにより調製した。
 10. 試料は全て95 $^{\circ}$ Cで5分、熱ブロックを用いて加熱した。
- ゲルローディング、泳動、および転写
1. 1Lの体積の1Xトリス-酢酸SDS泳動用緩衝液を50mLの20Xトリス-酢酸SDS泳動用緩衝液を950mLのDI水に添加することにより調製した。
 2. 1Lの体積の1X MES泳動用緩衝液を、50mLの20X MES SDS泳動用緩衝液を950mLのDI水に添加することにより調製した。 40
 3. アッセイ緩衝液(0.2% Tweenを有するOdysseyブロッキング緩衝液)を、1mLのTween-20を499mLのOdysseyブロッキング緩衝液に添加することにより調製した。
 4. 洗浄緩衝液(0.1% Tweenを有するPBS)を、1パッケージのPBSおよび1mLのTween-20を900mLのDI水に添加することにより調製した。溶液をよく混合し、DI水を用いて1Lに適量化した。最終溶液を、0.22 μ M PES濾過システムに通して濾過した。
 5. 4 μ Lの体積の1色タンパク質マーカーを、2つのゲルのレーン1に添加した。
 6. 13 μ Lの体積の非還元試料を、7%トリス-酢酸ゲルの適切なレーンに添加した。 50

7. 13 μ L の体積の還元試料を、4 - 12 %ビス - トリスゲルの適切なレーンに添加した。

8. ゲルを125ボルトで約75分泳動させた。

9. 各ゲルを、iBlotミニ - トランスファースタックおよびiBlot転写システムのプログラムP0を使用して、個々に膜に転写させた。

10. 各膜を、20mLのOdysseyブロッキング緩衝液を含むプラスチックトレーに移した。膜を、Odysseyブロッキング緩衝液中、プレートシェーカー上、室温で1時間インキュベートした。

11. 1 μ g/mLの一次抗体溶液を28.58 μ Lのマウス抗HMWK mAb、クローン#11H05、1.4mg/mLを29,971.42 μ Lのアッセイ緩衝液に添加することにより調製した。

12. ブロッキング緩衝液をプラスチックトレーから除去した。20mLの体積の一次抗体溶液を、各トレーに添加し、膜をプレートシェーカー上で、室温にて1時間インキュベートした。

13. ヤギ抗マウスIgG IRDye680の1:10中間体を、5 μ Lのヤギ抗マウスIgG IRDye680を45 μ Lのアッセイ緩衝液に添加することにより調製した。二次抗体溶液を、26.66 μ Lの1:10ヤギ抗マウスIgG IRDye680中間体を39,973.34 μ Lのアッセイ緩衝液に添加することにより、1:15,000希釈で調製した。

14. 一次抗体溶液をトレーから除去した。

15. 各膜を5分間、20mLの洗浄緩衝液で洗浄し、その後、洗浄溶液を廃棄した。洗浄を繰り返し、合計、4回の洗浄とした。

16. 20mLの体積の二次抗体溶液を、各トレーに添加し、膜をプレートシェーカー上で、室温にて1時間インキュベートした。

17. 二次抗体溶液をトレーから除去した。

18. 各膜を5分間、20mLの洗浄緩衝液で洗浄し、その後、洗浄溶液を廃棄した。洗浄を繰り返し、合計、4回の洗浄とした。

19. 各膜をPBSで5分間すすいだ。

20. 膜をLiCor Odyssey CLxを使用して走査した。

【0201】

結果：

表5および6は非還元試料データを含む。表7および8は還元試料データを含む。切断されたHMWKのパーセントを2つの方法を使用して計算した。レーン中の2 - 鎖のパーセントを下記式を使用して決定した：2 - 鎖シグナルの和 / 総シグナルの和。未処理シグナルからの2 - 鎖のパーセントを下記式を使用して決定した：1 - (処理単鎖シグナル / 未処理単鎖シグナル)。処理および未処理試料を、試料調製において、わずかに高いパーセンテージの血漿を有する未処理試料を用いてわずかに異なって調製した。よって、未処理試料は、処理試料よりもわずかに高い全体シグナルを生成させた。処理および未処理試料の間のわずかに異なる試料調製のために、レーン中の2 - 鎖のパーセント値を使用して、パーセント切断されたHMWKを決定した。

【0202】

表16は、活性化および阻害結果の概要を含む。還元条件下では、未処理男性および女性NHP試料は、それぞれ、平均、16.1%および9.6%の切断されたHMWKを含んだ。FXIIaで処理した男性および女性NHP試料は、それぞれ、平均、42.0%および43.8%の切断されたHMWKを含んだ。DX-2930で前処理し、続いてFXIIaで処理した男性および女性NHP試料は、それぞれ、平均、29.5%および26.4%の切断されたHMWKを含んだ。

【0203】

非還元条件下、未処理男性および女性NHP試料は、それぞれ、平均、32.0%および21.5%の切断されたHMWKを含んだ。FXIIaで処理した男性および女性NH

10

20

30

40

50

P 試料は、それぞれ、平均、61.2%および50.2%の切断されたHMWKを含んだ。DX-2930で前処理し続いてFXIIaで処理した男性および女性NHP試料は、それぞれ、平均、43.6%および30.3%の切断されたHMWKを含んだ。

【0204】

結論：

NHP試料のFXIIaによる処理は、未処理試料に比べ、パーセント切断されたHMWKを増加させた。DX-2930で前処理し、続いてFXIIa活性化させたNHP試料は、FXIIaのみで処理した試料よりも少ない切断されたHMWKを生成させたが、未処理試料に比べ、わずかに高いパーセント切断されたHMWKを生成させた。還元未処理NHP試料は非還元未処理NHP試料よりも少ない切断されたHMWKを含んだ。未処理、FXIIaで処理、DX-2930で前処理し続いてFXIIaで処理したNHP試料は、再現性のある結果を生成させたこともまた、見出された。

10

【表10】

表5. FXIIa活性化の非還元DX2930阻害、男性試料、単鎖/2鎖HMWKシグナル、総シグナル、2鎖HMWKのパーセント

男性NHP試料	FXIIa (nM)	DX2930 (µg/mL)	HMWK シグナル			総シグナル	レーン中の%2鎖	未処理シグナルからの%2鎖
			単鎖 (120kDa)	2鎖 (100 kDa)	2鎖 (90 kDa)			
BRH745050	0	0	17900	4670	0	22570	20.7%	N/A
BRH745050	2.5	0	8160	7750	1770	17680	53.8%	54.4%
BRH745050	2.5	10	12600	6620	812	20032	37.1%	29.6%
BRH745051	0	0	19600	3450	0	23050	15.0%	N/A
BRH745051	2.5	0	10000	9430	2140	21570	53.6%	49.0%
BRH745051	2.5	10	15300	6480	915	22695	32.6%	21.9%
BRH745052	0	0	22500	8570	1100	32170	30.1%	N/A
BRH745052	2.5	0	11000	10700	3050	24750	55.6%	51.1%
BRH745052	2.5	10	16500	8500	1500	26500	37.7%	26.7%
BRH745053	0	0	6370	13100	7390	26860	76.3%	N/A
BRH745053	2.5	0	1710	8310	10500	20520	91.7%	73.2%
BRH745053	2.5	10	4360	9310	6490	20160	78.4%	31.6%
BRH745054	0	0	27100	5900	0	33000	17.9%	N/A
BRH745054	2.5	0	11500	9880	2270	23650	51.4%	57.6%
BRH745054	2.5	10	15100	6280	814	22194	32.0%	44.3%

20

30

レーン中の%2鎖: 2鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和
未処理シグナルからの%2鎖: 1-(処理単鎖シグナル/未処理単鎖シグナル)

【表 1 1】

表 6. F X I I a 活性化の非還元 D X 2 9 3 0 阻害、女性試料、単／2 鎖 HMWK シグナル、総シグナル、2 鎖 H M W K のパーセント

女性NHP試料	FXIIa (nM)	DX2930 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HMWK シグナル			総シグナル	レーン中の %2 鎖	未処理シグナルからの %2 鎖
			単鎖 (120kDa)	2 鎖 (100 kDa)	2 鎖 (90 kDa)			
BRH745065	0	0	14700	2500	161	17361	15.3%	N/A
BRH745065	2.5	0	4750	5550	3160	13460	64.7%	67.7%
BRH745065	2.5	10	10500	3270	453	14223	26.2%	28.6%
BRH745066	0	0	23200	4460	17.4	27677	16.2%	N/A
BRH745066	2.5	0	14200	10600	1780	26580	46.6%	38.8%
BRH745066	2.5	10	15100	5920	205	21225	28.9%	34.9%
BRH745067	0	0	26000	8610	300	34910	25.5%	N/A
BRH745067	2.5	0	13700	9470	1410	24580	44.3%	47.3%
BRH745067	2.5	10	19800	8880	795	29475	32.8%	23.8%
BRH745068	0	0	25400	9180	211	34791	27.0%	N/A
BRH745068	2.5	0	14200	12500	2610	29310	51.6%	44.1%
BRH745068	2.5	10	15800	7350	708	23858	33.8%	37.8%
BRH745069	0	0	20900	6470	0	27370	23.6%	N/A
BRH745069	2.5	0	17000	11500	1820	30320	43.9%	18.7%
BRH745069	2.5	10	21600	8960	198	30758	29.8%	-3.3%

レーン中の%2 鎖: 2 鎖シグナルの和 / 総レーンシグナルの和

未処理シグナルからの%2 鎖: 1 - (処理単鎖シグナル / 未処理単鎖シグナル)

10

20

【表 1 2】

表 7. F X I I a 活性化の還元DX2930阻害、男性試料、単／2鎖HMWKシグナル、総シグナル、2鎖HMWKのパーセント

男性NHP試料	FXIIa (nM)	DX2930 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	第XIIa因子による男性NHPの還元活性化、DX2930による第XIIa因子の阻害					
			HMWK シグナル			総シグナル	レーン中の %2鎖	未処理シグナルからの %2鎖
			単鎖	2鎖 (56 kDa)	2鎖 (46 kDa)			
BRH745050	0	0	28300	0	0	28300	0.0%	N/A
BRH745050	2.5	0	14400	3360	2620	20380	29.3%	49.1%
BRH745050	2.5	10	19200	2560	1430	23190	17.2%	32.2%
BRH745051	0	0	26800	0	0	26800	0.0%	N/A
BRH745051	2.5	0	12800	2950	2580	18330	30.2%	52.2%
BRH745051	2.5	10	13900	2100	1210	17210	19.2%	48.1%
BRH745052	0	0	17800	853	1500	20153	11.7%	N/A
BRH745052	2.5	0	12100	2980	3250	18330	34.0%	32.0%
BRH745052	2.5	10	16900	2790	2190	21880	22.8%	5.1%
BRH745053	0	0	7280	4340	8430	20050	63.7%	N/A
BRH745053	2.5	0	3180	5620	9240	18040	82.4%	56.3%
BRH745053	2.5	10	6420	5470	6660	18550	65.4%	11.8%
BRH745054	0	0	22100	625	586	23311	5.2%	N/A
BRH745054	2.5	0	9610	2660	2020	14290	32.8%	56.5%
BRH745054	2.5	10	12500	2010	1300	15810	20.9%	43.4%

レーン中の%2鎖: 2鎖シグナルの和 / 総レーンシグナルの和
未処理シグナルからの%2鎖: 1 - (処理単鎖シグナル / 未処理単鎖シグナル)

10

20

【表 1 3】

表 8. F X I I a 活性化の還元 D X 2 9 3 0 阻害、女性試料、単鎖 HMWK シグナル、総シグナル、2 鎖 HMWK のパーセント

第XIIa因子による女性NHPの還元活性化、DX2930による第XIIa因子の阻害								
女性NHP試料	FXIIa (nM)	DX2930 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HMWK シグナル			総シグナル	レーン中の %2鎖	未処理シグナルからの %2鎖
			単鎖	2鎖 (56 kDa)	2鎖 (46 kDa)			
BRH745065	0	0	17300	2080	1240	20620	16.1%	N/A
BRH745065	2.5	0	4100	4880	3450	12430	67.0%	76.3%
BRH745065	2.5	10	9770	3740	1960	15470	36.8%	43.5%
BRH745066	0	0	21300	1770	753	23823	10.6%	N/A
BRH745066	2.5	0	9710	4280	2760	16750	42.0%	54.4%
BRH745066	2.5	10	13600	3990	1780	19370	29.8%	36.2%
BRH745067	0	0	21900	375	1850	24125	9.2%	N/A
BRH745067	2.5	0	11900	5120	3430	20450	41.8%	45.7%
BRH745067	2.5	10	19000	3610	2440	25050	24.2%	13.2%
BRH745068	0	0	29400	525	966	30891	4.8%	N/A
BRH745068	2.5	0	19600	5660	5130	30390	35.5%	33.3%
BRH745068	2.5	10	25100	4050	3260	32410	22.6%	14.6%
BRH745069	0	0	19900	500	688	21088	5.6%	N/A
BRH745069	2.5	0	12000	2910	2560	17470	31.3%	39.7%
BRH745069	2.5	10	15000	1790	1350	18140	17.3%	24.6%

レーン中の%2鎖: 2鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和

未処理シグナルからの%2鎖: $1 - (\text{処理単鎖シグナル} / \text{未処理単鎖シグナル})$

【表 1 4】

表 9. レーン中の 2 鎖の平均パーセント、還元および非還元値

試料	レーン中の2鎖の平均パーセント			
	XIIa (nM)	DX2930 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	還元	非還元
男性平均	0	0	16.1%	32.0%
	2.5	0	42.0%	61.2%
	2.5	10	29.5%	43.6%
女性平均	0	0	9.6%	21.5%
	2.5	0	43.8%	50.2%
	2.5	10	26.4%	30.3%

【 0 2 0 5】

実施例 6 . D X - 2 9 3 0 および D X - 8 8 を用いた F X I I a 活性化の阻害
目的:

この実験の目的は F X I I a 活性化の阻害に対する D X - 2 9 3 0 および D X - 8 8 の有効性を決定することであった。D X - 2 9 3 0 を 5 つの濃度で試験した: 2 0 0、1 0 0、3 0、1 2、および $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。D X - 8 8 を 5 つの濃度で試験した: 9 . 4、4 . 7、1 . 4、0 . 5 6、および $0 . 2 4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 。D X - 2 9 3 0 および D X - 8 8 で前処理した試料を F X I I a で処理した。前処理した試料に加えて、1 つの未処理試料、および F X I I a のみで処理した 2 つの試料を試験した。試料を還元条件下で試験した

10

20

30

40

50

。

【 0 2 0 6 】

手順：

1. NHP プールを、250 μ L の各血漿試料、BRH745070、BRH745071、およびBRH745048を1.5 mL マイクロ遠心チューブに添加することにより調製し、よく混合した。

2. 4500 μ g/mL DX2930 溶液を、4.21 μ L のDX2930 ストック溶液 (32.1 mg/mL) を25.79 μ L のTBSに添加することにより調製した。2250 μ g/mL DX2930 溶液を15 μ L の4500 μ g/mL 溶液を15 μ L のTBSに添加することにより調製した。675 μ g/mL DX2930 溶液を6 μ L の2250 μ g/mL 溶液を14 μ L のTBSに添加することにより調製した。270 μ g/mL DX2930 溶液を、8 μ L の675 μ g/mL 溶液を12 μ L のTBSに添加することにより調製した。112.5 μ g/mL DX2930 溶液を、10 μ L の270 μ g/mL 溶液を14 μ L のTBSに添加することにより調製した。

3. DX-2930 で前処理した5つの血漿試料を、2 μ L の各DX2930 溶液を41 μ L のNHP プールに添加することにより調製した。

4. 211.5 μ g/mL DX88 溶液を、6.28 μ L のDX88 ストック溶液 (10.1 mg/mL) を293.72 μ L のTBSに添加することにより調製した。105.75 μ g/mL DX88 溶液を、15 μ L の211.5 μ g/mL 溶液を15 μ L のTBSに添加することにより調製した。31.5 μ g/mL DX88 溶液を、8.94 μ L の105.75 μ g/mL 溶液を21.06 μ L のTBSに添加することにより調製した。12.6 μ g/mL DX88 溶液を、12 μ L の31.5 μ g/mL 溶液を18 μ L のTBSに添加することにより調製した。5.4 μ g/mL DX88 溶液を12.86 μ L の12.6 μ g/mL を17.14 μ L のTBSに添加することにより調製した。

。

5. DX-88 で前処理した5つの血漿試料を、2 μ L の各DX-88 溶液を41 μ L のNHP プールに添加することにより調製した。

6. FXIIa の1:10 中間体を、5 μ L のストック溶液 (25,300 nM) を45 μ L のTBSに添加することにより調製した。56.25 nM FXIIa 溶液を、4.45 μ L の1:10 中間体を195.55 μ L のTBSに添加することにより調製した。

7. DX-2930 およびDX88 で前処理した各血漿試料を、2 μ L の56.25 nM FXIIa 溶液を各試料に添加することにより、2.5 nM のFXIIa で処理した。

8. FXIIa のみを含む2つの試料を、2 μ L のTBSおよび2 μ L の56.25 nM FXIIa 溶液を41 μ L のNHP プールに添加することにより調製した。

9. 1つの未処理試料を、4 μ L のTBSを41 μ L のNHP プールに添加することにより調製した。

10. FXIIa を含む試料は全て、37 で10分間インキュベートした。

11. 5 μ L の体積のアンチプロテアーゼインヒビターを、未処理試料を含む各試料に添加した。各同型物の総試料体積は50 μ L とした。

12. 各試料を、5 μ L の試料を95 μ L のTBSに添加することにより、約5% 血漿に希釈した。

13. 試料を、5 μ L の4X 試料緩衝液および2 μ L の10X 還元剤を13 μ L の試料に添加することにより調製した。

14. 試料は全て95 で5分、熱ブロックを使用して加熱した。

15. 1 L の体積の1X MES 泳動用緩衝液を、50 mL の20X MES SDS 泳動用緩衝液を950 mL のDI 水に添加することにより調製した。

16. アッセイ緩衝液 (0.2% Tween を有するOdyssey ブロッキング緩衝液) を、1 mL のTween-20 を499 mL のOdyssey ブロッキング緩衝液に添加することにより調製した。

17. 洗浄緩衝液 (0.1% Tween を有するPBS) を、1 パケットのPBS および

10

20

30

40

50

1 mLのTween-20を900 mLのDI水に添加することにより調製した。溶液をよく混合し、DI水を用いて1 Lに適量化した。最終溶液を、0.22 μM PES濾過システムに通して濾過した。

18. 4 μLの体積の1色タンパク質マーカ-を、2つのゲルのレーン1に添加した。

19. 13 μLの体積の還元試料を、4-12%ビス-トリスゲルの適切なレーンに添加した。

20. ゲルを125ボルトで約75分間泳動させた。

21. ゲルを、iBlotミニ-トランスファースタックおよびiBlot転写システム上のプログラムP0を使用して、膜に転写させた。

22. 膜を、20 mLのOdysseyブロッキング緩衝液を含むプラスチックトレーに移した。膜をOdysseyブロッキング緩衝液中、プレートシェーカー上で、室温にて1時間インキュベートした。

23. 1 μg/mL一次抗体溶液を、14.29 μLのマウス抗HMWK mAb、クローン#11H05、1.4 mg/mLを19,985.7 μLのアッセイ緩衝液に添加することにより調製した。

24. ブロッキング緩衝液をプラスチックトレーから除去した。20 mLの体積の一次抗体溶液を、膜に添加し、プレートシェーカー上で室温にて1時間インキュベートした。

25. ヤギ抗マウスIgG IRDye680の1:10中間体を、5 μLのヤギ抗マウスIgG IRDye680を45 μLのアッセイ緩衝液に添加することにより調製した。二次抗体溶液を、13.33 μLの1:10ヤギ抗マウスIgG IRDye680中間体を19,986.7 μLのアッセイ緩衝液に添加することにより、1:15,000希釈で調製した。

26. 一次抗体溶液をトレーから除去した。

27. 膜を5分間、20 mLの洗浄緩衝液で洗浄し、その後洗浄溶液を廃棄した。洗浄を繰り返し、合計、4回の洗浄とした。

28. 20 mLの体積の二次抗体溶液を、膜に添加し、プレートシェーカー上で室温にて1時間インキュベートした。

29. 二次抗体溶液をトレーから除去した。

30. 膜を5分間、20 mLの洗浄緩衝液で洗浄し、その後洗浄溶液を廃棄した。洗浄を繰り返し、合計、4回の洗浄とした。

31. 膜をPBSで5分間すすいだ。

32. 膜をLiCor Odyssey CLxを使用して走査した。

【0207】

結果：

表10は、DX-2930およびDX-88阻害実験に対する結果を含む。2-鎖のパーセントを各レーン内で計算し、処理シグナルを未処理シグナルと比較することにより計算した。この比較のために、レーン中の2-鎖のパーセントを使用した。未処理NHPプールは、3.8%の2-鎖のパーセント値を生成させた。NHPプールをFXIIaのみで処理した場合、2つ同型試料は、24.4%の2-鎖のパーセント値を生成させた。DX-2930で前処理した試料は、DX-88で調製した試料に比べ、わずかに低い2-鎖のパーセント値を生成させた。5 μg/mLのDX-2930および0.24 μg/mLのDX-88で前処理した試料は、それぞれ、22.3%および23.9%の2-鎖のパーセント値を生成させた。これらの値はFXIIaのみで処理した試料における2-鎖のパーセント値に非常に近い。

【0208】

結論：

DX-2930で前処理した試料は、DX-88で前処理した試料よりもわずかに低い2-鎖のパーセント値を生成させた。

10

20

30

40

【表 15】

表 10. DX-2930 および DX-88 を使用した FXIIa の阻害、HMWK シグナル、2-鎖 HMWK のパーセント

DX-88 および DX-2930 を使用した FXIIa 接触活性化の阻害								
FXIIa (nM)	DX2930 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	DX88 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	HMWK シグナル			総シグナル	レーン中の %2-鎖	未処理シグナルからの %2-鎖
			単鎖 (110 kDa)	2-鎖 (56 kDa)	2-鎖 (46 kDa)			
0.00	0.00	0.00	26600	413	643	27656	3.8%	N/A
2.50	0.00	0.00	20500	3920	2690	27110	24.4%	22.9%
2.50	0.00	0.00	21200	4470	2390	28060	24.4%	20.3%
2.50	200.00	0.00	27200	376	576	28152	3.4%	-2.3%
2.50	100.00	0.00	25300	206	212	25718	1.6%	4.9%
2.50	30.00	0.00	24700	784	1470	26954	8.4%	7.1%
2.50	12.00	0.00	23200	3170	1560	27930	16.9%	12.8%
2.50	5.00	0.00	20100	3630	2140	25870	22.3%	24.4%
2.50	0.00	9.40	22600	615	663	23878	5.4%	15.0%
2.50	0.00	4.70	22500	349	592	23441	4.0%	15.4%
2.50	0.00	1.40	21500	2210	1270	24980	13.9%	19.2%
2.50	0.00	0.56	20600	3340	1990	25930	20.6%	22.6%
2.50	0.00	0.24	19500	3910	2200	25610	23.9%	26.7%

レーン中の%2-鎖: 2-鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和

未処理シグナルからの%2-鎖: 1- (処理単鎖シグナル/未処理単鎖シグナル)

【0209】

実施例 7. H A E、R A、U C、および C D 患者試料における切断されたキニノーゲンのレベルの決定

目的:

この実験の目的は、遺伝性血管浮腫 (H A E) を有する患者由来のアンチプロテアーゼ処理血漿試料を評価することであった。各患者由来の 2 つの H A E 試料を試験し、1 つは基礎試料であり、1 つは発作試料とした。試料を還元および非還元条件下で試験した。加えて、クローン病、関節リウマチ、および潰瘍性大腸炎と診断された患者由来の試料を試験した。正常ヒト血漿試料もまた試験した。追加の試料を還元条件下のみで試験した。

【0210】

手順:

1. 6 組の H A E 患者試料を試験した。各血漿試料を 5 μL の試料を 95 μL の T B S に添加することにより調製した。

2. 5 つのクローン病血漿試料、5 つの関節リウマチ血漿試料、および 5 つの潰瘍性大腸炎試料を試験した。各血漿試料を、5 μL の試料を 95 μL の T B S に添加することにより調製した。

3. 7 つの正常ヒト血漿試料を、対照として使用するために、5 μL の試料を 95 μL の T B S に添加することにより調製した。

4. 非還元試料を、5 μL の 4 X 試料緩衝液を 15 μL の試料に添加することにより調製した。

5. 還元試料を、5 μL の 4 X 試料緩衝液および 2 μL の 10 X 還元剤を 13 μL の試料に添加することにより調製した。

6. 試料は全て 95 で 5 分、熱ブロックを使用して加熱した。

7. 1 L の体積の 1 X トリス - 酢酸 S D S 泳動用緩衝液を、50 mL の 20 X トリス - 酢酸 S D S 泳動用緩衝液を 950 mL の D I 水に添加することにより調製した。

8. 2 L の体積の 1 X M E S 泳動用緩衝液を、100 mL の 20 X M E S S D S 泳

動用緩衝液を1900 mLのDI水に添加することにより調製した。

9. アッセイ緩衝液(0.2% Tweenを有するOdysseyブロッキング緩衝液)を、2 mLのTween-20を998 mLのOdysseyブロッキング緩衝液に添加することにより調製した。

10. 洗浄緩衝液(0.1% Tweenを有するPBS)を1バケットのPBSおよび1 mLのTween-20を900 mLのDI水に添加することにより調製した。溶液をよく混合し、DI水を用いて1 Lに適量化した。最終溶液を、0.22 μM PES濾過システムに通して濾過した。

11. 4 μLの体積の1色タンパク質マーカ-を、4つのゲルのレーン1に添加した。

12. 13 μLの体積の非還元試料を、7%トリス-酢酸ゲルの適切なレーンに添加した。

13. 13 μLの体積の還元試料を、4-12%ビス-トリスゲルの適切なレーンに添加した。

14. ゲルを125ボルトで約75分間泳動させた。

15. 各ゲルを、iBlotミニ-トランスファースタックおよびiBlot転写システム上のプログラムP0を使用して、個々に膜に転写させた。

16. 各膜を、20 mLのOdysseyブロッキング緩衝液を含むプラスチックトレ-に移した。膜をOdysseyブロッキング緩衝液中、プレートシェ-カー上で、室温にて1時間インキュベ-トした。

17. 1 μg/mL一次抗体溶液を57.14 μLのマウス抗HMWK mAb、クローン#11H05、1.4 mg/mLを79,942.86 μLのアッセイ緩衝液に添加することにより調製した。

18. ブロッキング緩衝液をプラスチックトレ-から除去した。20 mLの体積の一次抗体溶液を、各トレ-に添加し、膜をプレートシェ-カー上で室温にて1時間インキュベ-トした。

19. ヤギ抗マウスIgG IRDye680の1:10中間体を、10 μLのヤギ抗マウスIgG IRDye680を90 μLのアッセイ緩衝液に添加することにより調製した。二次抗体溶液を、53.33 μLの1:10ヤギ抗マウスIgG IRDye680中間体を79,946.67 μLのアッセイ緩衝液に添加することにより、1:15,000希釈で調製した。

20. 一次抗体溶液をトレ-から除去した。

21. 各膜を5分間20 mLの洗浄緩衝液で洗浄し、その後、洗浄溶液を廃棄した。洗浄を繰り返-し、合計、4回の洗浄とした。

22. 20 mLの体積の二次抗体溶液を、各トレ-に添加し、膜をプレートシェ-カー上で室温にて1時間インキュベ-トした。

23. 二次抗体溶液をトレ-から除去した。

24. 各膜を5分間、20 mLの洗浄緩衝液で洗浄し、その後、洗浄溶液を廃棄した。洗浄を繰り返-し、合計、4回の洗浄とした。

25. 各膜をPBSで5分間すすいだ。

26. 膜を、Licor Odyssey CLxを使用して走査した。

【0211】

結果:

予想通りに、ほとんどの患者試料は、基礎試料とは対照的に、発作試料において2-鎖HMWKの上昇したレベルを示した。表11および12はこの実験に対するHAEデータを含む。表13は潰瘍性大腸炎および関節リウマチ患者試料に対するデータセットを含む。表14はクローン病患者試料に対するデータを含む。

10

20

30

40

【表 1 6】

表 1 1. 非還元HAE患者試料、基礎および発作、HMWKシグナル、レーン中の2-鎖のパーセント

患者 ID	患者 イニシャル	HAE	HMWK シグナル				総シグナル	レーン中の %2-鎖
			120 kDa	100 kDa	90 kDa			
A3009	N18	正常	15500	3750	N/A	19250	19.5%	
A4970	AC	基礎	13000	4300	240	17540	25.9%	
A4908	AC	発作	9450	5910	1740	17100	44.7%	
A5564	BB	基礎	15900	5650	585	22135	28.2%	
A5353	BB	発作	11600	10500	2340	24440	52.5%	
A4607	FF	基礎	11400	4850	N/A	16250	29.8%	
A4619	FF	発作	6770	6750	2090	15610	56.6%	
A5346	DG	基礎	10800	3850	102	14752	26.8%	
A5422	DG	発作	5650	2080	133	7863	28.1%	
A4183	PC	基礎	9530	1190	N/A	10720	11.1%	
A4671	PC	発作	8840	1570	N/A	10410	15.1%	
A5248	GR	基礎	14300	4270	44.1	18614.1	23.2%	
A2315	GR	発作	11600	4610	490	16700	30.5%	

レーン中の%2-鎖: 2-鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和

【表 1 7】

表 1 2. 還元HAE患者試料、基礎および発作、HMWKシグナル、レーン中の2-鎖のパーセント

患者 ID	患者 イニシャル	HAE	HMWK シグナル			総シグナル	レーン中の %2-鎖
			110 kDa	56 kDa	46 kDa		
A3009	N18	正常	18700	802	926	20428	8.5%
A4970	AC	基礎	14500	2980	1480	18960	23.5%
A4908	AC	発作	8500	3540	2670	14710	42.2%
A5564	BB	基礎	12400	3160	1380	16940	26.8%
A5353	BB	発作	8980	3980	2620	15580	42.4%
A4607	FF	基礎	10900	2490	1620	15010	27.4%
A4619	FF	発作	6130	3930	2520	12580	51.3%
A5346	DG	基礎	11200	2400	709	14309	21.7%
A5422	DG	発作	7900	2640	749	11289	30.0%
A4183	PC	基礎	13900	1850	572	16322	14.8%
A4671	PC	発作	13500	2120	572	16192	16.6%
A5248	GR	基礎	19000	2120	1160	22280	14.7%
A2315	GR	発作	16400	3660	1580	21640	24.2%

レーン中の%2-鎖: 2-鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和

【表 1 8】

表 1 3. 潰瘍性大腸炎および関節リウマチを有する個体由来の血漿試料、HMWKシグナル、レーン中の2-鎖のパーセント

K2EDTAおよびクエン酸ナトリウム中の還元疾患状態試料、潰瘍性大腸炎および関節リウマチ							
試料	抗凝固薬	疾患	HMWK シグナル				レーン中の %2-鎖
			単鎖 (110 kDa)	2-鎖 (56 kDa)	2-鎖 (46 kDa)	総シグナル	
A3005, N17	アンチプロテアーゼ	正常	20500	775	366	21641	5.3%
BRH745075	クエン酸ナトリウム	正常	18700	1340	802	20842	10.3%
BRH745056	クエン酸ナトリウム	正常	24200	893	782	25875	6.5%
BRH715036	K2EDTA	潰瘍性大腸炎	17400	3030	1340	21770	20.1%
BRH715037	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	17400	1220	694	19314	9.9%
BRH715038	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	N/A	2140	10300	12440	100.0%
BRH715039	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	14100	1700	596	16396	14.0%
BRH715040	クエン酸ナトリウム	潰瘍性大腸炎	13300	1170	2070	16540	19.6%
BRH715041	K2EDTA	関節リウマチ	N/A	N/A	4950	4950	100.0%
BRH715042	K2EDTA	関節リウマチ	88	N/A	9250	9338	99.1%
BRH715043	K2EDTA	関節リウマチ	N/A	N/A	6900	6900	100.0%
BRH715044	クエン酸ナトリウム	関節リウマチ	N/A	N/A	2850	2850	100.0%
BRH715045	クエン酸ナトリウム	関節リウマチ	6600	1860	1520	9980	33.9%

レーン中の%2-鎖: 2-鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和

【表 1 9】

表 1 4. クロウン病を有する個体由来の血漿試料、HMWKシグナル、レーン中の2-鎖のパーセント

K2EDTAおよびクエン酸ナトリウム中の還元疾患状態試料、クローン病および乾癬								
試料	抗凝固薬	疾患	HMWK シグナル				レーン中の %2-鎖	
			単鎖 (150 kDa)	単鎖 (110 kDa)	2-鎖 (56 kDa)	2-鎖 (46 kDa)		
A2992, N14	クエン酸ナトリウム	正常	704	12900	384	576	14564	6.6%
BRH745047	クエン酸ナトリウム	正常	1560	5820	N/A	192	7572	2.5%
BRH745076	クエン酸ナトリウム	正常	5720	12300	382	480	18882	4.6%
BRH715026	K2EDTA	クローン病	N/A	12100	1230	1950	15280	20.8%
BRH715027	K2EDTA	クローン病	N/A	16300	668	1550	18518	12.0%
BRH715028	K2EDTA	クローン病	N/A	6650	504	2250	9404	29.3%
BRH715029	K2EDTA	クローン病	1900	14100	N/A	680	16680	4.1%
BRH715030	K2EDTA	クローン病	N/A	1320	3230	6020	10570	87.5%

レーン中の%2-鎖: 2-鎖シグナルの和/総レーンシグナルの和

【0212】

他の実施形態

この明細書で開示される特徴は全て、任意の組み合わせで組み合わせることができる。この明細書で開示される各特徴は同じ、等価な、または同様の目的を果たす他の特徴により置換することができる。よって、明確に別記されない限り、開示される各特徴は、包括的な一連の等価なまたは同様の特徴の一例にすぎない。

【0213】

上記記載から、当業者は容易に本発明の必須特性を確認することができ、その精神およ

10

20

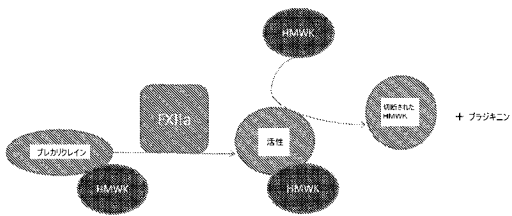
30

40

50

び範囲から逸脱せずに、様々な用途および条件に適合させるように、発明の様々な変更および改変を行うことができる。よって、他の実施形態もまた、特許請求の範囲に含まれる。

【 図 1 】



【 図 2 】

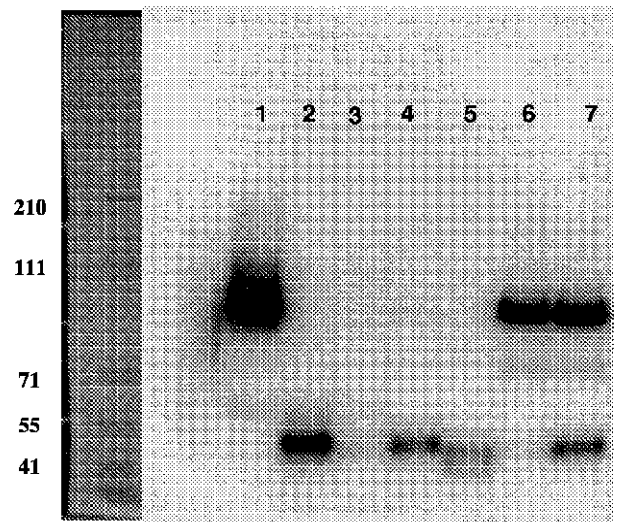
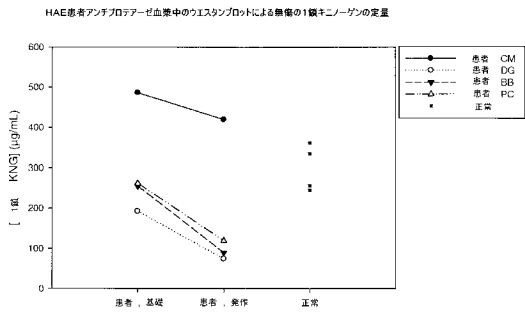
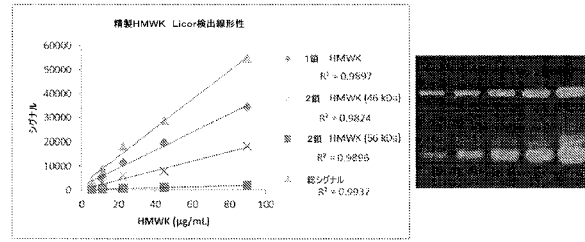


FIG. 2

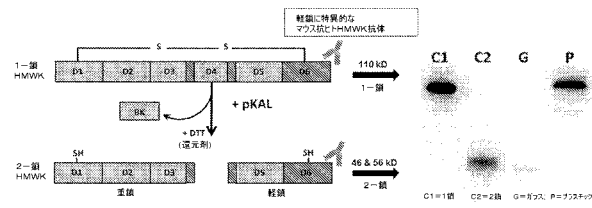
【 図 3 】



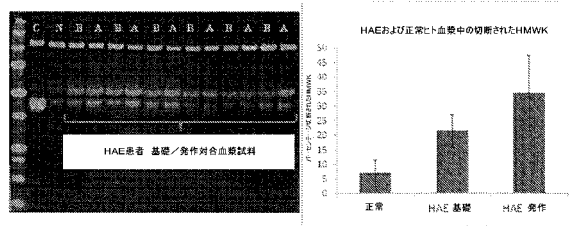
【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】



【 図 7 】

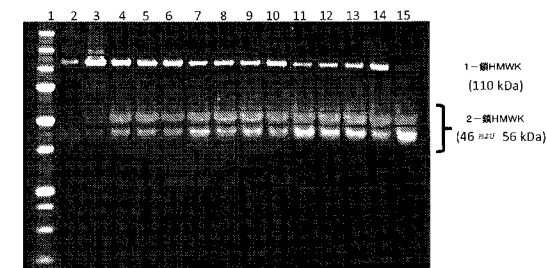


FIG. 7A

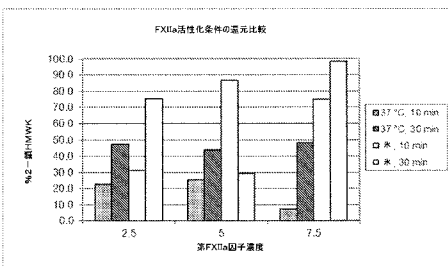


FIG. 7B

【 図 8 】

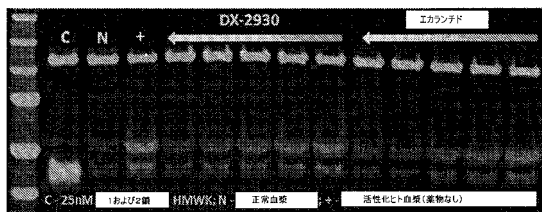


FIG. 8A

ヒト血漿中のFXIIa活性化による切断されたHMWK

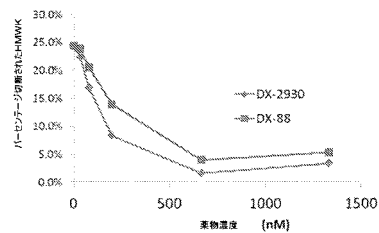
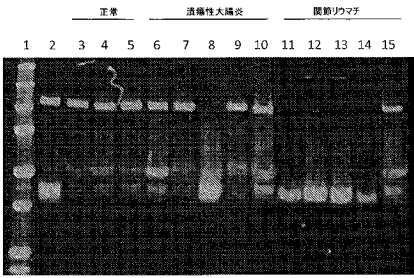
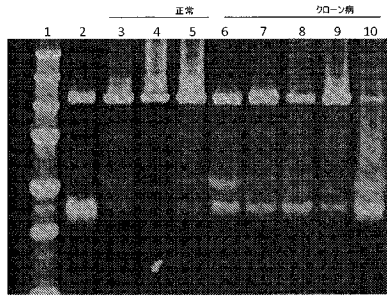


FIG. 8B

【図 9】



【図 10】



【配列表】

2016511823000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/012107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/40 (2014.01) USPC - 424/158.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8) - A61K 39/395 ; A61P 7/02 ; C07K 16/18, 40 ; C12N 15/15 ; G01N 33/573 (2014.01) USPC - 424/158.1 ; 530/387.1, 389.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched CPC - C07K16/40, 2317/34 (2014.02) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Orbit, Google Patents, Google Scholar		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	PHIPPS et al. 'Plasma kallikrein mediates angiotensin II type 1 receptor-stimulated retinal vascular permeability.' Hypertension 53(2): 175-81. 05 January 2009. entire document	1-6, 18-23, 29-32, 41-47 33
Y	US 2012/0201756 A1 (SEXTON) 09 August 2012 (09.08.2012) entire document	33
A	US 2006/0069020 A1 (BLAIR et al.) 30 March 2006 (30.03.2006) entire document	1-6, 18-23, 29-33, 41-47
A	US 2008/0038276 A1 (SINHA et al.) 14 February 2008 (14.02.2008) entire document	1-6, 18-23, 29-33, 41-47
A	US 2011/0200611 A1 (SEXTON) 18 August 2011 (18.08.2011) entire document	1-6, 18-23, 29-33, 41-47
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 March 2014		Date of mailing of the international search report 14 APR 2014
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2014/012107
--

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 7-17, 24-28, 34-40, 48-50
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (72) 発明者 セクストン, ダニエル, ジェイ.
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 7 6, メルローズ, 5 9 マーヴィン ロード
- (72) 発明者 ファウセット, リアン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 7 6, アーリントン, 1 3 5 7 マサチューセッツ
アヴェニュー
- (72) 発明者 ケンニストン, ジョン, エー.
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 0 4 3, ヒングハム, 8 ロングミードウ ロード
- (72) 発明者 コンリー, グレグ
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, # 1, 6 4 エルム ストリ
ート
- (72) 発明者 ニクソン, アンドリュー
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 3 3 9, ハノーバー, 4 1 エバーグリーン レーン
- (72) 発明者 テンホーア, クリストファー
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 7 4 8, ホプキントン, 1 0 ウェッジウッド ドラ
イブ
- (72) 発明者 アデルマン, パート
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 1 7 4 2, コンコード, 2 1 0 オールド ピッカード
ロード
- (72) 発明者 チュン, ユン
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 4 2 1, レキシントン, 2 5 2 1 マサチューセッツ
アベニュー

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA36 FB03
4B063 QA01 QA19 QQ03 QR48 QS33
4C084 AA17 ZA36 ZA66 ZA96 ZB15 ZB21
4H045 BA10 CA40 DA56 EA20 HA07

专利名称(译)	缓激肽介导的疾病的评估和治疗		
公开(公告)号	JP2016511823A	公开(公告)日	2016-04-21
申请号	JP2015553864	申请日	2014-01-17
[标]申请(专利权)人(译)	戴埃克斯有限公司		
申请(专利权)人(译)	模具斧公司		
[标]发明人	セクストンダニエルジェイ ファウセットリアン ケンニストンジョンエー コンリーグレッグ ニクソンアンドリユー テンホーアクリストファー アデルマンバート チュンユン		
发明人	セクストン,ダニエル,ジェイ. ファウセット,リアン ケンニストン,ジョン,エー. コンリー,グレッグ ニクソン,アンドリユー テンホーア,クリストファー アデルマン,バート チュン,ユン		
IPC分类号	G01N33/68 C12Q1/02 G01N33/53 A61K45/00 A61P43/00 A61P9/00 A61P19/02 A61P1/04 C07K14/47 C07K16/18		
CPC分类号	A61P1/04 A61P7/10 A61P9/00 A61P17/00 A61P19/02 A61P29/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K16/36 C07K7/06 C07K16/40 C07K2317/21 C07K2317/76 G01N33/5735 G01N2333/745 G01N2800/065 G01N2800/102 G01N2800/52 G01N2800/70		
FI分类号	G01N33/68.ZNA C12Q1/02 G01N33/53.L A61K45/00 A61P43/00.105 A61P9/00 A61P19/02 A61P1/04 C07K14/47 C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR48 4B063/QS33 4C084/AA17 4C084/ZA36 4C084/ZA66 4C084/ZA96 4C084/ZB15 4C084/ZB21 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA56 4H045/EA20 4H045/HA07		
代理人(译)	Iwahori明代		
优先权	61/754607 2013-01-20 US		
其他公开文献	JP6444315B2 JP2016511823A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

主题公开是基于受试者(例如,百分比)的样品中完整的和/或截短的激肽原值,主题,例如,存在的pKal的风险介导的或缓激肽介导的病症,或从该患提供评估身体的方法。所提供的方法允许分析患有血浆激肽释放酶介导的血管性水肿(KMA)或由pKal介导的其他疾病的患者,其可用于评估和治疗。此类方法可包括使用优先与切割的激肽原或完整激肽原结合的检测剂。

(21) 出願番号	特願2015-553864 (P2015-553864)	(71) 出願人	513168518
(86) (22) 出願日	平成26年1月17日 (2014. 1. 17)		ダイアックス コーポレーション
(85) 翻訳文提出日	平成27年7月13日 (2015. 7. 13)		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/012107		1803-2756, バーリントン, 55
(87) 国際公開番号	W02014/113712		ネットワーク ドライブ
(87) 国際公開日	平成26年7月24日 (2014. 7. 24)	(74) 代理人	100114775
(31) 優先権主張番号	61/754, 607		弁理士 高岡 亮一
(32) 優先日	平成25年1月20日 (2013. 1. 20)	(74) 代理人	100121511
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小田 直
		(74) 代理人	100202751
			弁理士 岩堀 明代
		(74) 代理人	100191086
			弁理士 高橋 香元

最終頁に続く