

INHIBIDORES DE CALICREÍNA PLASMÁTICA Y USOS DE LOS MISMOS PARA TRATAR ATAQUE DE ANGIOEDEMA HEREDITARIO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reclama el beneficio de la fecha de presentación de la Solicitud Provisional de E.U.A. No. 62/266,175, presentada el 11 de Diciembre de 2015, Solicitud Provisional de E.U.A. No. 62/266,192, presentada el 11 de Diciembre de 2015, y Solicitud Provisional de E.U.A. No. 62/395,833, presentada el 16 de Septiembre de 2016. Los contenidos completos de cada una de estas solicitudes referidas se incorporan a manera de referencia en la
10 presente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La calicreína plasmática es un componente de serina proteasa del sistema de contacto y un objetivo de fármaco potencial para diferentes enfermedades inflamatorias, cardiovasculares, infecciosas (septicemia) y oncología (Sainz I.M. y colaboradores, *Thromb Haemost* 98, 77-83,
15 2007). El sistema de contacto se activa por cualquier factor XIIa en la exposición a las superficies extrañas o negativamente cargadas o en superficies de células endoteliales por proilcarboxipeptidasas (Sainz I.M. y colaboradores, *Thromb Haemost* 98, 77-83, 2007). La activación de la calicreína plasmática amplifica la coagulación intrínseca a través de su activación de retroalimentación del factor XII y mejora la inflamación a través de la producción
20 del nonapéptido pro-inflamatorio bradiquinina. Como la quininogenasa primaria en la circulación, la calicreína plasmática es en gran medida responsable por la generación de bradiquinina en la vasculatura. Una deficiencia genética en la proteína del inhibidor C1 (C1-INH), el inhibidor natural principal de la calicreína plasmática, conduce a angioedema hereditario (HAE). Los pacientes con HAE sufren de ataques agudos de edema doloroso
25 frecuentemente precipitado por desencadenadores desconocidos (Zuraw B.L. y colaboradores, *N Engl J Med* 359, 1027-1036, 2008).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se proporcionan en la presente regímenes para tratar ataque de angioedema hereditario (HAE), reduciendo la velocidad del ataque de HAE, o bloqueando el ataque de HAE utilizando
30 anticuerpos capaces de enlazar e inhibir la calicreína plasmática humana (pKal) en forma activa, por ejemplo, anticuerpos que se enlazan al mismo epítipo como DX-2930 (*también conocido como* SHP643) o compite contra DX-2930 para el enlace a una pKal humana activa.

En algunos aspectos, la presente descripción proporciona métodos para tratar ataque de angioedema hereditario (HAE) o reducir la velocidad del ataque de HAE, que comprende
35 administrar (*por ejemplo*, subcutáneamente) a un sujeto en necesidad del mismo cualquiera de los anticuerpos anti-pKal descritos en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) en una y/o varias dosis. En algunas modalidades, el anticuerpo se administra a un sujeto (*por ejemplo*, un

paciente humano) en varias dosis en un primer período de tratamiento, *por ejemplo*, 26 semanas. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar a aproximadamente 300 mg cada dos semanas, aproximadamente 300 mg cada cuatro semanas, o aproximadamente 150 mg cada cuatro semanas en el primer período de tratamiento.

5 Cualquiera de los métodos descritos en la presente pueden comprender además administrar al sujeto el anticuerpo para un segundo período de tratamiento (*por ejemplo*, 26 semanas) después del primer período de tratamiento. En algunas modalidades, la primera dosis del segundo período de tratamiento es aproximadamente dos semanas después de la última dosis del primer período de tratamiento. En algunas modalidades, el segundo período
10 de tratamiento comprende varias dosis del anticuerpo a aproximadamente 300 mg cada dos semanas para, *por ejemplo*, 26 semanas.

Alternativamente, los métodos pueden comprender además administrar al sujeto una sola dosis del anticuerpo (*por ejemplo*, aproximadamente 300 mg) después del primer período de tratamiento. La dosis única puede ser seguida con una o más dosis del anticuerpo (*por
15 ejemplo*, aproximadamente 300 mg cada 2 semanas) del anticuerpo si se presenta un ataque de HAE después de la dosis única. La primera dosis del tratamiento de seguimiento puede estar dentro de una semana después del ataque de HAE. En algunas modalidades, la dosis única y la primera dosis del tratamiento de seguimiento están a al menos 10 días separados.

Otros aspectos de la presente descripción proporciona métodos para tratar ataque de angioedema hereditario (HAE) o reducir la velocidad del ataque de HAE en un sujeto que se
20 ha sometido a tratamiento previo de HAE, que comprende (i) administrar (*por ejemplo*, subcutáneamente) a un sujeto en necesidad del mismo cualquiera de los anticuerpos anti-pKal descritos en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) el anticuerpo en una dosis de aproximadamente 300 mg; y (ii) administrar a sujeto el anticuerpo en varias dosis de
25 aproximadamente 300 mg cada dos semanas, si el sujeto experimenta un ataque de HAE después (i). El sujeto puede haberse sometido a un primer tratamiento de HAE como se describe en la presente. Por ejemplo, el primer tratamiento de HAE puede ser un tratamiento que implica al mismo estudio (*por ejemplo*, DX-2930). En algunos ejemplos, el primer tratamiento de HAE implica administrar el anticuerpo en varias dosis de aproximadamente 150
30 mg o 300 mg cada cuatro semanas o administrar el anticuerpo en varias dosis de aproximadamente 300 mg cada dos semanas. Alternativamente o además, la primera dosis de las diversas dosis se administran al sujeto dentro de una semana después del ataque de HAE.

En cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en la presente, el sujeto puede ser un paciente humano que tiene, se sospecha que tiene, o está en riesgo por HAE. En
35 algunas modalidades, el sujeto es un paciente humano que tiene HAE tipo I o tipo II. Por ejemplo, el sujeto puede tener al menos un ataque de HAE en las cuatro semanas antes de la primera dosis del primer período de tratamiento o al menos dos ataques de HAE en las ocho

semanas antes de la primera dosis del primer período de tratamiento. En otros ejemplos, el sujeto puede ser un paciente humano quien ha experimentado al menos dos ataques de HAE al año antes del tratamiento. Alternativamente o además, el sujeto es un paciente humano quien está libre de tratamiento previo, por ejemplo, al menos dos semanas antes de la primera dosis del primer período de tratamiento.

En algunas modalidades, el sujeto que se trata por cualquiera de los métodos descritos en la presente, que implica el uso de cualquiera del anticuerpo anti-pKal como también se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) ha recibido uno o más tratamientos de HAE antes de la primera dosis del anticuerpo anti-pKal. Estos tratamientos de HAE previos pueden implicar un inhibidor de C1-inhibitor (*por ejemplo*, C1-INH), un inhibidor de calicreína plasmática (*por ejemplo*, ecalantido), un antagonista del receptor de bradiquinina (*por ejemplo*, icatibant), un andrógeno atenuado (*por ejemplo*, danazol), un agente anti-fibrinolítico (*por ejemplo*, ácido tranexámico) o una combinación de los mismos. Este sujeto puede someterse a un período de reducción para transitar gradualmente del tratamiento de HAE previo al tratamiento de anticuerpo anti-pKal descrito en la presente. En algunos ejemplos, el período de reducción puede variar de 2-4 semanas. El tratamiento de HAE previo puede terminar ya sea antes de la primera dosis del anticuerpo anti-pKal o dentro de tres semanas después de la primera dosis del anticuerpo anti-pKal que se administra al sujeto. Alternativamente, el sujeto se puede cambiar directamente de cualquiera del tratamiento HAE del anticuerpo anti-pKal como se describe en la presente.

En algunas modalidades, el sujeto está libre de una profilaxis a largo plazo para HAE, o un tratamiento de HAE que implica un inhibidor de enzima que convierte la angiotensina (ACE), un medicamento que contiene estrógeno, o un andrógeno antes del primer período de tratamiento, durante el primer período de tratamiento, y/o durante el segundo período de tratamiento.

El anticuerpo anti-pKal para el uso en los regímenes de tratamiento descritos en la presente puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de enlace a antígeno del mismo. En algunas modalidades, el anticuerpo puede comprender las CDRs como DX-2930. En un ejemplo, el anticuerpo es DX-2930.

En cualquiera de los métodos descritos en la presente, el anticuerpo se puede formular en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende fosfato de sodio, ácido cítrico, histidina, cloruro de sodio, y Tween 80. En un ejemplo, el fosfato de sodio está en una concentración de aproximadamente 30 mM, el ácido cítrico está en una concentración de aproximadamente 19 mM, la histidina está en una concentración de aproximadamente 50 mM, el cloruro de sodio está en una concentración de aproximadamente 90 mM, y/o el polisorbato 80 está en aproximadamente 0.01%.

Los detalles de una o más modalidades de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de las siguientes figuras y la descripción detallada de varias modalidades, y también de las reivindicaciones adjuntas.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 muestra un régimen de dosificación ejemplar que comprende un primer período de tratamiento en el cual a los pacientes se les administra DX-2930 en una dosis de 300 mg cada dos semanas, 300 mg cada cuatro semanas, o 150 mg cada 4 semanas.

10

La FIGURA 2 muestra un régimen de dosificación ejemplar que comprende un segundo período de tratamiento después de un primer período de tratamiento. En el segundo período de tratamiento, a los pacientes se les administra una dosis individual de DX-2930 a 300 mg. Si el paciente experimenta un ataque de HAE, el anticuerpo se administra subsecuentemente en una dosis de 300 mg cada dos semanas.

15

La FIGURA 3 muestra el quinínogeno de peso molecular alto de 2 cadenas (HMWK) en muestras de plasma de pacientes HAE tratados con DX-2930 en los días indicados en la dosis indicada (30 mg, 100 mg, 300 mg, o 400 mg) como es detectado por el análisis de Western. La línea base de HMWK de 2 cadenas detectado en los sujetos sanos se indica con una línea punteada. Para cada día, las columnas corresponden a, de izquierda a derecha, placebo, 30 mg, 100 mg, 300 mg, y 400 mg.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

Para conveniencia, antes de la descripción adicional de la presente invención, ciertos términos empleados en la especificación, ejemplos y reivindicaciones adjuntas se definen en este punto. Otros términos como se definen pueden presentarse en la especificación.

25

Las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera.

Como se utiliza en la presente, el término “aproximadamente” se refiere a un valor particular +/- 5%. Por ejemplo, un anticuerpo a aproximadamente 300 mg incluye cualquiera cantidad del anticuerpo entre 285 mg – 315 mg.

30

El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de enlazarse específicamente a un objetivo, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno situado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Un anticuerpo puede incluir al menos una cadena pesada (H) que comprende un dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (V_H), al menos una cadena ligera que comprende un dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (V_L), o ambos. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en la presente como V_H o HV) y una región

35

variable de cadena ligera (L) (abreviada en la presente como V_L o LV). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L).

Como se utiliza en la presente, el término “anticuerpo” abarca no sol anticuerpos policlonales o monoclonales intactos (es *decir*, de longitud completa) sino también fragmentos de enlace a antígeno de los mismos (tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), (scFv) de cadena individual, fragmentos de anticuerpo de dominio (dAb) (de Wildt y colaboradores, *Euro. J. Immunol.* (1996) 26(3): 629-639), cualquiera de los mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena individual, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígeno de la especificidad requerida que incluye variantes de glicosilación de anticuerpos, variantes de secuencia de aminoácidos de anticuerpos, y anticuerpos covalentemente modificados. Un anticuerpo incluye un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgD, IgE, IgG, IgA, o IgM (o sub-clase de los mismos), y el anticuerpo no necesita ser de cualquier clase particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de anticuerpo del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a diferentes clases de inmunoglobulinas son llamados alfa, delta, épsilon, gamma, y mu, respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. Los anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, pero se prefieren de primate (humano y primate no humano) y primatizada.

Las regiones V_H y/o V_L pueden incluir todo o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N- o C-terminal, aminoácidos internos, pueden incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o pueden incluir otras alteraciones. En una modalidad, un polipéptido que incluye la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar un sitio de enlace a antígeno, *por ejemplo*, una estructura que interactúa de manera preferente con la calicreína plasmática.

Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, llamadas “regiones determinadoras de complementariedad” (“CDRs”), intercaladas con las regiones que son más conservadas, llamadas “regiones de estructura” (“FRs”). El grado de la región de estructura y las CDRs se ha definido (ver, Kabat, E.A., y

colaboradores (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia, C. y colaboradores (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Se utilizan en la presente definiciones de Kabat. Cada VH y VL es compoene típicamente de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos de amino-terminal a carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

Además de las regiones V_H o V_L, la cadena pesada o cadena ligera del anticuerpo pueden incluir además todo o parte de una región constante de cadena pesada o ligera. En una modalidad, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras, en donde las cadenas de inmunoglobulina pesadas y ligeras se interconectan por, *por ejemplo*, enlaces de disulfuro. En las IgGs, la región constante de cadena pesada incluye tres dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesadas y ligeras contiene un dominio de enlace que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median típicamente el enlace del anticuerpo a los tejidos o factores hospederos, incluyendo varias células del sistema inmunitario (*por ejemplo*, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina pueden ser de tipo kappa o lambda. En una modalidad, el anticuerpo se glicosila. Un anticuerpo puede ser funcional para la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad mediada por complemento.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDRs pueden ser humanas, *por ejemplo*, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, y/o LC CDR3. Cada una de las CDRs de cadena ligera (LC) y/o cadena pesada (HC) pueden ser humanas. La HC CDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones de estructura pueden ser humanas, *por ejemplo*, FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la HC y/o LC. Por ejemplo, la región Fc puede ser humana. En una modalidad, todas las regiones de estructura son humanas, *por ejemplo*, derivadas de una célula somática humana, *por ejemplo*, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una modalidad, las secuencias humanas son secuencias de línea germinal, *por ejemplo*, codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. En una modalidad, los residuos de estructura (FR) de un Fab seleccionado se puede convertir al tipo de aminoácido del residuo correspondiente en el gen de línea germinal de primate más similar, especialmente el gen de línea terminal humano. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, al menos 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98, o 100% de un dominio variable de inmunoglobulina, la región constante los dominios constantes (CH1, CH2, CH3, y/o CL1), o el anticuerpo completo pueden ser humanos o

efectivamente humanos.

Un anticuerpo se puede codificar por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Los genes de inmunoglobulina humanos ejemplares incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como los muchos genes de región variable de inmunoglobulina. Las “cadenas ligeras” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 KDa o aproximadamente 214 aminoácidos) se codifican por un gen de región variable de la NH₂-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en la COOH. Las “cadenas pesadas” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 KDa o aproximadamente 446 aminoácidos), se codifican similarmente por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de región constante mencionados en lo anterior, *por ejemplo*, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). La longitud de la HC humana varía considerablemente debido a que la HC CDR3 varía de aproximadamente 3 residuos de aminoácidos a más de 35 residuos de aminoácidos.

El término “fragmento de enlace a antígeno” de un anticuerpo de longitud completa se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que retiene la capacidad para enlazarse específicamente a un objetivo de interés. Ejemplos de fragmentos de enlace abarcados dentro del término “fragmentos de enlace a antígeno” de un anticuerpo de longitud completa y que retiene la funcionalidad incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L, V_H, C_L y CH₁; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab ligados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y CH₁; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo (v) un fragmento dAb (Ward y colaboradores, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste de un dominio V_H; y (vi) una región determinadora de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, se codifican para genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, por un ligador sintético que les permite ser fabricados como una cadena de proteína individual en la cual las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena individual (scFv). Ver por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,260,203, 4,946,778, y 4,881,175; Bird y colaboradores (1988) *Science* 242:423-426; y Huston y colaboradores (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener utilizando cualquier técnica apropiada incluyendo técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en la técnica.

El término “anticuerpo monoespecífico” se refiere a un anticuerpo que muestra una especificidad de enlace individual y afinidad para un objetivo particular, *por ejemplo*, epítopo.

Este término incluye un “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal”, que se utiliza en la presente se refiere a un preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de composición molecular individual, independiente de como el anticuerpo se generó. Los anticuerpos son “de línea germinal” al revertir uno o más aminoácidos no de línea germinal en las regiones de estructura a los aminoácidos de línea germinal correspondientes del anticuerpo, siempre y cuando las propiedades de enlace se retengan estancialmente.

La constante de inhibición (K_i) proporciona una medición de potencia inhibidora; es la concentración del inhibidor requerido para reducir la actividad enzimática a la mitad y no es dependiente de la enzima o concentraciones de sustrato. La K_i evidente ($K_{i,app}$) se obtiene en diferentes concentraciones de sustrato al medir el efecto inhibidor de diferentes concentraciones de inhibidor (*por ejemplo*, proteína de enlace de inhibidor) en el grado de la reacción (*por ejemplo*, actividad enzimática); ajustar el cambio en la constante de asociación de pseudo-primer orden como una función de la concentración de inhibidor a la ecuación de Morrison (Ecuación 1) que produce un estimado del valor K_i evidente. El K_i se obtiene de la intercepción y extraída de un análisis de regresión lineal de una gráfica de la concentración de $K_{i,app}$ versus sustrato.

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

Ecuación 1

Donde v = velocidad medida; v_0 = velocidad en ausencia del inhibidor; $K_{i,app}$ = constante de inhibición evidente; I = concentración de inhibidor total; y E = concentración de enzimas totales.

Como se utiliza en la presente, “afinidad de enlace” se refiere a la constante de asociación evidente o K_A . La K_A es lo recíproco de la constante de disociación (K_D). Un anticuerpo de enlace puede, por ejemplo, tener una afinidad de enlace de al menos 105, 106, 107, 108, 109, 1010 y 1011 M⁻¹ para una molécula objetivo particular, *por ejemplo*, calicreína plasmática. El enlace de mayor afinidad de un anticuerpo de enlace a un primer objetivo con respecto a un segundo objetivo se puede indicar por una K_A más alta (o una K_D de valor numérico más pequeño) para el enlace al primer objetivo que la K_A (o valor numérico K_D) para el enlace del segundo objetivo. En tales casos, el anticuerpo de enlace tiene especificidad para el primer objetivo (*por ejemplo*, una proteína en una primera conformación o imitación de la misma), con respecto al segundo objetivo (*por ejemplo*, la misma proteína en una segunda conformación o imitación de los mismos; o una segunda proteína). Las diferencias en la afinidad de enlace (*por ejemplo*, para especificidad u otras comparaciones) puede ser al menos 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 90, 100, 500, 1000, 10,000 o 10⁵ veces.

La afinidad de enlace se puede determinar por una variedad de métodos incluyendo diálisis de equilibrio, enlace de equilibrio, filtración en gel, ELISA, resonancia de plasmones superficiales o espectroscopia (*por ejemplo*, utilizando un ensayo de fluorescencia). Las condiciones ejemplares para evaluar la afinidad de enlace están en solución amortiguadora HBS-P (HEPES 10 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 0.005% (v/v) de agente tensoactivo P20). Estas técnicas se pueden utilizar para medir la concentración de la proteína de enlace enlazada y libre como una función de la concentración de proteína de enlace (u objetivo). La concentración de la proteína de enlace unida ([Enlace]) se relaciona a la concentración de la proteína de enlace libre ([Libre]) y la concentración de los sitios de enlace para la proteína de enlace en el objetivo donde (N) es el número de sitios de enlace por molécula objetivo por la siguiente ecuación:

$$[\text{Enlazar}] = N \cdot [\text{Libre}] / ((1/K_A) + [\text{Libre}]).$$

No siempre es necesario hacer una determinación exacta de K_A , aunque, puesto que algunas veces es suficiente para obtener una medición cuantitativa de afinidad, *por ejemplo*, determinada utilizando un método tal como el análisis ELISA o FACS, es proporcional a la K_A , y de esta manera se puede utilizar para comparaciones, tal como determinar si la afinidad más alta es, *por ejemplo*, 2 veces más alta, para obtener una medición de calidad de afinidad, o para obtener interferencia en la afinidad, *por ejemplo*, por la actividad de un ensayo funcional, *por ejemplo*, un ensayo in vitro o in vivo.

El término “anticuerpo de enlace” (o “proteína de enlace” usados intercambiamente en la presente) se refiere a un anticuerpo que puede interactuar con una molécula objetivo. Este término se utiliza intercambiamente con “ligando”. Un “anticuerpo de enlace de calicreína plasmática” se refiere a un anticuerpo que puede interactuar con (*por ejemplo*, enlazar) la calicreína plasmática, e incluye, en particular, anticuerpos que interactúan de manera preferente o específicamente con y/o inhibir la calicreína plasmática. Un anticuerpo inhibe la calicreína plasmática si provoca una disminución en la afinidad de la calicreína plasmática como es comparada con la actividad de la calicreína plasmática en ausencia del anticuerpo y bajo las mismas condiciones.

Una “sustitución de aminoácido conservadora” se una en la cual el residuo de aminoácido se reemplaza con un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ejemplo*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ejemplo*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ejemplo*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas no polares (*por ejemplo*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas beta (*por ejemplo*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por*

ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Es posible para uno o más residuos de aminoácidos de estructura y/o CDR de una proteína de enlace incluyen una o más mutaciones (por ejemplo, sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras sustituciones de aminoácido no esenciales), inserciones, o supresiones) con respecto a una proteína de enlace descrita en la presente. Una proteína de enlace de calicreína plasmática puede tener mutaciones (*por ejemplo*, sustituciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras o sustituciones de aminoácidos no esenciales), inserciones, o supresiones) (*por ejemplo*, al menos uno, dos, tres, o cuatro y/o menor que 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, o 2 mutaciones) con respecto a una proteína de enlace descrita en la presente, por ejemplo mutaciones que no tienen un efecto sustancial en la función de la proteína. Las mutaciones pueden estar presentes en las regiones de estructura, CDRs, y/o regiones constantes. En algunas modalidades, las mutaciones están presentes en una región de estructura. En algunas modalidades, las mutaciones están presentes en una CDR. En algunas modalidades, las mutaciones están presentes en una región constante. Si una sustitución particular será tolerada o no, es decir, no afectará adversamente las propiedades biológicas, está actividad de enlace, se puede predecir, *por ejemplo*, al evaluar si la mutación es conservadora o por el método de Bowie, y colaboradores (1990) *Science* 247:1306-1310.

Una región variable de inmunoglobulina “efectivamente humana” es una región de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos de estructura humana tal que la región variable de inmunoglobulina no induce una respuesta inmunogénica en un humano normal. Un anticuerpo “efectivamente humano” es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones e aminoácidos humanos tal que el anticuerpo no induce una respuesta inmunogénica en un humano normal.

Un “epítipo” se refiere al sitio en un compuesto objetivo que se enlaza por una proteína de enlace (*por ejemplo*, un anticuerpo tal como un Fab de longitud completa). En el caso donde el compuesto objetivo es una proteína, el sitio se puede componer completamente de componentes de aminoácidos, compuestos completamente de modificaciones químicas de aminoácidos de la proteína (*por ejemplo*, porciones de glicósilo), o compuestas de combinaciones de los mismos. Los epítipos solapantes incluyen al menos un residuo de aminoácido común, grupo glicósilo, grupo fosfato, grupo sulfato, u otra característica molecular.

Un primer anticuerpo de enlace “se enlaza al mismo epítipo” como uno segundo anticuerpo de enlace si el primer anticuerpo de enlace se enlaza al mismo sitio en un compuesto objetivo que el segundo anticuerpo de enlace se enlaza, o se enlaza a un sitio que traslapa (*por ejemplo*, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% de traslapado, *por ejemplo*, en términos de secuencia de aminoácidos u otra característica molecular (*por ejemplo*, grupo glicósilo, grupo fosfato o grupo sulfato)) con el sitio que el segundo anticuerpo de enlace se

enlaza.

Un primer anticuerpo de enlace “compite para el enlace” con un segundo anticuerpo de enlace si el enlace del primer de enlace a su epítipo disminuye (*por ejemplo*, por 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, o más) la cantidad del segundo anticuerpo de
 5 enlace que se enlaza a su epítipo. La competición puede ser directa (*por ejemplo*, el primer anticuerpo de enlace se enlaza a un epítipo que es el mismo como, o se traslapa con, el epítipo enlazado por el segundo anticuerpo de enlace), o indirecta, (*por ejemplo*, el enlace del primer anticuerpo de enlace a su epítipo provoca un cambio estérico en el compuesto objetivo que disminuye la capacidad de ser un anticuerpo de enlace a enlazarse a su epítipo).

El cálculo de la “homología” o “identidad de secuencia” entre dos secuencias (los términos se utilizan intercambiabilmente en la presente) se llevan a cabo como sigue. Las secuencias se alinean para propósitos de comparación optimas (*por ejemplo*, los espacios se pueden introducir en uno o ambos de un primer y segundo aminoácido o secuencia de ácido nucleico para la alineación óptima en las secuencias no homólogas se pueden descartar para
 15 propósitos de comparación. La alineación óptima se determina como la mejor puntuación utilizando el programa GAP en el paquete de software GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización de espacio de 12, una penalización de extensión de espacio de 4, y una penalización de espacio de cambio de marco de 5. Los residuos de aminoácidos son nucleótido en las posiciones de aminoácidos correspondientes o posiciones de
 20 nucleótidos entonces se comparan. Cuando una posición en la primera secuencia se ocupa por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en la presente la “identidad” de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la “homología” de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es la
 25 función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es al menos 30%, de manera preferente al menos 40%, de manera más preferente al menos 50%, aún de manera más preferente al menos 60%, y aún de manera más preferente al menos 70%, 80%, 90%, 92%, 95%, 97%, 98%, o 100% de la
 30 longitud de la secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia de referencia puede ser la longitud de la secuencia de dominio variable de la inmunoglobulina.

Una región variable de inmunoglobulina “humanizada” es una región variable de inmunoglobulina que se modifica para incluir un número suficiente de posiciones de aminoácidos de estructura humana tal que la región variable de inmunoglobulina no induce
 35 una respuesta inmunogénica en un humano normal. Las descripciones de las inmunoglobulinas “humanizadas” incluyen, por ejemplo, U.S. 6,407,213 y U.S. 5,693,762.

Un anticuerpo “aislado” se refiere a un anticuerpo que se remueve de al menos 90%

de al menos un componente de una muestra natural de la cual el anticuerpo aislado se puede obtener. Los anticuerpos pueden ser “de al menos” un cierto grado de pureza si las especies o población de especies de intereses es al menos 5, 10, 25, 50, 75, 80, 90, 92, 95, 98, o 99% pura sobre una base de peso-peso.

5 Un “paciente”, “sujeto” u “hospedero” (estos términos se utilizan intercambiamente) al ser tratados por el método sujeto pueden significar ya sea un humano o animal no humano. El sujeto puede ser un sujeto que se ha sometido a un tratamiento previo para HAE, tal como un tratamiento que implica un anticuerpo descrito en la presente. En algunas modalidades, el sujeto es un sujeto pediátrico (*por ejemplo*, un bebé, niño, o sujeto adolescente).

10 Los términos “precalicreína” y “calicreína pre-plasmática” se utilizan intercambiamente en la presente y se refieren a la forma de cimógeno de la calicreína plasmática activa, que también es conocida como precalicreína.

 Como se utiliza en la presente, el término “sustancialmente idéntico” (o “sustancialmente homólogo”) se utiliza en la presente para referirse a una primera secuencia
15 de aminoácidos o ácido nucleico que contiene un número suficiente de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes (*por ejemplo*, con una cadena lateral similar, *por ejemplo*, sustituciones de aminoácidos conservadas) o nucleótidos o a una segunda secuencias de aminoácidos o ácido nucleico tal que la primera y segunda secuencias de aminoácidos o ácido nucleico tienen (o codifican proteínas que tienen) actividades similares,
20 *por ejemplo*, actividad de enlace, una preferencia de enlace o una actividad biológica. En el caso de los anticuerpos, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad e impide al menos 50%, al menos 25%, o al menos 10% de la afinidad con respecto al mismo antígeno.

 Las secuencias similares u homologas (*por ejemplo*, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia) a las secuencias descritas en la presente también son parte de
25 esta solicitud. En algunas modalidades, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más alta. En algunas modalidades, un anticuerpo de enlace de calicreína plasmática pueden tener aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más alta de identidad de secuencia a un anticuerpo descrito en la presente. En algunas modalidades,
30 un anticuerpo de enlace de calicreína plasmática puede tener aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más alta de identidad de secuencia en las regiones de estructura HC y/o LC (*por ejemplo*, HC y/o LC FR 1, 2, 3, y/o 4) a un anticuerpo descrito en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). En algunas modalidades, un anticuerpo de enlace de calicreína plasmática pueden tener aproximadamente 85%, 90%,
35 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más alto de identidad de secuencia en la CDRs HC y/o LC (*por ejemplo*, HC y/o LC CDR1, 2, y/o 3) a un anticuerpo descrito en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). En algunas modalidades, un anticuerpo de enlace de

calicreína plasmática pueden tener aproximadamente 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más alto de identidad de secuencia en la región constante (*por ejemplo*, CH1, CH2, CH3, y/o CL1) a un anticuerpo descrito en la presente (*por ejemplo*, DX-2930).

5 Además, existe la identidad de suspensión cuando los segmentos de ácido nucleico se hibridan bajo condiciones de hibridación selectivas (*por ejemplo*, condiciones de hibridación sumamente rigurosas), al complemento de la hebra. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en las células enteras, en un lisado celular, o una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura.

10 La significancia estadística se puede determinar por cualquier técnica conocida en el método. Las pruebas estadísticas ejemplares incluyen: la prueba T de Student, prueba no paramétrica de Mann Whitney U, y la prueba estadística no paramétrica de Wilcoxon. Algunas relaciones significativamente significativas tienen un valor P de menor que 0.05 o 0.02. Las proteínas de enlace particulares pueden mostrar una diferencia, *por ejemplo*, en la
15 especificidad o enlace que son estadísticamente significativas (*por ejemplo*, valor P < 0.05 o 0.02). Los términos “inducen”, “inhiben”, “potencia”, “se elevan”, “se incrementan”, “disminuyen” o similar, *por ejemplo*, que indican diferencias cualitativas o cuantitativas distinguibles entre dos estados, pueden referirse a una diferencia, *por ejemplo*, una diferencia significativamente significativa, entre los dos estados.

20 Una “dosificación terapéuticamente efectiva” modula de manera preferente un parámetro medible, *por ejemplo*, actividad de calicreína plasmática, por un grado estadísticamente significativo o al menos aproximadamente 20%, de manera más preferente por al menos aproximadamente 40%, aún de manera más preferente por al menos aproximadamente 60%, y aun de manera más preferente por al menos aproximadamente 80%
25 con respecto a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para modular un parámetro medible, *por ejemplo*, un parámetro asociado con la enfermedad, se puede evaluar en sistema de modelo animal primitivo de eficacia en los trastornos humanos y condiciones. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede evaluar al examinar la capacidad de un compuesto para modular un parámetro in vitro.

30 El término “tratar” como se utiliza en la presente se refiere a la aplicación o administración de una composición que incluye uno o más agentes activos a un sujeto, que tiene una enfermedad alérgica, un síntoma de la enfermedad alérgica, o una predisposición hacia la enfermedad alérgica, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, aminorar, mejorar, o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la
35 predisposición hacia la enfermedad. “Tratamiento profiláctico”, también conocido como “tratamiento preventivo”, se refiere a un tratamiento que fija como objetivo proteger una persona de, o reducir el riesgo de una enfermedad a la cual él o ella ha sido, o puede ser,

expuesto. En algunas modalidades, los métodos del tratamiento descritos en la presente fijan como objetivo prevenir la ocurrencia y/o recurrencia de HAE.

El término “prevenir” una enfermedad a un sujeto se refiere a someter al sujeto a un tratamiento farmacéutico, *por ejemplo*, la administración de un fármaco, tal que al menos un
 5 síntoma de la enfermedad se previene, es decir, se administra antes de la manifestación clínica de la afección no deseada (*por ejemplo*, enfermedad u otro estado no deseado del animal hospedero) de modo que protege al hospedero contra el desarrollo de la condición no deseada. “Prevenir” una enfermedad también se puede referir como “profilaxis” o “tratamiento profiláctico”.

10 Una “cantidad profilácticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en las dosificaciones y períodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típicamente, debido a que una dosis profiláctica se utiliza en los sujetos antes de o en una etapa temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente efectiva será menor que la cantidad terapéuticamente efectiva.

15 ***Anticuerpos que se Enlazan a la Calicreína Plasmática (pKal)***

Los anticuerpos de enlace a la calicreína plasmática (anticuerpos anti-pKal) para el uso en los métodos descritos en la presente pueden ser de longitud completa (*por ejemplo*, una IgG (incluyendo una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (incluyendo, IgA1, IgA2), IgD, y IgE) o pueden incluir solo un fragmento de enlace a antígeno (*por ejemplo*, un Fab, F(ab')₂ o
 20 fragmento scFv. El anticuerpo de enlace puede incluir dos inmunoglobulinas de cadena pesada y dos inmunoglobulinas de cadena ligera, o pueden ser un anticuerpo de cadena individual. Los anticuerpos de enlace a calicreína plasmática pueden ser proteínas recombinantes tal como humanizadas, injertadas con CDR, quiméricas, desinmunizadas, o anticuerpos generados *in vitro*, y pueden incluir opcionalmente regiones constantes derivadas
 25 de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humanas. En una modalidad, el anticuerpo de enlace a calicreína plasmática es un anticuerpo monoclonal.

En un aspecto, la descripción describe un anticuerpo (*por ejemplo*, un anticuerpo aislado) que se enlaza a la calicreína plasmática (*por ejemplo*, calicreína plasmática humana y/o calicreína de murino) e incluye al menos una región variable de inmunoglobulina. Por
 30 ejemplo, el anticuerpo incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena pesada (HC) y/o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de cadena ligera (LC) En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a e inhibe la calicreína plasmática, *por ejemplo*, calicreína plasmática humana y/o calicreína de murino.

El anticuerpo puede incluir una o más de las siguientes características: (a) una CDR
 35 humana o región de estructura humana; (b) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina HC comprende una o más (*por ejemplo*, 1, 2, o 3) de CDRs que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idénticas a una CDR de un dominio

variable HC descrito en la presente; (c) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina LC comprende una o más (*por ejemplo*, 1, 2, o 3) CDRs que son al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idénticas a una CDR de un dominio variable LC descrito en la presente; (d) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina LC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntica a un dominio variable LC descrito en la presente (*por ejemplo*, en totalidad o en las regiones de estructuras o CDRs); (e) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina HC es al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntica a un dominio variable HC descrita en la presente (*por ejemplo*, en general o en las regiones de estructura o CDRs); (f) el anticuerpo enlaza un epítipo enlazado por un anticuerpo descrito en la presente, o compete para el enlace con un anticuerpo descrito en la presente; (g) una CDR de primate o región de estructura de primate; (h) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina HC comprende una CDR1 que difiere por al menos un aminoácido pero no más de 2 o 3 aminoácidos de la CDR1 o de un dominio variable HC descrito en la presente; (i) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina HC comprende una CDR2 que difiere por al menos un aminoácido pero no por más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 aminoácidos de la CDR2 de un dominio variable HC descrito en la presente; (j) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina HC comprende una CDR3 que difiere por al menos un aminoácido pero no por más de 2, 3, 4, 5, o 6 aminoácidos de la CDR3 de un dominio variable HC descrito en la presente; (k) la secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina LC comprende una CDR1 que difiere por al menos un aminoácido pero no por más de 2, 3, 4, o 5 aminoácidos de la CDR1 de un dominio variable de LC descrito en la presente; (l) CDR2 que difiere por al menos un aminoácido pero no por más de 2, 3, o 4 aminoácidos de la CDR2 del dominio variable de LC descrito en la presente; (m) la secuencia de dominio variable de inmunoglobulina de LC comprende una CDR3 que difiere por al menos un aminoácido pero no por más de 2, 3, 4, o 5 aminoácidos de la CDR3 de un dominio variable de LC descrito en la presente; (n) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de LC difiere por al menos un aminoácido pero no por más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos de un dominio variable LC descrito en la presente (*por ejemplo*, en general o en las regiones de estructura o CDRs); y (o) la secuencia del dominio variable de inmunoglobulina de HC difiere por al menos un aminoácido pero no por más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 aminoácidos del dominio variante de HC descrito en la presente (*por ejemplo*, en general o en las regiones de estructura o CDRs).

La proteína de enlace calicreína plasmática puede ser un anticuerpo aislado (*por ejemplo*, al menos 70, 80, 90, 95, o 99% libre de otras proteínas). En algunas modalidades, el anticuerpo de enlace a calicreína plasmática, o una composición del mismo, se aísla de los fragmentos de escisión de anticuerpo (*por ejemplo*, DX-2930) que son inactivos o parcialmente activos (*por ejemplo*, se enlazan a la calicreína plasmática con una $K_{i, app}$ de

5000 nM o mayor) comparado con el anticuerpo de enlace a calicreína plasmática. Por ejemplo, el anticuerpo de enlace a calicreína plasmática es al menos 70% libre de tales fragmentos de escisión de anticuerpos; en otras modalidades el anticuerpo de enlace es al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 99% o aún 100% libres de los fragmentos de escisión de anticuerpos que son inactivos o parcialmente activos.

El anticuerpo de enlace a calicreína plasmática puede inhibir adicionalmente la calicreína plasmática, *por ejemplo*, calicreína plasmática humana.

En algunas modalidades, el anticuerpo de enlace a calicreína plasmática no enlaza la precalicreína (*por ejemplo*, precalicreína humana y/o precalicreína de murino), sino se enlaza a la forma activa de la calicreína plasmática (*por ejemplo*, calicreína plasmática humana y/o calicreína de murino).

En ciertas modalidades, el anticuerpo se enlaza en o cerca del sitio activo del dominio catalítico de la calicreína plasmática, o un fragmento de la misma, o se enlaza a un epítipo que se traslapa con el sitio activo de la calicreína plasmática.

En algunos aspectos, el anticuerpo enlaza el mismo epítipo o compite para el enlace con un anticuerpo descrito en la presente.

El anticuerpo puede enlazarse a la calicreína plasmática, *por ejemplo*, calicreína plasmática humana, con una afinidad de enlace de al menos 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} y 10^{11} M⁻¹. En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a la calicreína plasmática humana con una K_{off} más lenta que 1×10^{-3} , 5×10^{-4} s⁻¹, o 1×10^{-4} s⁻¹. En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a la calicreína plasmática humana con una K_{on} rápida que 1×10^2 , 1×10^3 , o 5×10^3 M⁻¹s⁻¹. En una modalidad, el anticuerpo se enlaza a la calicreína plasmática, pero no se enlaza a la calicreína de tejido y/o precalicreína plasmática (*por ejemplo*, el anticuerpo se enlaza a la calicreína de tejido y/o a la calicreína plasmática de menos eficaz (*por ejemplo*, 5-, 10-, 50-, 100-, o 1000 veces menos o nada en lo absoluto, *por ejemplo*, como es comparado con un control negativo) que se enlaza a la calicreína plasmática).

En una modalidad, el anticuerpo inhibe la actividad de la calicreína plasmática humana, *por ejemplo*, con una K_i de mejor que 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , y 10^{-10} M. El anticuerpo puede tener, *por ejemplo*, una IC_{50} de menor que 100 nM, 10 nM, 1, 0.5, o 0.2 nM. *Por ejemplo*, el anticuerpo puede modular la actividad de la calicreína plasmática, así la producción del Factor XIIa (*por ejemplo*, del Factor XII) y/o bradiquinina (*por ejemplo*, del quinínogeno de peso molecular alto (HMWK)). El anticuerpo puede inhibir la actividad de la calicreína plasmática, y/o la producción del Factor XIIa (*por ejemplo*, del Factor XII) y/o bradiquinina (*por ejemplo*, del quinínogeno de peso molecular alto (HMWK)). La afinidad del anticuerpo para la calicreína plasmática humana se puede caracterizar por una K_D de menor que 100 nm, menor que 10 nM, menor que 5 nM, menor que 1 nM, menor que 0.5 nM. En una modalidad, el anticuerpo inhibe la calicreína plasmática, pero no inhibe la calicreína del tejido

(*por ejemplo*, el anticuerpo inhibe la calicreína del tejido de manera menos eficaz (*por ejemplo*, 5, 10, 50, 100, o 1000 veces menor o nada en lo absoluto, *por ejemplo*, como es comparado con un control negativo) que inhibe la calicreína plasmática.

En algunas modalidades, el anticuerpo tiene una constante de inhibición evidente
5 ($K_{i,app}$) de menor que 1000, 500, 100, 5, 1, 0.5 o 0.2 nM.

Los anticuerpos de enlace a calicreína plasmática pueden tener su secuencia de dominio variable HC y LC incluidas en un polipéptido individual (*por ejemplo*, scFv), o en polipéptidos diferentes (*por ejemplo*, IgG o Fab).

En una modalidad, las secuencias de dominio variable HC y LC son componentes de
10 la misma cadena del polipéptido. En otra modalidad, las secuencias de dominio variable HC y LC son componentes de diferentes cadenas del polipéptido. Por ejemplo, el anticuerpo es una IgG, *por ejemplo*, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. El anticuerpo puede ser un Fab soluble. En otras implementaciones, en anticuerpo incluye un Fab2', scFv, minicuerpo, fusión scFv::Fc, fusión Fab::HSA, fusión HSA::Fab, fusión Fab::HSA::Fab, u otra molécula que comprende el sitio de
15 combinación de antígeno de una de las proteínas de enlace en la presente. Las regiones VH y VL de estos Fabs se pueden proporcionar como IgG, Fab, Fab2, Fab2', scFv, Fab PEGilado, acFv PEGilado, Fab2 PEGilado, VH::CH1::HSA+LC, HSA::VH::CH1+LC, LC::HSA + VH::CH1, HSA::LC + VH::CH1, u otra construcción apropiada.

En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado o no es
20 inmunogénico en un humano. Por ejemplo, el anticuerpo incluye una o más regiones de estructura de anticuerpos humanas, *por ejemplo*, todas las regiones de estructura humanas, o las regiones de estructura al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idénticas a las regiones de estructura humanas. En una modalidad, el anticuerpo incluye un dominio Fc humano, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98, o 99% idéntico a un
25 dominio Fc humano.

En una modalidad, el anticuerpo es un anticuerpo de primate o primatizado o no es inmunogénico en un humano. Por ejemplo, el anticuerpo incluye una o más regiones de estructura de anticuerpo de primate, *por ejemplo*, todas las regiones de estructura de primate, o las regiones de estructura al menos 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% idénticas a las regiones de estructura de primate. En una modalidad, el anticuerpo incluye un
30 dominio Fc de primate, o un dominio Fc que es al menos 95, 96, 97, 98, o 99% idéntico a un dominio Fc de primate. "Primate" incluye humanos (*Homo sapiens*), chimpancés (*Pan troglodytes* y *Pan paniscus* (bonobos)), gorilas (*Gorilla gorilla*), gibones, monos, lémures, aye-ayes (*Daubentonia madagascariensis*), y tarsieros. En algunas modalidades, la afinidad del
35 anticuerpo de primate para la calicreína plasmática humana se caracteriza por una K_D de menor que 1000, 500, 100, 10, 5, 1, 0.5 nM, *por ejemplo*, menor que 10 nM, menor que 1 nM, o menor que 0.5 nM.

En ciertas modalidades, el anticuerpo incluye secuencias de ratones o conejos (*por ejemplo*, no es un anticuerpo de murino o conejo).

En algunas modalidades, el anticuerpo utilizado en los métodos descritos en la presente puede ser DX-2930 como se describe en la presente o una variante funcional del mismo, o un anticuerpo que enlaza el mismo epítipo como DX-2930 o compite contra DX-2930 para el enlace a la calicreína plasmática activa.

En un ejemplo, una variante funcional de DX-2930 comprende las mismas regiones determinadoras de complementariedad (CDRs) como DX-2930. En otro ejemplo, las variantes funcionales de DX-2930 pueden contener una o más mutaciones (*por ejemplo*, sustituciones conservadoras) en las FRs de ya sea el V_H o el V_L como es comparado con aquellos en el V_H y V_L de DX-2930. De manera preferente, estas mutaciones no se presentan en los residuos que se predice que interactúan con una o más de las CDRs, que se puede determinar por tecnología de rutina. En otras modalidades, las variantes funcionales descritas en la presente contienen una o más mutaciones (*por ejemplo*, 1, 2, o 3) dentro de una o más de las regiones CDR de DX-2930. De manera preferente, estas variantes funciones retienen las mismas regiones/residuos responsables por el enlace a antígeno como el precursor. En todavía otras modalidades, una variante funcional de DX-2930 puede comprender una cadena V_H que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% (*por ejemplo*, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) idéntica a aquella de la V_H de DX-2930 y/o una cadena V_L que tiene unas secuencias de aminoácidos al menos 85% (*por ejemplo*, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%) idéntica a aquella de la V_L de DX-2930. Estas variantes son capaces de enlazarse a la forma activa de la calicreína plasmática y de manera preferente no se enlazan a la precalicreína.

El “porcentaje de identidad” de dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Karlin y Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, 1990, modificado como en Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77, 1993. Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, y *colaboradores J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990. Las búsquedas de la proteína BLAST se puede llevar a cabo con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener las secuencias de aminoácidos homologas a las moléculas de proteína de interés. Donde existen espacios ente las dos secuencias, el Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul y *colaboradores, Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997. Cuando se utilizan dos programas BLAST y Gapped BLAST, los parámetros por omisión de los programas respectivos (*por ejemplo*, XBLAST y NBLAST) se pueden utilizar.

En algunas modalidades, el anticuerpo utilizado en los métodos y composiciones descritos en la presente puede ser del anticuerpo DX-2930. Las secuencias variables incompletas de cadena pesada y ligera para DX-2930 se proporcionan a continuación, con las

secuencias señal en cursivas. Las CDRs están en negritas y subrayadas.

Secuencias de Aminoácidos de Cadena Pesada de DX-2930 (451 aminoácidos, 49439.02 Da)

MGWSCILFLVATATGAHSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGK
GLEWVSGIYSSGGITVYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRR

5 DEFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL
TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
PPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVD
10 KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 1)

Secuencia de Aminoácidos de Cadena Ligera DX-2930 (213 aminoácidos, 23419.08 Da)

MGWSCILFLVATATGAHSDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP
KLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRFAKVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

15 STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 2)

Secuencia de Aminoácidos de Dominio Variable de Cadena Pesada DX-2930

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYIMMWVRQAPGKGLEWVSGIYSSGGITVYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAYRRIGVPRRDEFDIWGQGTMTVTVSS
(SEQ ID NO: 3)

20 Secuencia de Aminoácidos de Dominio Variable de Cadena Ligera DX-2930

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESGVPSRFS
GSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYNTYWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 4)

Tabla 1. CDRs para DX-2930.

CDR	Secuencia de aminoácidos
CDR1 de cadena pesada	HYIMM (SEQ ID NO: 5)
CDR2 de cadena pesada	GIYSSGGITVYADSVKG (SEQ ID NO: 6)
CDR3 de cadena pesada	RRIGVPRRDEFDI (SEQ ID NO: 7)
CDR1 de cadena ligera	RASQSISSWLA (SEQ ID NO: 8)
CDR2 de cadena ligera	KASTLES (SEQ ID NO: 9)
CDR3 de cadena ligera	QQYNTYWT (SEQ ID NO: 10)

Preparación del Anticuerpo

Un anticuerpo como se describe en la presente (por ejemplo, DX-2930) se puede hacer mediante cualquier método conocido en la técnica. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane, (1988)

35 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York and Greenfield, (2013) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory

Press.

La secuencia que codifica el anticuerpo de interés, *por ejemplo*, DX-2930, se puede mantener en el vector en la célula hospedera y la célula hospedera entonces se puede expandir y congelar para uso futuro. En una alternativa, la secuencia de polinucleótidos se puede utilizar para manipulación genética para “humanizar” el anticuerpo o para mejorar la afinidad (maduración por afinidad), u otras características del anticuerpo. Por ejemplo, la región constante se puede modificar para asemejarse más a las regiones constantes humanas para evitar la respuesta inmunitaria y el anticuerpo se utiliza en los ensayos clínicos sin tratamientos en humanos. Puede ser deseable manipular genéticamente la secuencia de anticuerpos para obtener mayor afinidad al antígeno objetivo y mayor eficacia en inhibir la actividad del PKa. Será evidente para una persona de experiencia en la técnica que uno o más cambios de polinucleótidos se puedan hacer al anticuerpo y mantener aun su especificidad de enlace al antígeno objetivo.

En otras modalidades, los anticuerpo completamente humanos se pueden obtener al utilizar ratones comercialmente disponibles que se han modificado para expresar las proteínas de inmunoglobulina humanas específicas. Los animales transgénicos que se diseñaron para producir una respuesta inmunitaria más deseable (*por ejemplo*, anticuerpos totalmente humanos) o más consistentes también se pueden utilizar para la generación de anticuerpos humanizados o humanos. Ejemplos de esta tecnología son Xenomouse^{RM} de Amgen, Inc. (Fremont, Calif.) y HuMAb-Mouse^{RM} y TC Mouse^{MR} de Medarex, Inc. (Princeton, N.J.). En otra alternativa, los anticuerpos se pueden hacer recombinantemente por la expresión en fago o tecnología de levadura. Ver, por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; y 6,265,150; y Winter y colaboradores, (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455. Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y colaboradores, (1990) *Nature* 348:552-553) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, de repertorios de genes de dominio variable de inmunoglobulina (V) de donadores no inmunizados.

Los fragmentos de enlace a antígeno de un anticuerpo intacto (anticuerpo de longitud completa) se pueden preparar a través de métodos de rutina. Por ejemplo, los fragmentos F(ab')₂ se pueden producir por la digestión de pepsina de una molécula de anticuerpo, y los fragmentos Fab se pueden generar al reducir los puentes de disulfuro de los fragmentos F(ab')₂.

Los anticuerpos genéticamente modificados, tal como anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena individual, y anticuerpos biespecíficos, se pueden producir a través, *por ejemplo*, de tecnología recombinante convencional. En un ejemplo, el ADN que codifica anticuerpos monoclonales específicos para un antígeno objetivo se pueden aislar o sintetizar fácilmente. El ADN se puede colocar en uno más vectores de

expresión, que después se transfieren en las células hospederas tal como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales en las células hospederas recombinantes. Ver, *por ejemplo*,
5 Publicación de PCT No. WO 87/04462. El ADN entonces se puede modificar, por ejemplo, al sustituir la secuencia de codificación para los dominios contantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de las secuencias de murino homólogas, Morrison y colaboradores, (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, o al inicio covalentemente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina todo o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido no de
10 inmunoglobulina. De esa manera, se pueden reparar anticuerpos genéticamente modificados, tal como anticuerpos “quiméricos” o “híbridos”; que tienen la especificidad de enlace de un antígeno objetivo.

Las técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos” son bien conocidas en el campo. Ver *por ejemplo*, Morrison y colaboradores (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851; Neuberger y colaboradores (1984) *Nature* 312, 604; y Takeda y colaboradores (1984) *Nature* 314:452.

Los métodos para construir anticuerpos humanizados también son bien conocidos en la técnica. Ver, *por ejemplo*, Queen y colaboradores, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989). En un ejemplo, las regiones variables de V_H y V_L de un anticuerpo no humano precursor se someten al análisis de modelación molecular tridimensional siguiendo los
20 métodos conocidos en la técnica. Después, los residuos de aminoácidos de estructura predichos por ser importantes para la formación de las estructuras de CDR correctas se identifican utilizando el mismo análisis de modelación molecular. En paralelo, las cadenas V_H y V_L humanas que tienen secuencias de aminoácidos que son homólogas a aquellas del anticuerpo no humano precursor se identifica de cualquier base de datos de genes de
25 anticuerpos utilizando las secuencias V_H y V_L precursoras como consultas de búsqueda. Entonces se seleccionan genes aceptores V_H y V_L .

Las regiones CDR dentro de los genes aceptores humanos seleccionados se pueden reemplazar con las regiones CDR del anticuerpo no humano precursor o las variantes
30 funcionales de los mismos. Cuando es necesario, los residuos dentro de las regiones de estructura de la cadena precursora que se predicen por ser importantes en interactuar con las regiones CDR (ver la descripción anterior) se pueden utilizar para sustituir los residuos correspondientes en los genes aceptores humanos.

Se puede preparar un anticuerpo de cadena individual a través de tecnología
35 recombinante al ligar una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena pesada y una secuencia de nucleótidos que codifica para una región variable de cadena ligera. De manera preferente, un ligador flexible se incorpora entre las dos regiones

variables. Alternativamente, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena individual (Patentes de E.U.A. Nos. 4,946,778 y 4,704,692) se pueden adaptar para producir una biblioteca de scFv de fago o levadura y clones de scFv específicos para PKal se pueden identificar de la biblioteca siguiendo procedimientos de rutina. Los clones positivos se

5 pueden someter a clasificación adicional para identificar aquellos que inhiben la actividad de PKal.

Algunos anticuerpos, *por ejemplo*, Fabs, se puede producir en las células bacterianas, *por ejemplo*, células de *E. coli* (ver *por ejemplo*, Nadkarni, A. y colaboradores, 2007 *Protein Expr Purif* 52(1):219-29). Por ejemplo, si el Fab se codifica por las secuencias en un vector de

10 expresión en fago que incluye un codón de detención suprimible entre la identidad de expresión y una proteína de bacteriófago (o fragmento de mismo), el ácido nucleico de vector se puede transferir en una célula bacteriana que no puede suprimir un codón de detención. En este caso, el Fab no se fusiona a la proteína del gen III y se secreta en el periplasma y/o medio.

Los anticuerpos también se pueden producir en células eucariotas. En una modalidad, los anticuerpos (*por ejemplo*, scFv's) se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (ver, *por ejemplo*, Powers y colaboradores, 2001, *J. Immunol. Methods*. 251:123-35; Schoonooghe S. y colaboradores, 2009 *BMC Biotechnol.* 9:70; Abdel-Salam, HA. y colaboradores, 2001 *Appl Microbiol Biotechnol* 56(1-2):157-64; Takahashi K. y colaboradores,

20 2000 *Biosci Biotechnol Biochem* 64(10):2138-44; Edqvist, J. y colaboradores, 1991 *J Biotechnol* 20(3):291-300), *Hansenula*, o *Saccharomyces*. Uno de experiencia en la técnica puede optimizar la producción de anticuerpos en la levadura al optimizar, por ejemplo, las condiciones del oxígeno (ver *por ejemplo*, Baumann K., y colaboradores 2010 *BMC Syst. Biol.* 4:141), osmolaridad (ver *por ejemplo*, Dragosits, M. y colaboradores, 2010 *BMC Genomics* 11:207), temperatura (ver *por ejemplo*, Dragosits, M. y colaboradores, 2009 *J Proteome Res.* 8(3):1380-92), condiciones de fermentación (ver *por ejemplo*, Ning, D. y colaboradores 2005 *J. Biochem. and Mol. Biol.* 38(3): 294-299), cepa de levadura (ver *por ejemplo*, Kozyr, AV y colaboradores 2004 *Mol Biol (Mosk)* 38(6):1067-75; Horwitz, AH. y colaboradores, 1988 *Proc Natl Acad Sci USA* 85(22):8678-82; Bowdish, K. y colaboradores 1991 *J Biol Chem* 266(18):11901-8), sobreexpresión de proteínas para mejorar la producción de anticuerpos (ver

30 *por ejemplo*, Gasser, B. y colaboradores, 2006 *Biotechnol. Bioeng.* 94(2):353-61), nivel de acidez de cultivo (ver *por ejemplo*, Kobayashi H., y colaboradores, 1997 *FEMS Microbiol Lett* 152(2):235-42), concentraciones de sustratos y/o iones (ver *por ejemplo*, Ko JH. y colaboradores, 1996 *Appl Biochem Biotechnol* 60(1):41-8). Además, los sistemas de levadura

35 se pueden utilizar para producir anticuerpos con una vida media prolongada (ver *por ejemplo*, Smith, BJ. y colaboradores 2001 *Bioconj Chem* 12(5):750-756).

En una modalidad preferida, los anticuerpos se producen en células de mamífero. Las

células hospederas de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos de clones o fragmentos de enlace a antígeno de los mismos incluyen Ovario de Hámster Chino (células CHO) (incluyendo células dhfr-CHO, descritas en Urlaub y Chasin, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, *por ejemplo*, como se describe en Kaufman y Sharp, 1982, *Mol. Biol.* 159:601-621), líneas de células linfocíticas, *por ejemplo*, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, células HEK293T (*J. Immunol. Methods* (2004) 289(1-2):65-80), y una célula de un animal transgénico, *por ejemplo*, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial mamaria.

En algunas modalidades, los anticuerpos de enlace calicreína plasmática se producen en una planta o sistema basado sin células (ver *por ejemplo*, Galeffi, P., y colaboradores, 2006 *J Transl Med* 4:39).

Además de la secuencia de ácido nucleico que codifica el dominio de inmunoglobulina diversificado, los vectores de expresión recombinantes pueden llevar secuencias adicionales, tal como secuencias que regulan la replicación del vector en las células hospederas (*por ejemplo*, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El ge marcador seleccionable facilita la selección de las células hospederas en las cuales el vector será introducido (ver *por ejemplo*, Patentes de E.U.A. Nos. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017). Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos, tal como G418, higromicina o metotrexato, en una célula hospedera en la cual el vector se ha introducido. Los genes marcadores seleccionables preferidos incluyen el gen de hidrofolato reductasa (DHFR) (para el uso en las células hospederas *dhfr* con selección/amplificación de metotrexato) y el gen *neo* (para selección de G418).

En un sistema ejemplar par la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de enlace a antígeno del mismo, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada de anticuerpo como la cadena ligera de anticuerpo se introduce en las células *dhfr* CHO por transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo se ligan operativamente cada uno a los elementos reguladores mejoradores/promotores (*por ejemplo*, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similar, tal como un elemento regulador mejorador de CMV/promotor de AdMLP o un elemento regulador de mejorador SV40/promotor AdMLP) para conducir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector utilizando la selección/amplificación de metotrexato. Las células hospederas transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del cultivo. Las técnicas de biología molecular estándares se utilizan para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospederas, seleccionar para transformantes, cultivar las células

hospederas y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo. Por ejemplo, algunos anticuerpos se pueden aislar por cromatografía de afinidad con una matriz acoplada a Proteína A o Proteína G.

Para los anticuerpos que incluyen un dominio Fc, el sistema de producción de anticuerpo puede producir anticuerpos en los cuales la región Fc se glicosila. Por ejemplo, el dominio Fc de las moléculas IgG se glicosila en asparagina 297 en el dominio CH2. Esta asparagina es el sitio para la modificación con los oligosacáridos tipo biantenarios. Se ha mostrado que esta glicosilación se requerida para las funciones efectoras mediadas por los receptores Fcγ y C1q de complemento (Burton y Woof, 1992, *Adv. Immunol.* 51:1-84; Jefferis y colaboradores, 1998, *Immunol. Rev.* 163:59-76). En una modalidad, se produce el dominio Fc en un sistema de expresión de mamífero que glicosila apropiadamente el residuo que corresponde a la asparagina 297. El dominio Fc también puede incluir otras modificaciones postraduccionales eucariotas.

Los anticuerpos también se pueden producir por un animal transgénico. Por ejemplo, la Patente de E.U.A. No. 5,849,992 describe un método para expresar un anticuerpo en la glándula mamaria de un mamífero transgénico. Se construye un transgen que incluye un promotor específico de leche y ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo de interés y una secuencia señal para secreción. La leche producida por las hembras de estos mamíferos transgénicos incluye, secretados en la misma, el anticuerpo de interés. El anticuerpo se puede purificar de la leche, o para algunas aplicaciones, utilizados directamente.

Composiciones Farmacéuticas

Un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) puede estar presente en una composición, *por ejemplo*, una composición farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica. El anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede formular conjuntamente con un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, 150 mg o 300 mg del anticuerpo DX-2930 está presentes en una composición opcionalmente con un portador farmacéuticamente aceptable, *por ejemplo*, una composición farmacéuticamente aceptable o composición farmacéutica.

Un portador farmacéuticamente aceptable incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retraso isotónicos y de absorción, y similar que son fisiológicamente compatibles. De manera preferente, el portador es adecuado para administración subcutánea, intravenosa, intramuscular, parenteral, espinal o epidérmica (*por ejemplo*, mediante inyección o infusión), aunque los portadores adecuados para administración por inhalación o intranasal también se contemplan.

El portador farmacéuticamente aceptable en la composición farmacéutica descrito en la presente puede incluir uno o más de un agente amortiguador, un aminoácido, y un

modificador de tonicidad. Cualquier agente amortiguador adecuado o combinación de agentes amortiguadores se puede utilizar en la composición farmacéutica descrita en la presente para mantener o ayudar en mantener un pH apropiado de la composición. Ejemplos no limitantes de agentes amortiguadores incluyen fosfato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, succinato de sodio, histidina, Tris, y acetato de sodio. En algunas modalidades, los agentes amortiguadores pueden estar en una concentración de aproximadamente 5-100 mM, 5-50 mM, 10-50 mM, 15-50 mM, o aproximadamente 15-40 mM. Por ejemplo, el uno o más agentes amortiguadores pueden estar en una concentración de aproximadamente 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM, 25 mM, 26 mM, 27 mM, 28 mM, 29 mM, 30 mM, 31 mM, 32 mM, 33 mM, 35 mM, 36 mM, 37 mM, 38 mM, 39 mM, o aproximadamente 40 mM. En algunos ejemplos, el portador farmacéuticamente aceptable comprende fosfato de sodio y ácido cítrico, que pueden estar en una concentración de aproximadamente 30 mM y aproximadamente 19 mM, respectivamente.

En algunas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable incluye uno o más aminoácidos, que puede disminuir la agregación del anticuerpo e/o incrementar la estabilidad del anticuerpo durante el almacenamiento antes de la administración. Los aminoácidos ejemplares para el uso hacer composiciones farmacéuticas descritas en la presentes incluyen, pero no se limitan a, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, glicina, histidina, lisina, prolina, o serina. En algunos ejemplos, la concentración del aminoácido en la composición farmacéuticamente puede ser aproximadamente 5-100 mM, 10-90 mM, 20-80 mM, 30-70 mM, 40-60 mM, o aproximadamente 45-55 mM. En algunos ejemplos, la concentración del aminoácido (*por ejemplo*, histidina) puede ser aproximadamente 40 mM, 41 mM, 42 mM, 43 mM, 44 mM, 45 mM, 46 mM, 47 mM, 48 mM, 49 mM, 50 mM, 51 mM, 52 mM, 53 mM, 54 mM, 55 mM, 56 mM, 57 mM, 58 mM, 59 mM, o aproximadamente 60 mM. En un ejemplo, la composición farmacéutica contiene histidina en una concentración de aproximadamente 50 mM.

Cualquier modificador de tonicidad adecuado se puede utilizar para preparar las composiciones farmacéuticas descritas en la presente. En algunas modalidades, el modificador de tonicidad es una sal o un aminoácido. Los ejemplos de sales adecuadas incluyen, sin limitación, cloruro de sodio, succinato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio. En algunas modalidades, el modificador de tonicidad en la composición farmacéutica puede estar en la concentración de aproximadamente 10-150 mM, 50-150 mM, 50-100 mM, 75-100 mM, o aproximadamente 85-95 mM. En algunas modalidades, el modificador de tonicidad puede estar en una concentración de aproximadamente 80 mM, 81 mM, 82 mM, 83 mM, 84 mM, 85 mM, 86 mM, 87 mM, 88 mM, 89 mM, 90 mM, 91 mM, 92 mM, 93 mM, 94 mM, 95 mM, 96 mM, 97 mM, 98 mM, 99 mM, o aproximadamente 100 mM. En un ejemplo, el modificador de

tonicidad puede ser cloruro de sodio, que puede estar en una concentración de aproximadamente 90 mM.

El portador farmacéuticamente aceptable en las composiciones farmacéuticas descritas en la presente puede comprender además uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En general, los recipientes farmacéuticamente aceptables son sustancias farmacológicamente inactivas. Los ejemplos no limitantes de excipientes incluyen lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa, albúmina de suero bovino (BSA), dextrano, acetato de polivinilo (PVA), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenimina (PEI), gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), polietilenglicol (PEG), etilenglicol, glicerol, sulfóxido de dimetilo (DMSO), dimetilformamida (DMF), monolaurato de polioxietilen sorbitán (Tween-20), monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween-80), dodecil sulfato de sodio (SDS), polisorbato, copolímero de polioxietileno, fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaína, iones de zinc, iones de cobre, iones de calcio, iones de manganeso, iones de magnesio, CHAPS, monolaurato de sacarosa y 2-O-beta-mannoglicerato. En algunas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable comprende un excipiente entre aproximadamente 0.001%-0.1%, 0.001%-0.05%, 0.005-0.1%, 0.005%-0.05%, 0.008%-0.05%, 0.008%-0.03% o aproximadamente 0.009%-0.02%. En algunas modalidades, el excipiente está a aproximadamente 0.005%, 0.006%, 0.007%, 0.008%, 0.009%, 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, o aproximadamente 0.1%. En algunas modalidades, el excipiente es monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween-80). En un ejemplo, el portador farmacéuticamente aceptable contiene 0.01% de Tween-80.

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica descrita en la presente comprende el anticuerpo anti-pKal como también se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930), y uno o más de fosfato de sodio (*por ejemplo*, dihidrato dibásico de fosfato de sodio), ácido cítrico (*por ejemplo*, monohidrato de ácido cítrico), histidina (*por ejemplo*, L-histidina), cloruro de sodio, y Polisorbato 80. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender el anticuerpo, fosfato de sodio, ácido cítrico, histidina, cloruro de sodio, y Polisorbato 80. En algunos ejemplos, el anticuerpo se formula en aproximadamente 30 mM de fosfato de sodio, aproximadamente 19 mM de ácido cítrico, aproximadamente 50 mM de histidina, aproximadamente 90 mM de cloruro de sodio, y aproximadamente 0.01% de Polisorbato 80. La concentración del anticuerpo (*por ejemplo*, DX-2930) en la composición puede ser de aproximadamente 150 mg/mL o 300 mg/mL. En un ejemplo, la composición comprende o consiste de aproximadamente 150 mg DX-2930 por 1 mL de solución, aproximadamente 30 mM de dihidrato dibásico de fosfato de sodio, aproximadamente 19 mM (*por ejemplo*, 19.6 mM) de monohidrato de ácido cítrico, aproximadamente 50 mM de L-histidina, aproximadamente 90 mM de cloruro de sodio, y aproximadamente 0.01% de Polisorbato 80.

En otro ejemplo, la composición comprende o consiste de aproximadamente 300 mg DX-2930 per 1 mL de solución, aproximadamente 30 mM de dihidrato dibásico de fosfato de sodio, aproximadamente 19 mM (*por ejemplo*, 19.6 mM) de monohidrato de ácido cítrico, aproximadamente 50 mM de L-histidina, aproximadamente 90 mM de cloruro de sodio, y aproximadamente 0.01% de Polisorbato 80.

Una sal farmacéuticamente aceptable es una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto y no imparte ningún efecto toxicológico indeseado (ver, *por ejemplo*, Berge, S.M., y colaboradores, 1977, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Ejemplos de estas sales incluyen sales de adición ácidas y sales de adición base. Las sales de adición ácidas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tal como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, y yodhídrico, fosforoso, y similar, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tal como ácidos mono y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, y similar. Las sales de adición base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tal como sodio, potasio, magnesio, calcio, y similar, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tal como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina, y similar.

Las composiciones pueden estar en una variedad de formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tal como soluciones líquidas (*por ejemplo*, soluciones inyectables e infundibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, pastillas, polvos, liposomas y supositorios. La forma puede depender del modo propuesto de administración y aplicación terapéutica. Muchas composiciones están en la forma de soluciones inyectables o infundibles, tal como composiciones similares a aquellas utilizadas para la administración de humanos con anticuerpos. Un modo ejemplar de administración es parenteral (*por ejemplo*, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En una modalidad, la proteína de enlace a calicreína plasmática se administra por infusión o inyección intravenosa. En otra modalidad, la proteína de enlace a calicreína plasmática se administra por inyección intramuscular. En otra modalidad, la proteína de enlace a calicreína plasmática se administra por inyección subcutánea. En otra modalidad preferida, la proteína de enlace a calicreína plasmática se administra por inyección intraperitoneal.

Las frases "administración parenteral" y "administrada parenteralmente" como se utiliza en la presente significa modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. En algunas modalidades, el anticuerpo se administra subcutáneamente.

La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración de fármaco. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar la proteína de enlace en la cantidad requerida en un solvente apropiado con una o una combinación de ingredientes enumerados en lo anterior, como sea requerido, seguido por esterilización filtrada. En general, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básica y los requeridos de otros ingredientes de aquellos enumerados en lo anterior. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secados por vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución filtrada previamente estéril del mismo. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de agentes tensoactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo al inducir en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede administrar por una variedad de métodos, incluyendo inyección intravenosa, inyección subcutánea, o infusión. Por ejemplo, para algunas aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo se puede administrar por infusión intravenosa en una velocidad de menor que 30, 20, 10, 5, o 1 mg/min para alcanzar una dosis de aproximadamente 1 a 100 mg/m² o 7 a 25 mg/m². La vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas modalidades, el compuesto activo se puede preparar con un portador que protegerá el compuesto contra la liberación rápida, tal como formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, y sistemas de suministro microencapsulados, se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de estas formulaciones son disponibles. Ver, *por ejemplo*, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., 1978, Marcel Dekker, Inc., New York.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos. Por ejemplo, en una modalidad, una composición farmacéutica descrita en la presente se puede administrar con un dispositivo, *por ejemplo*, un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, una bomba o implante.

En ciertas modalidades, un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos componentes sumamente hidrofílicos. Para

asegurar que los compuestos terapéuticos descritos en la presente crucen la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos para fabricar liposomas, ver, *por ejemplo*, Patentes de E.U.A. Nos. 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan selectivamente en

5 células específicas u órganos, mejorando de esta manera el suministro de fármaco objetivo (ver, *por ejemplo*, V.V. Ranade, 1989, *J. Clin. Pharmacol.* 29:685).

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (*por ejemplo*, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo individual, varias dosis divididas, se pueden administrar a través del tiempo o la dosis se

10 puede reducir o incrementar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de la dosificación. La forma única de dosificación como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se tratan; cada unidad

15 contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación se puede dictar por y directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se logra, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para formación en compuesto activo para

20 el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Un intervalo no limitante, ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) es de aproximadamente 150 mg o 300 mg. Como será entendido por uno de experiencia ordinaria en la técnica, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo puede ser

25 menor para un sujeto pediátrico que para un sujeto adulto. En algunas modalidades, la cantidad efectiva que se administra a un sujeto pediátrico es una dosis fija o una dosis basada en peso. En algunas modalidades, la cantidad efectiva que es menor que aproximadamente 150 mg o 300 mg se administra a un sujeto pediátrico. En algunas modalidades, una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo se administra cada dos semanas o

30 cada cuatro semanas para un primer período de tratamiento. En algunas modalidades, el anticuerpo se puede administrar al sujeto para un segundo período de tratamiento. En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo en el primer período de tratamiento es diferente que la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo en el segundo período de tratamiento. En algunas modalidades, la cantidad

35 terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo en el primer período de tratamiento es 150 mg y la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo en el segundo período de tratamiento es 300 mg. En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o

profilácticamente efectiva del anticuerpo en el primer período de tratamiento es el mismo como la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo en el segundo período de tratamiento. En un ejemplo, la cantidad terapéutica o profilácticamente del anticuerpo en el primer período de tratamiento y el segundo período de tratamiento es 300 mg.

- 5 En algunas modalidades, un intervalo no limitante, ejemplar para una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) es aproximadamente 300 mg. En algunas modalidades, una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva de un anticuerpo se administra en una dosis individual. Si el sujeto experimenta un ataque de HAE, el anticuerpo se puede administrar adicionalmente
10 al sujeto en varias dosis, tal como en las dosis de aproximadamente 300 mg administradas cada dos semanas.

Kits

- Un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede proporcionar en un kit, *por ejemplo*, como un componente de un kit. Por ejemplo, el kit incluye (a) un
15 anticuerpo DX-2930, *por ejemplo*, una composición (*por ejemplo*, una composición farmacéutica) que incluye el anticuerpo, y, opcionalmente (b) material de información. El material de información puede ser descriptivo, de instrucción, de comercialización u otro material que se refiera a un método descrito en la presente y/o el uso de un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930), *por ejemplo*, para un método descrito en la
20 presente. En algunas modalidades, el kit comprende una o más dosis de DX-2930. En algunas modalidades, la una o más dosis son 150 mg o 300 mg.

- El material de información del kit no se limita en su forma. En una modalidad, el material de información puede incluir información acerca de la producción del compuesto, peso molecular del compuesto, concentración, fecha de expiración, información del lote o sitio
25 de producción, y así sucesivamente. En una modalidad, el material de información se refiere a utilizar el anticuerpo para tratar, prevenir, o la diagnosis de trastornos y afecciones, *por ejemplo*, una enfermedad o afección asociada a calicreína plasmática.

- En una modalidad, el material de información puede incluir instrucciones para administrar un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) en una
30 manera adecuada para llevar a cabo los métodos descritos en la presente, por ejemplo, en la dosis adecuada, forma de dosificación, modo de administración o programa de dosificación (*por ejemplo*, una dosis, forma de dosificación, programa de dosificación o modo de administración descritos en la presente). En otra modalidad, el material de información puede incluir instrucciones para administrar un anticuerpo como se describe en la presente (*por
35 ejemplo*, DX-2930) para un sujeto adecuado, *por ejemplo*, un humano, *por ejemplo*, un humano que tiene o está en riesgo de, una enfermedad o afección asociada con calicreína plasmática. Por ejemplo, el material puede incluir instrucciones para administrar un anticuerpo

como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) a un paciente con un trastorno o afección descritos en la presente, *por ejemplo*, una enfermedad asociada con calicreína plasmática, *por ejemplo*, de acuerdo con un programa de dosificación descrito en la presente. El material de información de los kits no se limita en su forma. En muchos casos el material de información, *por ejemplo*, instrucciones, se proporciona en impresión pero también puede estar en otros formatos, tal como un material legible por computadora.

Un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede proporcionar en cualquier forma, *por ejemplo*, forma líquida, seca o liofilizada. Se prefiere que un anticuerpo esté sustancialmente puro y/o estéril. Cuando un anticuerpo se proporciona en una solución líquida, la solución líquida es de manera preferente una solución acuosa, con una solución acuosa estéril que se preferida. Cuando un anticuerpo se proporciona como una forma seca, la reconstitución es en general mediante la adición de un solvente adecuado. El solvente, *por ejemplo*, agua estéril o solución amortiguadora, se puede proporcionar opcionalmente de kit.

El kit puede incluir uno o más contenedores para la composición que contiene un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). En algunas modalidades, el kit contiene contenedores separados, divisores, o compartimientos para la composición y material de información. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringa, y el material de información puede estar contenido en asociación con el contenedor. En otras modalidades, los elementos separados del kit están contenidos con un contenedor no dividido, individual. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial jeringa que se ha unido a la misma el material de información en la forma de una etiqueta. En algunas modalidades, el kit incluye una pluralidad (*por ejemplo*, un paquete) de contenedores individuales, que contiene cada uno una o más formas de dosificación unitarias (por ejemplo, una forma de dosificación descrita en la presente) de un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollitas, paquetes de lámina de aluminio delgada, o paquetes de burbuja, que contiene cada uno una dosis unitaria individual de un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). Los contenedores de los kits pueden ser herméticos, a prueba de agua (por ejemplo, impermeables a los cambios en humedad y evaporación), y/o herméticos a la luz.

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para la administración de la composición, por ejemplo, una jeringa, o cualquiera tal dispositivo de suministro. En una modalidad, el dispositivo es un dispositivo implantable que dispensa dosis medidas del anticuerpo. La descripción también describe un método para proporcionar un kit, por ejemplo, al combinar los componentes descritos en la presente.

Tratamiento

En algunos aspectos, la descripción proporciona el uso de un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) en el tratamiento de HAE.

(i) Angioedema hereditario

El angioedema hereditario (HAE) también es conocido como “edema de Quincke”, deficiencia del inhibidor de esterasa, deficiencia del inhibidor de C1, y edema angioneurótico heredado (HANE). El HAE se caracteriza por ataques recurrentes, no predecibles de hinchamiento subcutáneo o de la submucosa grave (angioedema), que pueda afectar, *por ejemplo*, las extremidades, cara, genitales, tracto gastrointestinal, y vías áreas (Zuraw, 2008). Los síntomas de HAE incluyen, *por ejemplo*, hinchamiento en los brazos, piernas, labios, ojos, lengua y/o garganta; bloqueo de las vías aéreas que puede implicar hinchamiento de la garganta, ronquera súbita y/o causa la muerte por asfixia (Bork y colaboradores, 2012; Bork y colaboradores, 2000). Aproximadamente 50% de todos los pacientes con HAE experimentarán un ataque laríngeo en su tiempo de vida, y no existe forma de predecir que pacientes están en riesgo de un ataque laríngeo (Bork y colaboradores, 2003; Bork y colaboradores, 2006). Los síntomas de HAE también incluyen episodios repetidos de calambres abdominales sin causa obvia; y/o hinchamiento de los intestinos que pueden ser graves y pueden conducir a calambres abdominales, vómito, deshidratación, diarrea, dolor, choque y/o síntomas intestinales que se asemejan a emergencias abdominales que puede conducir a cirugía innecesaria (Zuraw, 2008). El hinchamiento puede durar hasta cinco o más días. Aproximadamente un tercio de los individuos con este HAE desarrollan un sarpullido sin comezón llamado eritema marginatum durante un ataque. La mayoría de pacientes sufren ataques múltiples al año.

El HAE es un trastorno huérfano, la prevalencia exacta del cual es desconocida como una pero las estimaciones actuales varían de 1 por 10,000 a 1 por 150,000 personas, con muchos autores que acuerdan que 1 por 50,000 es probable que sea la estimación más cercana (Bygum, 2009; Goring y colaboradores, 1998; Lei y colaboradores, 2011; Nordenfelt y colaboradores, 2014; Roche y colaboradores, 2005).

La calicreína plasmática desempeña una función crítica en la patogénesis de los ataques de HAE (Davis, 2006; Kaplan y Joseph, 2010). En la fisiología normal, el C1-INH regula la actividad de la calicreína plasmática así como una variedad de otras proteasas, tal como C1r, C1s, factor XIa, y factor XIIa. La calicreína plasmática regula la liberación de la bradiquinina de quinínógeno de peso molecular alto (HMWK). Debido a la deficiencia de C1-INH en HAE, se presenta la actividad de la calicreína plasmática descontrolada y conduce a la generación excesiva de bradiquinina. La bradiquinina es un vasodilatador que se cree que es responsable para los síntomas de HAE característicos de hinchamiento localizado, inflamación, y dolor (Craig y colaboradores, 2012; Zuraw y colaboradores, 2013).

El hinchamiento de las vías aéreas puede ser mortal y provoca muerte en algunos

pacientes. Las tasas de mortalidad se estiman en 15-33%. El HAE conduce a aproximadamente 15,000-30,000 de visitas al departamento de emergencias al año.

El traumatismo o estrés, *por ejemplo*, procedimientos dentales, enfermedad (*por ejemplo*, enfermedades virales tal como resfríos y gripe), menstruación, y cirugía pueden desencadenar un ataque de angioedema. Para prevenir los ataques agudos de HAE, los pacientes pueden intentar evitar estímulos específicos que han provocado previamente los ataques. Sin embargo, en muchos casos, un ataque se presenta si un desencadenador conocido. Típicamente, los síntomas de HAE primero se presentan en la niñez y empeoran durante la pubertad. Un promedio de individuos no tratados tienen un ataque cada 1 a 2 semanas, y la mayoría de episodios duran por aproximadamente 3 a 4 días (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema). La frecuencia y duración de los ataques varían en gran medida entre las personas con angioedema hereditario, aún entre las personas en la misma familia.

Existen tres tipos de HAE, conocidos como los tipos I, II, y III, todos de los cuales se pueden tratar por los métodos descritos en la presente. Se estima que el HAE afecta 1 en 50,000 personas, ese tipo I representa aproximadamente 85 por ciento de casos, el tipo II representa aproximadamente 15 por ciento de casos, y el tipo III es muy raro. El tipo III es la forma más recientemente descrita y se creyó originalmente que se presenta solo en mujeres, pero se han identificado familias con hombres afectados.

El HAE es heredado en un patrón dominante autosomal, tal que una persona afectada puede heredar la mutación de un padre afectado. Nuevas mutaciones en el gen también pueden presentarse, y de esta manera el HAE puede presentarse en personas sin historial del trastorno en su familia. Se estima que 20-25% de casos resultan de una nueva mutación espontánea.

Las mutaciones en el gen SERPING1 provocan angioedema hereditario tipo I y tipo II. El gen SERPING1 proporciona instrucciones para hacer la proteína del inhibidor C1, que es importante para controlar la inflamación. El inhibidor de C1 bloquea la actividad de ciertas proteínas que promueven la inflamación. Las mutaciones que provocan el angioedema hereditario tipo I conducen a niveles reducidos del inhibidor de C1 en la sangre. En contraste, las mutaciones que provocan el tipo II dan por resultado la producción de un inhibidor de C1 que funcionan normalmente. Aproximadamente 85% de pacientes tiene HAE tipo I, caracterizado por producción muy baja de proteína C1-INH funcionalmente normal, mientras que aproximadamente 15% de pacientes restantes tienen HAE tipo II y producen niveles normales o elevados de un C1-INH funcionalmente deteriorado (Zuraw, 2008). Sin los niveles apropiados del inhibidor de C1 funcional, las cantidades excesivas de bradiquinina se generan del quinínógeno de peso molecular alto (HMWK), y se incrementa la fuga vascular mediada por bradiquinina que se enlaza al receptor B2 (B2-R) sobre la superficie de

las células endoteliales (Zuraw, 2008). La bradiquinina promueve la inflamación al incrementar la fuga de fluido a través de las paredes de los vasos sanguíneos en los tejidos corporales. La acumulación excesiva de fluidos en los tejidos corporales provoca los episodios de hinchamiento observados en los individuos con angioedema hereditario tipo I y tipo II.

5 Las mutaciones en el gen F12 se asocian con algunos casos de angioedema hereditario tipo III. El gen F12 proporciona instrucciones para hacer el factor de coagulación XII. Además de desempeñar una función crítica en la coagulación de la sangre (coagulación), el factor XII también es un estimulador importante de inflamación y se implica en la producción de la bradiquinina. Ciertas mutaciones en el gen F12 dan por resultado la producción del
10 factor XII con actividad incrementada. Como resultado, se genera más bradiquinina y las paredes de los vasos sanguíneos se hacen más débiles, lo cual conduce a episodios de hinchamiento. La causa de otros casos de angioedema hereditario tipo III sigue siendo desconocida. Las mutaciones en uno o más genes todavía no identificados pueden ser responsables por el trastorno de estos casos.

15 El HAE puede presentarse similarmente a otras formas de angioedema que resultan de alergias u otras afecciones médicas, pero difiere significativamente en la causa y tratamiento. Cuando el angioedema hereditario se diagnostica de manera errónea como una alergia, se trata más comúnmente con anti-histaminas, esteroides y/o epinefrina, que son típicamente ineficaces en el HAE, aunque la epinefrina puede ser utilizada para reacciones
20 mortales. Las diagnósicos erróneas también han dado por resultado cirugía exploratoria innecesaria para pacientes con hinchamiento abdominal, y en algunos pacientes con HAE el valor abdominal ha sido diagnosticado incorrectamente como psicossomático.

Similar a adultos, los niños con HAE pueden sufrir de ataques recurrentes y debilitantes. Los síntomas pueden presentarse muy temprano en la niñez, y el angioedema de
25 las vías aéreas superiores se ha reportado en los pacientes con HAE tan jóvenes como la edad de 3 (Bork y colaboradores, 2003). En un caso de estudio de 49 pacientes HAE pediátricos, 23 habían sufrido al menos un episodio de angioedema de las vías aéreas por la edad de 18 (Farkas, 2010). Existe una necesidad médica no cumplida importante entre los niños con HAE, especialmente adolescentes, puesto que la enfermedad empeora
30 comúnmente después de la pubertad (Bennett y Craig, 2015; Zuraw, 2008).

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

El tratamiento agudo de los ataques de HAE se proporciona para detener la progresión del edema tan rápido como sea posible. El concentrado de inhibidor de C1 de la sangre
35 donadora, que se administra intravenosamente, es un tratamiento agudo; sin embargo, este tratamiento no está disponible en muchos países. En situaciones de emergencia donde el concentrado de inhibidor C1 no está disponible, se puede utilizar plasma congelado fresco

(FFP) como una alternativa, ya que también contiene el inhibidor C1.

El inhibidor de C1 purificado, derivado de sangre humana, ha sido utilizado en Europa desde 1979. Varios tratamientos con inhibidor de C1 ahora son disponibles en los Estados Unidos y dos productos del inhibidor de C1 están ahora disponibles en Canadá. Berinert P (CSL Behring), que se pasteuriza, fue aprobado por la F.D.A. en 2009 para ataques agudos. Cinryze (ViroPharma), que es nanofiltrado, fue aprobado por la F.D.A. en el 2008 para profilaxis. Rhucin (Pharming) es un inhibidor C1 recombinante bajo desarrollo que no lleva el riesgo de transmisión de enfermedad infecciosa debido a los patógenos desarrollados en la sangre humana.

El tratamiento de un ataque de HAE agudo también puede incluir medicamentos para el alivio del dolor y/o fluidos IV.

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

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

Los tratamientos más nuevos atacan la cascada de contacto. La Ecallantida (KALBITOR^{MR}, DX-88, Dyax) inhibe la calicreína plasmática y ha sido probado en los Estados Unidos, Icatibant (FIRAZYR^{MR}, Shire) inhibe el receptor de bradiquinina B2, y ha sido probada en Europa y los Estados Unidos.

La diagnosis de HAE puede depender, *por ejemplo*, el historial familiar y/o pruebas de sangre. Los descubrimientos de laboratorio asociados con el HAE tipos I, II, y III describen, *por ejemplo*, in Kaplan, A.P., *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(5):918-925. En el HAE tipo I, el nivel del inhibidor de C1 se disminuye, como es el nivel de C4, mientras que el nivel C1q leve es normal. En el HAE tipo 2, el nivel del inhibidor de C1 es normal o incrementado; sin embargo, la función del inhibidor de C1 es anormal. El C4 se disminuye y el nivel de C1q es normal. En el tipo III, los niveles del inhibidor de C1, C4, y C1q todos pueden ser normales.

Los síntomas de HAE se pueden evaluar, *por ejemplo*, utilizando cuestionarios, *por ejemplo*, cuestionarios que son completados por los pacientes, médicos o miembros de la familia. Estos cuestionarios son conocidos en la técnica e incluyen, *por ejemplo*, escalas análogas visuales. Ver, *por ejemplo*, McMillan, C.V. y colaboradores *Patient*. 2012;5(2):113-26. En algunas modalidades, el sujeto tiene HAE tipo I o HAE tipo II. El HAE tipo I o HAE tipo II se puede diagnosticar utilizando cualquier método conocido en la técnica, tal como por el historial clínico consistente con HAE (*por ejemplo*, episodios de hinchamiento subcutáneo o de la mucosa, no pluríticos) o prueba de diagnóstico (*por ejemplo*, prueba de función C1-INH y

evaluación del nivel C4).

(ii) Tratamiento de HAE con anticuerpos anti-PKα

La descripción proporciona métodos para tratar (*por ejemplo*, aminorar, estabilizar, o eliminar uno o más síntomas) de angioedema hereditario (HAE) al administrar un anticuerpo descrito en la presente (*por ejemplo*, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo descrito en la presente) a un sujeto que tiene o se sospecha de tener HAE, *por ejemplo*, de acuerdo con un programa de dosificación descrito en la presente. Se proporcionan adicionalmente métodos para tratar HAE al administrar un anticuerpo descrito en la presente (*por ejemplo*, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo descrito en la presente), *por ejemplo*, de acuerdo con un programa de dosificación descrito en la presente, o en combinación con una segunda terapia, por ejemplo, con otro agente, por ejemplo, descrito en la presente. La descripción también proporciona métodos para prevenir HAE o un síntoma del mismo al administrar un anticuerpo descrito en la presente (*por ejemplo*, una cantidad profilácticamente efectiva de un anticuerpo descrito en la presente) a un sujeto en riesgo de desarrollar HAE (*por ejemplo*, un sujeto que tiene un miembro de la familia con HAE o una predisposición genética al mismo), *por ejemplo*, de acuerdo con un programa de dosificación descrita en la presente. En algunos ejemplos, el sujeto puede ser un paciente humano quien no tiene síntomas de HAE en el momento del tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto es un paciente humano que tiene HAE tipo I o HAE tipo II. En algunas modalidades, el sujeto es un paciente humano que ha experimentado al menos dos (*por ejemplo*, 2, 3, 4, 5 o más) HAE ataques en el año antes del tratamiento.

El tratamiento incluye administrar una cantidad efectiva para aliviar, mejorar, alterar, remediar, reducir, mejorar, o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición hacia el trastorno. El tratamiento también puede retrasar el inicio, *por ejemplo*, prevenir el inicio, prevenir el deterioro de una enfermedad o afección.

Los métodos para administrar los anticuerpos DX-2930 también se describen en "Pharmaceutical Compositions". Las dosificaciones adecuadas del anticuerpo utilizadas pueden depender de la edad y peso del sujeto y el fármaco particular utilizado. El anticuerpo se puede utilizar como agentes competitivos para inhibir, reducir una interacción indeseable, *por ejemplo*, entre la calicreína plasmática y su sustrato (*por ejemplo*, Factor XII o HMWK). La dosis del anticuerpo puede ser la cantidad suficiente para bloquear 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 99%, o 99.9% de la actividad de la calicreína plasmática en el paciente, especialmente en el sitio de la enfermedad. En algunas modalidades, 150 mg o 300 mg del anticuerpo se administra cada dos semanas o cada cuatro semanas. En algunas modalidades, 300 mg del anticuerpo se administra en una sola dosis. Si el sujeto experimenta un taque HAE después de la dosis individual, el anticuerpo se puede administrar en 300 mg cada dos semanas.

En una modalidad, los anticuerpos se utilizan para inhibir una actividad (*por ejemplo*, inhibir al menos una actividad de la calicreína plasmática, *por ejemplo*, reducen el Factor XIIa y/o la producción de bradiquinina) de la calicreína plasmática, *por ejemplo*, *in vivo*. Las proteínas de enlace se pueden utilizar solas o conjugadas con un agente, *por ejemplo*, un fármaco citotóxico, enzimas de citotoxina, o radioisótopo.

Los anticuerpos se pueden utilizar directamente *in vivo* para eliminar las células que expresan antígenos a través de citotoxicidad dependiente de complemento natural (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Los anticuerpos descritos en la presente pueden incluir un dominio efector de enlace de complemento, tal como las porciones Fc de IgG1, -2, o -3 o porciones correspondientes de IgM que enlazan el complemento. En una modalidad, una población de células objetivo se trata *ex vivo* con un anticuerpo descrito en la presente y células efectoras apropiadas. El tratamiento se puede suplementar por la adición del complemento o complemento que contiene suero. Además, la fagocitosis de las células objetivo recubiertas con anticuerpo descritas en la presente se pueden mejorar por el enlace de las proteínas de complemento. En otra modalidad el objetivo, células recubiertas con el anticuerpo que incluye un dominio efector de enlace de complemento se lisan por complemento.

Los métodos para administrar los anticuerpos DX-2930 se describen en "Composiciones Farmacéuticas". Las dosificaciones adecuadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y peso del sujeto y el fármaco particular utilizado. Los anticuerpos se pueden utilizar como agentes competitivos para inhibir o reducir una interacción indeseable, *por ejemplo*, entre un agente natural o patológico y la calicreína plasmática.

La cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo como se describe en la presente, se puede administrar a un sujeto que tiene, se sospecha de tener, o está en riesgo de HAE, tratar de esta manera (*por ejemplo*, mejorar o aliviar un síntoma o característica de una enfermedad, desacelerar, estabilizar y/o detener la progresión de la enfermedad) el trastorno.

El anticuerpo descrito en la presente se puede administrar en una cantidad terapéuticamente efectiva. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo es la cantidad que es efectiva, en la administración de dosis individual o múltiple a un sujeto, en tratar un sujeto, *por ejemplo*, curar, aliviar, mitigar o reducir al menos un síntoma de una enfermedad en un sujeto a un grado más allá que el esperado en ausencia de tal tratamiento.

Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (*por ejemplo*, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un bolo individual se puede administrar, varias dosis divididas se pueden administrar a través del tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. En otros ejemplos, el bolo se puede administrar seguido por varias dosis

a través del tiempo o la dosis se puede reducir proporcionalmente o incrementar como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. En otros ejemplos, una dosis se puede dividir en varias dosis y se administra a través del tiempo. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en la forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y deformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos que se tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

En algunas modalidades, un anticuerpo como se describe en la presente se administra en un régimen de dosificación durante un primer período de tratamiento. En algunas modalidades, el anticuerpo se administra en el primer período de tratamiento en varias dosis. En este período, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo (*por ejemplo*, DX-2930) puede ser de aproximadamente 150 mg o 300 mg y se administra cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas, cada ocho semanas o más tiempo. En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva del anticuerpo (*por ejemplo*, DX-2930) puede ser aproximadamente 150 mg o 300 mg y se administra cada dos semanas o cada cuatro semanas. En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva se administra al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, al menos diez veces, al menos once veces, al menos doce veces, al menos trece veces, o más. En algunas modalidades, el primer período de tratamiento es de 26 semanas. En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva es 150 mg y se administra al sujeto cada cuatro semanas (*por ejemplo*, cada cuatro semanas durante 26 semanas, dando por resultado un suministro de 7 dosis total). En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva es 300 mg y se administra al sujeto cada dos semanas (*por ejemplo*, cada dos semanas durante 26 semanas, dando por resultado el suministro de 13 dosis total).

En un ejemplo, el primer período de tratamiento es de 26 semanas y el anticuerpo se administra en el día 0, día 28, día 56, día 84, día 112, día 140, y día 168. En otro ejemplo, el primer período de tratamiento es de 26 semanas y el anticuerpo se administra en el día 0, día 14, día 28, día 42, día 56, día 70, día 84, día 98, día 112, día 126, día 140, día 154, y día 168. Habría sido entendido por aquellas personas de experiencia en la técnica que el programa de tratamiento listado permite una ventana de ± 4 día (*por ejemplo*, ± 3 días, ± 2 días, o ± 1 día). Por ejemplo, una dosis administrada en el día 10-18 sería abarcada por la dosis del día 14 notada en lo anterior.

En algunas modalidades, una cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva se administra en un régimen de dosificación durante un segundo período de tratamiento después del primer período de tratamiento. En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva es diferente en el primer período de tratamiento y en el segundo

5 período de tratamiento. En algunas modalidades, la cantidad terapéutica o profilácticamente efectiva para el segundo período de tratamiento es aproximadamente 300 mg. Durante este período, el anticuerpo se puede administrar en varias dosis de aproximadamente 300 mg, tal como 300 mg administradas cada dos semanas. En algunas modalidades, en el segundo período de tratamiento, las múltiples dosis del anticuerpo se administran al menos dos veces,

10 al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, al menos diez veces, al menos once veces, al menos doce veces, al menos trece veces. En algunas modalidades, el segundo período de tratamiento es de 26 semanas. En algunas modalidades, el anticuerpo se administra en una dosis de aproximadamente 300 mg cada dos semanas durante 26 semanas

15 (*por ejemplo* dando por resultado el suministro de 13 dosis). En algunas modalidades, la primera dosis individual del segundo período de tratamiento se administra aproximadamente dos semanas después de la última dosis del primer período de tratamiento.

En cualquiera de las modalidades descritas en la presente, el tiempo de la administración del anticuerpo es aproximado y puede incluir los tres días antes y los tres días

20 después del día indicado (*por ejemplo*, la administración cada dos semanas abarca la administración en el día 11, día 12, día 13, día 14, día 15, día 16, o día 17).

En algunas modalidades, un anticuerpo como es describe en la presente se administra en una sola dosis de aproximadamente 300 mg a un sujeto quien se ha sometido a un tratamiento de HAE (un primer tratamiento), tal como un tratamiento de múltiples dosis con el

25 mismo anticuerpo anti-pKal como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). Si un sujeto experimenta un ataque de HAE después de la dosis individual, el sujeto se puede tratar por el anticuerpo para múltiples dosis en aproximadamente 300 mg cada dos semanas para un período adecuado, por ejemplo, 26 semanas. En algunas modalidades, la primera de las múltiples dosis se administra dentro de una semana del ataque de HAE (*por ejemplo*, dentro

30 de 1 día, 2, días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, o 7 días del ataque de HAE). En algunas modalidades, el anticuerpo se administra al menos dos veces, tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, al menos diez veces, al menos once veces, al menos doce veces, al menos trece veces, o más.

35 El tratamiento de HAE previo puede implicar el mismo anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). En algunas modalidades, el tratamiento de HAE previo puede implicar múltiples dosis de DX-2930 cada dos semanas o cada cuatro semanas. En

algunas modalidades, el DX-2930 se administra al sujeto (*por ejemplo*, subcutáneamente) a 150 mg cada dos semanas, a 300 mg cada dos semanas, o a 300 mg cada cuatro semanas. En un ejemplo, el sujeto se administró previamente el anticuerpo cada dos semanas o cuatro semanas durante 26 semanas antes de la administración de la dosis individual del anticuerpo.

- 5 En algunas modalidades, las múltiples dosis del anticuerpo del tratamiento previo se administra sal menos dos veces, tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, al menos diez veces, al menos once veces, al menos doce veces, al menos trece veces. En algunas modalidades, el anticuerpo se administró previamente en el día 0, día 28, día 56, día 84, día 112, día 140, y día 168. En algunas modalidades, la dosis individual de aproximadamente 300 mg del anticuerpo se administra aproximadamente dos semanas después de la última dosis del tratamiento previo. En un ejemplo, la dosis individual del segundo período de tratamiento se administra en el día 182 del primer período de tratamiento.

- 15 En cualquiera de las modalidades descritas en la presente, el tiempo de la administración del anticuerpo es aproximado e incluye los tres días previos a y tres días después del día indicado (*por ejemplo*, la administración cada dos semanas abarca la administración en el día 11, día 12, día 13, día 14, día 15, día 16, o día 17).

- 20 En algunas modalidades, antes de la administración de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente, el sujeto se puede valorar para establecer una tasa de línea base de ataques de HAE. Este período de evaluación puede ser referido como un “período en curso”. En algunas modalidades, la tasa de línea base de ataques de HAE puede cumplir o exceder un número mínimo de ataques de HAE en un período de tiempo dado. En un ejemplo, el sujeto experimenta al menos un ataque de HAE en un período en curso de cuatro semanas antes de la primera administración del anticuerpo. En otro ejemplo, el sujeto experimenta por lo menos dos ataques de HAE en un período en curso de ocho semanas antes de la primera administración del anticuerpo.

- 30 Cualquiera de los sujetos descritos en la presente puede haberse sometido al tratamiento previo de HAE, tal como un tratamiento profiláctico terapéutico de HAE. Los aspectos de la presente descripción también proporcionan métodos para administrar un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) a un sujeto que ha recibido uno o más tratamientos previos para HAE. En algunas modalidades, el tratamiento previo de HAE es un tratamiento que implica un anticuerpo descrito en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). En algunas modalidades, el sujeto se le administró previamente múltiples dosis de DX-2930 cada dos semanas o cada cuatro semanas. En algunas modalidades, el sujeto se le administró previamente DX-2930 a 150 mg cada dos semanas. En algunas modalidades, el sujeto se le administró previamente DX-2930 a 300 mg cada dos semanas. En algunas modalidades, el sujeto se le administró previamente DX-2930 a 300 mg cada

cuatro semanas. En algunas modalidades, las múltiples dosis del anticuerpo del tratamiento previo se administran al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, al menos cinco veces, al menos seis veces, al menos siete veces, al menos ocho veces, al menos nueve veces, al menos diez veces, al menos once veces, al menos doce veces, al menos trece veces.

En algunas modalidades, el sujeto ha recibido uno o más tratamientos previos para HAE, que pueden implicar cualquiera del agente terapéutico para HAE conocido en la técnica. Los agentes anti-HAE ejemplares incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de C1 (*por ejemplo*, Cinryze^{MR}, Berinert^{MR} o Ruconest^{MR}), inhibidores de calicreína plasmática (*por ejemplo*, Kalbitor^{MR}), inhibidores del receptor de bradiquinina (*por ejemplo*, Firazyr^{MR}), andrógenos atenuados (*por ejemplo*, danazol), y anti-fibrinolíticos (*por ejemplo*, ácido traexámico). En algunos ejemplos, un sujeto puede someterse a un período de reducción antes de recibir el tratamiento de anticuerpos anti-pKa1 como se describe en la presente. Un período de reducción se refiere a un período, antes del tratamiento de anticuerpos anti-pKa1, durante el cual un sujeto quien está en un tratamiento anti-HAE (*por ejemplo*, C1-INH, andrógeno oral y/o anti-fibrinolíticos) reducirá gradualmente la dosificación, frecuencia, o ambos del agente anti-HAE tal que el sujeto puede transitar gradualmente del tratamiento de HAE previo al tratamiento de anticuerpos anti-pKa1 como se describe en la presente. En algunas modalidades, la reducción implica un método gradual o escalonado para reducir la dosificación del tratamiento previo y/o la frecuencia con la cual el tratamiento previo se administra. El período de reducción puede durar 2-4 semanas y puede variar basados en los factores de una patente individual. En algunos ejemplos, el tratamiento previo termina antes de que comience el tratamiento de anticuerpos anti-pKa1. En otros ejemplos, el tratamiento previo puede terminar dentro de un marco de tiempo adecuado (*por ejemplo*, 2 semanas, 3 semanas o 4 semanas) después de que el sujeto será administrado la primera dosis del anticuerpo anti-pKa1.

Alternativamente, un sujeto quien está en un tratamiento de HAE previo se puede cambiar al tratamiento de anticuerpos anti-pKa1 como se describe en la presente directamente sin el período de reducción.

En otras modalidades, el sujeto está libre de cualquier tratamiento previo de HAE antes del primer tratamiento, primer período de tratamiento, y/o los tratamientos de dosis individual o múltiples de seguimiento como se describe en la presente (el segundo período de tratamiento). En algunas modalidades, el sujeto está libre de cualquier tratamiento diferente con los anticuerpos descritos en la presente durante el primer período de tratamiento y/o durante el segundo período de tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto está libre de cualquier tratamiento previo de HAE durante al menos dos semanas (*por ejemplo*, al menos dos, tres, cuatro, cinco semanas o más) antes del primer tratamiento o primer período de

tratamiento, durante el primer tratamiento o primer período de tratamiento y/o durante el segundo período de tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto está libre de profilaxis a largo plazo para HAE (*por ejemplo*, inhibidor de C1, andrógenos atenuados, anti-fibrinolíticos) durante al menos dos semanas antes del primer tratamiento o primer período de tratamiento,

5 durante el primer período de tratamiento y/o durante el segundo período de tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto está libre de un tratamiento HAE que implica un inhibidor de la enzima que convierte la angiotensina (ACE) durante al menos cuatro semanas previo al primer tratamiento o primer período de tratamiento, durante el primer período de tratamiento y/o durante el segundo período periodo de tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto está

10 libre de un medicamento que contiene estrógeno durante al menos las cuatro semanas previas al primer tratamiento o primer período de tratamiento, durante el primer período de tratamiento y/o durante el segundo período de tratamiento. En algunas modalidades, el sujeto está libre de andrógenos (*por ejemplo*, estanozolol, danazol, oxandrolona, metiltestosterona, testosterona) durante al menos las dos semanas previas al primer tratamiento o primer

15 período de tratamiento, durante el primer período de tratamiento y/o durante el segundo periodo de tratamiento.

Cualquiera de los métodos descritos en la presente pueden comprender además monitorear al paciente por efectos secundarios (*por ejemplo*, elevación de niveles de creatina fosfatasa) y/o niveles de inhibición de pKa1 por el anticuerpo (*por ejemplo*, concentración en

20 suero o plasma del anticuerpo o el nivel de actividad de pKa1) antes y después del tratamiento o durante el curso del tratamiento. Si se observa uno o más efectos adversos, la dosis del anticuerpo podría ser reducida o el tratamiento podría ser terminado. Si el nivel de inhibición está abajo de un nivel terapéutico mínimo, las dosis adicionales del anticuerpo se pueden administrar al paciente. Los pacientes también se pueden evaluar para la generación del

25 anticuerpo contra el anticuerpo administrado; a la actividad del inhibidor de C1, C4, y/o C1q; la calidad de vida; incidencia de cualquiera de ataques de HAE, calidad de vida relacionada con la salud, ansiedad y/o depresión (*por ejemplo*, Escala de Ansiedad y Depresión Hospitalaria (HADS)), productividad en el trabajo (*por ejemplo*, Cuestionario de Deterioro de la Productividad y Actividad en el Trabajo (WPAI)), preferencia de la administración subcutánea

30 del anticuerpo (*por ejemplo*, D-2930) con respecto a otros inyectables, calidad de vida (*por ejemplo*, calidad de vida de angioedema (AE-QOL), Reporte de la Dimensión de Grupo 5 de EuroQoL).

En algunas modalidades, la concentración en plasma o suero del anticuerpo (*por ejemplo*, DX-2930) se puede medir durante el curso del tratamiento (*por ejemplo*, después de

35 la dosis inicial) para evaluar la eficacia del tratamiento. Si la concentración en plasma o suero del anticuerpo es menor que aproximadamente 80 nM, puede ser necesaria una dosificación de seguimiento, que puede ser la misma o más alta que la dosificación inicial. La

concentración en plasma o suero del anticuerpo se puede medir al determinar el nivel de proteína del anticuerpo en una muestra de plasma o suero obtenida del sujeto, *por ejemplo*, por un ensayo inmune o ensayo MS. La concentración en plasma o suero del anticuerpo también se puede medir al determinar el nivel inhibidor de pKa1 en una muestra de plasma o suero obtenida de un sujeto tratado con el anticuerpo. Estos ensayos pueden incluir el ensayo de sustrato sintético o el ensayo de Western blot para medir el quininógeno escindido como se describe en la presente.

Alternativamente o además, el nivel en plasma o suero de la creatina cinasa y/o uno o más parámetros de coagulación (*por ejemplo*, tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), tiempo de protrombina (TP), eventos de hemorragia) se pueden monitorear durante el curso del tratamiento. Si el nivel en plasma o suero de la creatina cinasa se encuentra que se eleva durante el tratamiento, la dosificación del anticuerpo se puede reducir o el tratamiento se puede terminar. Similarmente, si uno o más parámetros de coagulación se encuentran que son afectados significativamente durante el tratamiento, la dosificación del anticuerpo se puede modificar o el tratamiento se puede terminar.

En algunas modalidades, una dosificación óptima (*por ejemplo*, dosificación profiláctica óptima o dosificación terapéutica óptima) del anticuerpo (*por ejemplo*, DX-2930) se puede determinar como sigue. El anticuerpo se administra a un sujeto en necesidad del tratamiento en una dosis inicial. La concentración en plasma del anticuerpo en el sujeto se mide. Si la concentración en plasma es menor que 80 nM, la dosis del anticuerpo se incrementa en una administración subsecuente. Una dosificación del anticuerpo que mantiene la concentración en plasma del anticuerpo arriba de aproximadamente 80 nM se puede elegir como la dosificación óptima para el sujeto. El nivel de creatina fosfoquinasa del sujeto se puede monitorear durante el curso del tratamiento y la dosificación óptima para ese sujeto se puede ajustar adicionalmente basada en el nivel de creatina fosfoquinasa, *por ejemplo*, la dosificación del anticuerpo se puede reducir si la elevación de la creatina fosfoquinasa se observa durante el tratamiento.

(iii) Terapias de Combinación

El anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede administrar en combinación con una o más de las otras terapias para tratar una enfermedad o afección asociada con la actividad de la calicreína plasmática, *por ejemplo*, una enfermedad o afección descrita en la presente. Por ejemplo, el anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede utilizar terapéutica o profilácticamente (*por ejemplo*, antes, durante o después del curso del tratamiento) con otra calicreína anti-plasmática Fab o IgG (*por ejemplo*, otro Fab o IgG descritos en la presente), otro inhibidor de calicreína plasmática, un inhibidor de péptido, inhibidor de molécula pequeña, o cirugía. Ejemplos de inhibidores de calicreína plasmática que se pueden utilizar en la terapia de combinación con anticuerpos de

enlace a calicreína plasmática descritos en la presente incluyen inhibidores de calicreína plasmática descritos en, *por ejemplo*, WO 95/21601 o WO 2003/103475.

Uno o más inhibidores de calicreína plasmática se pueden utilizar en combinación con un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930). Por ejemplo, la
5 combinación puede dar por resultado una dosis más baja del inhibidor que es necesaria, tal que se reducen los efectos secundarios.

Un anticuerpo como se describe en la presente (*por ejemplo*, DX-2930) se puede administrar en combinación con una o más terapias actuales para tratar HAE. Por ejemplo, el anticuerpo DX-2930 se puede utilizar con un segundo agente terapéutico anti-HAE tal como
10 ecalantido, un inhibidor de C1 esterasa (*por ejemplo*, CINRYZE^{MR}), aprotinina (TRASYLOL^{MR}) y/o un inhibidor del receptor de bradiquinina B2 (*por ejemplo*, icatibant (FIRAZYR^{MR})).

El término “combinación” se refiere al uso de dos o más agentes o terapias para tratar al mismo paciente, en donde el uso o acción de los agentes o terapias se traslapan en tiempo. Los agentes o terapias se pueden administrar al mismo tiempo (*por ejemplo*, como una
15 formulación individual que se administra a un paciente o como dos formulaciones separadas administradas concurrentemente) o secuencialmente en cualquier orden. Las administraciones secuenciales son administraciones que se administran en diferentes tiempos. El tiempo entre administración de un agente y otro agente puede ser minutos, horas, días o semanas. El uso de un anticuerpo de enlace a calicreína plasmática descrito en la presente también se puede
20 utilizar para reducir la dosificación de otra terapia, *por ejemplo*, para reducir los efectos secundarios asociados con otro agente que está siendo administrando. Por consiguiente, una combinación puede incluir administrar un segundo agente en una dosificación de al menos 10, 20, 30, o 50% más bajo que sería utilizado en ausencia del anticuerpo de enlace a calicreína plasmática. En algunas modalidades, a un sujeto se le puede administrar un inhibidor de C1
25 como una dosis IV de carga o dosis SC simultáneamente con la primera dosis de un anticuerpo anti-pKa1 (*por ejemplo*, DX-2930) como se describe en la presente. El sujeto entonces puede continuar con el tratamiento de anticuerpos anti-pKa1 (sin dosis adicionales del inhibidor de C1).

Una terapia de combinación puede incluir administrar un agente que reduzca los
30 efectos secundarios de otras terapias. El agente puede ser un agente que reduzca los efectos secundarios de un tratamiento de la enfermedad asociada con calicreína plasmática.

(iv) Ensayos para evaluar un régimen de tratamiento

También dentro del alcance de la presente descripción están los métodos de ensayo para evaluar la eficacia de cualquiera de los métodos de tratamiento descritos en la presente. En
35 algunas modalidades, la concentración en plasma o suero de uno o más biomarcadores (por ejemplo, HMWK de 2 cadenas) asociados con HAE se pueden medir antes de y/o durante el curso del tratamiento (por ejemplo, después de la dosificación inicial) para evaluar la eficacia

del tratamiento. En algunas modalidades, la concentración en plasma o suero (nivel) de uno o más biomarcadores asociados con HAE obtenidos en un punto en el tiempo después de la administración de una dosificación se compara con la concentración del biomarcador en una muestra obtenida en un punto de tiempo temprano después de la administración de una dosificación o antes de la administración de la dosificación inicial. En algunas modalidades, el biomarcador es 2-HMWK.

El nivel del biomarcador se puede medir al detectar el biomarcador en una muestra de plasma o suero obtenida del sujeto, por ejemplo, mediante un inmunoensayo, tal como ensayo de Western blot o ELISA, utilizando un anticuerpo que detecta específicamente el biomarcador. En algunas modalidades, el nivel de 2-HMWK en la muestra de plasma o suero obtenida del sujeto se evalúa por un inmunoensayo. Los anticuerpos para el uso en los inmunoensayos para la detección de 2-HMWK son conocidos en la técnica y la selección de este anticuerpo para el uso en los métodos descritos en la presente será evidente para una persona de experiencia ordinaria en la técnica.

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, basado en la descripción anterior, utilizar la presente invención a su máxima extensión. Las siguientes modalidades específicas, por lo tanto, se van a considerar como simplemente ilustrativas, y no limitantes del resto de la descripción de cualquier forma en lo absoluto. En todas las publicaciones citadas en la presente se incorporan a manera de referencia para los propósitos o contenidos referidos en la presente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Un estudio doble ciego para evaluar la eficacia y seguridad de DX-2930 utilizado múltiples dosis

Vista General del Estudio

Un ensayo controlado con placebo, doble ciego, aleatorizado, multicentro, fase 3, se describe para evaluar la eficacia y seguridad de DX-2930 en prevenir ataques agudos en pacientes con HAE Tipo I y Tipo II. Este estudio doble ciego puede ser seguido por un período de tratamiento subsecuente. En general, sujetos de 12 años o más con una diagnosis documentada de HAE Tipo I o Tipo II quienes experimentan al menos 1 ataque por 4 semanas durante el período de inclusión son incluidos.

Lavado por Terapia Profiláctica a Largo Plazo (LTP)

Después del consentimiento informado, los sujetos se someten a evaluaciones de clasificación. A los sujetos clasificados quienes están en terapia profiláctica a largo plazo para HAE se les requiere someterse a un período de lavado de 2 semanas mínimo antes del inicio del período de inclusión. El lavado LTP es permitido siempre y cuando el investigador determine que hacerlo no colocaría al sujeto en cualquier riesgo de seguridad indebido y el sujeto es al menos de 18 años de edad. Estos criterios aseguran que el paciente quien debe

permanecer en LTP no debe lavarse para este estudio, pero permite el enrolamiento de pacientes apropiados con enfermedad grave mientras que se minimiza su tiempo libre de LTP. Las directrices del tratamiento actual reconocen dos estándares diferentes de procedimientos de cuidado para tratar HAE, que incluyen LTP y terapia a petición (Cicardi y colaboradores, 2012; Craig y colaboradores, 2012; Zuraw y colaboradores, 2013). Por todo el estudio, los sujetos se les permite tratar ataques de HAE agudos. De esta manera, esos sujetos quienes dejan de tomar LTP a fin de ingresar al estudio y se eligen al azar subsecuentemente para el grupo de placebo aún se manejan sin reducción en su estándar de cuidado. La confirmación de que el sujeto ha completado exitosamente el período de lavado de 2 semanas se requiere antes de que pueda entrar el período de inclusión.

Período de Inclusión

Los sujetos clasificados quienes cuya se han están en la terapia profiláctica a largo plazo para HAE o han completado el período de lavado requerido se someten a un período de inclusión de 4 semanas para determinar la tasa de ataques de HAE de línea base. Solo los sujetos que cumplen una tasa de línea base mínima de al menos 1 ataque de HAE confirmado por 4 semanas son elegibles para el enrolamiento y aleatorización. Los sujetos quienes experimentan 3 o más ataques confirmados antes del final de las 4 semanas pueden salir del período de inclusión antes y proceder al enrolamiento y aleatorización. Los sujetos sin al menos 1 ataque confirmado después de 4 semanas de inclusión tienen un período de inclusión prolongado por otras 4 semanas, durante el cual el tiempo que necesitan para tener al menos 2 ataques confirmados que precedan al enrolamiento y a aleatorización.

Para ser elegibles para el enrolamiento, los sujetos quienes tienen su inclusión prolongada deben completar el período de inclusión de 8 semanas completo antes de entrar al período de tratamiento. Los sujetos quienes no cumplen con la tasa de ataques mínimo durante la inclusión o se determinan de otra manera que son elegibles debido a las evaluaciones de clasificación se consideran un fallo de clasificación y no se les permite volver a clasificarse en el estudio.

Período de Tratamiento

Después de la verificación de la elegibilidad, los sujetos se eligen al azar 2:1 para recibir administraciones subcutáneas repetidas (SC) de DX-2930 o placebo en una forma de doble ciego. Los sujetos quienes se eligen al azar para DX-2930 se asignan en una relación 1:1:1 a uno de tres regímenes de dosis: 300 mg cada 2 semanas, 300 mg cada 4 semanas o 150 mg cada 4 semanas. La aleatorización en todos los grupos de tratamiento se bloquea por los sujetos sin tratamiento previo vs. No de tratamiento previo (sujetos que reciben el fármaco del estudio activo en el protocolo DX-2930-02) así como la tasa de ataques de línea base observada durante el período de inclusión en los siguientes grupos: 1 a > 2 ataques por 4

semanas, 2 a < 3 ataques por 4 semanas y ≥ 3 ataques por 4 semanas.

Cada sujeto se somete a un período de tratamiento que consiste de 13 dosis del Producto Medicinal de Investigación ciego (IMP), por un período de 26 semanas a partir de la fecha de la primera dosis en el Día 0 a través de dos semanas después de la dosis inicial. Los sujetos aleatorizados a uno de los 4 brazos de tratamiento reciben ya sea DX-2930 o dosis de placebo de acuerdo con el programa de dosificación en la Tabla 2.

Tabla 2: Programa de dosificación del período de tratamiento

Periodo de Tratamiento		Brazos de Tratamiento: DX-2930 o Placebo			
Número de Dosis	Día/Semana de la Dosis	300 mg cada 2 semanas	300 mg cada 4 semanas	150 mg cada 4 semanas	Placebo
1	Día 0/Semana 0	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Placebo
2	Día 14/Semana 2	DX-2930	Placebo	Placebo	Placebo
3	Día 28/Semana 4	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Placebo
4	Día 42/Semana 6	DX-2930	Placebo	Placebo	Placebo
5	Día 56/Semana 8	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Placebo
6	Día 70/Semana 10	DX-2930	Placebo	Placebo	Placebo
7	Día 84/Semana 12	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Placebo
8	Día 98/Semana 14	DX-2930	Placebo	Placebo	Placebo
9	Día 112/Semana 16	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Placebo
10	Día 126/Semana 18	DX-2930	Placebo	Placebo	Placebo
11	Día 140/Semana 20	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Placebo
12	Día 154/Semana 22	DX-2930	Placebo	Placebo	Placebo
13	Día 168/Semana 24	DX-2930	DX-2930	DX-2930	Placebo
	Día 182/Semana 26	Sin Dosis	Sin Dosis	Sin Dosis	Sin Dosis

Descripción de los Tratamientos

DX-2930

El DX-2930 es una solución sin conservadores, estéril, para inyección, pH 6.0. El ingrediente activo, DX-2930, se formula utilizando los siguientes componentes no farmacopeícos: dihidrato

5 dibásico de fosfato de sodio 30 mM, monohidrato de ácido cítrico 19.6 mM, L-histidina 50 mM, cloruro de sodio 90 mM, 0.01% del Polisorbato 80. Cada vial contiene una concentración nominal de 150 mg de ingrediente activo DX-2930 en 1 mL de solución. El producto de prueba se administra por inyección subcutánea en el brazo superior en una manera ciega.

Para cada dosis de 300 mg de DX-2930, cada sujeto recibe un total de 2 mL, dividido

10 en 2 inyecciones SC de 1.0 mL separadas de DX-2930. Las 2 inyecciones se administran en el mismo brazo superior, con al menos 2 cm de separación entre cada sitio de inyección. Para cada 150 mg de dosis de DX-2930, cada sujeto recibe un total de 2 mL, dividido en 2 inyecciones subcutáneas de 1.0 mL separadas, donde una inyección es DX-2930 y la otra es placebo. Las 2 inyecciones se administran en el mismo brazo superior, con al menos 2 cm de

15 separación entre cada sitio de inyección.

Placebo

El placebo consiste de la formulación inactiva del producto de prueba: dihidrato dibásico de fosfato de sodio 30 mM, monohidrato de ácido cítrico 19.6 mM, L-histidina 50 mM, cloruro de sodio 90 mM, pH 6.0 con 0.01% de Polisorbato 80. La dosis de placebo se administran a los

20 sujetos elegidos al azar al brazo de tratamiento de placebo y entre dosis de DX-2930 para los sujetos elegidos al azar para 300 mg o 150 mg de DX-2930 cada uno de los brazos de tratamiento de 4 semanas, de acuerdo con el programa de dosificación en la Tabla 1.

Para cada dosis de placebo, cada sujeto recibe un total de 2 mL, dividido en 2 inyecciones subcutáneas de 1.0 mL separadas de placebo. Las 2 inyecciones se administran

25 en el mismo brazo superior, con al menos 2 cm de separación entre cada sitio de inyección.

Período de Seguimiento

Los sujetos se pueden someterse adicionalmente a evaluaciones de seguridad y adicionales (es *decir*, evaluaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas) durante un período de seguimiento de 8 semanas. Los sujetos (o cuidadores) se destruyen para informar al sitio de

30 cualquier ataque de HAE que experimenten después de la visita de seguimiento final.

Reglas de Detención

Si se determina en cualquier momento que un grupo de dosis se debe retirar debido a una señal de seguridad importante, los sujetos no enrolados restantes se pueden volver a elegir en el brazo(s) de dosificación DX-2930 más bajo restante o placebo y continuar con el

35 enrolamiento para el resto del estudio en una forma de doble ciego. Los datos para estos sujetos se utilizan hasta el momento en el cual se decide dejar la dosis en los análisis de eficacia y en su totalidad y en los análisis de seguridad.

La dosificación para cualquier sujeto individual se discontinúa si el sujeto experimenta un efecto adverso grave relacionado con DX-2930 (o un efecto adverso no serio clínicamente significativo, relacionado con DX-2930) que, en la evaluación del investigador, garantiza la interrupción de la dosificación adicional para el bienestar de ese sujeto. El investigador tiene la capacidad de contactar y consultar con el monitor médico de tales asuntos. El sujeto es seguido por toda la terminación de todas las visitas programadas, al menos que se les solicite que interrumpa el estudio. Los sujetos quienes interrumpen la dosificación adicional no serán elegibles para participar en la extensión de etiqueta abierta (OLE).

Población del Estudio

- El estudio enrola hasta 120 sujetos para proporcionar 108 sujetos completados. Los sujetos son de 12 años de edad y más con una diagnosis confirmada de HAE (Tipo I o II) quienes experimentan al menos 1 ataque confirmado por 4 semanas durante el período de inclusión. El estudio fija como objetivo enrolar al menos 5 sujetos quienes son de 12 a 17 años de edad. La diagnosis de HAE se confirma a través del historial clínico documentado consistente con HAE y la prueba de diagnóstico conocido ya sea antes o durante la visita de clasificación.

Criterios de Inclusión del Sujeto

Los pacientes quienes cumplen con los siguientes criterios se someten al tratamiento descrito en la presente:

1. Mujeres y hombres de 12 años de edad o más en el momento de la clasificación.
2. Diagnosis documentada de HAE (Tipo I o II) basado en todo lo siguiente:
 - Historial clínico documentado consistente con HAE (subcutáneo o de la mucosa, episodios de hinchamiento no prolíficos sin urticaria acompañante)
 - Resultados de prueba de diagnóstico obtenidos durante la clasificación que confirman el HAE Tipo I o II: nivel funcional de inhibidor de C1 (C1-INH) < 40% del nivel normal. Los sujetos con nivel de C1-INH funcional de 40-50% del nivel normal se pueden enrolar si también tienen un nivel de C4 abajo del intervalo normal. Los sujetos pueden comenzar a participar en el período de inclusión antes de que estén disponibles estos resultados de diagnóstico. A los sujetos se les puede volver a someter a prueba si los resultados son incongruentes con el historial clínico o se cree que están confundidos por el uso reciente de LTP.
 - Al menos uno de lo siguiente: edad en el inicio reportado de los primeros síntomas de angioedema $\leq$ 30 años, un historial familiar consistente con HAE Tipo I o II, o C1q dentro del intervalo normal.
3. Experimenta en una tasa de línea base de menos 1 ataque de HAE confirmado por el investigador por 4 semanas como es confirmado durante el período de inclusión.
4. Sujetos adultos y cuidadores de los sujetos bajo la edad de 18 están disponibles y

capaces de leer, entender, y firmar una forma de consentimiento informada. Los sujetos de 12 y 17 años de edad, quienes su cuidador proporciona el consentimiento informado, están disponibles y son capaces de leer, entender y firmar una forma del consentimiento.

5 **5.** Hombres y mujeres quienes son fértiles y sexualmente activos deben apegarse a los requisitos de anticoncepción para la duración del estudio como sigue:

10 - Mujeres en edad fértil deben acordar abstenerse o se les recomienda utilizar formas sumamente efectivas de anticoncepción de la clasificación hasta 30 días después de la visita del estudio final. Esto incluye anticonceptivo oral solamente progestina asociadas con la inhibición de ovulación (oral, inyectable o implantable), dispositivo intrauterino (IUD, todos los tipos) o sistemas de liberadores de hormonas intrauterinas (IUS). Una mujer quien su pareja masculina ha tenido una vasectomía llega acordar utilizar una forma adicional de anticoncepción médicamente aceptable. El uso de un condón masculino con o sin espermicida o tapa cervical, diafragma o esponja con espermicida o una combinación (métodos de doble barrera) no se considera sumamente efectivo.

15 - Mujeres no de edad fértil, definido como quirúrgicamente estériles (estado post histerectomía, ooforectomía bilateral, o ligación de las trompas de falopio bilateral) o postmenopáusica durante al menos 12 meses no requieren anticoncepción durante el estudio.

20 - Hombres, incluido hombres quienes son quirúrgicamente estériles (post vasectomía), con parejas femeninas de edad fértil deben acordar abstenerse o también utilizar una forma médicamente aceptable de anticoncepción desde la clasificación hasta 60 días después de la visita del estudio final.

Criterios de Exclusión del Sujeto

Los pacientes que tienen más de uno de los siguientes criterios se pueden excluir del tratamiento descrito en la presente:

25 **1.** Diagnósis concomitante de otra forma de angioedema recurrente, crónico, tal como angioedema adquirida (AAE), HAE con C1-INH normal (también conocido como HAE Tipo III), angioedema idiopático o angioedema recurrente asociado con urticaria.

2. Dosificación con un fármaco en investigación o exposición a un dispositivo en investigación dentro de 4 semanas antes de la clasificación.

30 **3.** Exposición a inhibidores de enzima convertidoras de angiotensina (ACE) o cualquiera del medicamento que contengan estrógenos con absorción sistémica (tal como anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal) dentro de 4 semanas antes de la clasificación.

35 **4.** Exposición a andrógenos (*por ejemplo*, estanozolol, danazol, oxandrolona, metiltestosterona, testosterona) dentro de 2 semanas antes del ingreso al período de inclusión.

5. Uso de terapia profiláctica a largo plazo para HAE (C1-INH, andrógenos atenuados,

o anti-fibrinolíticos) dentro de 2 semanas antes del ingreso al período de inclusión.

6. Uso de profilaxis a corto plazo para HAE dentro de 7 días antes del ingreso al período de inclusión. La profilaxis de corto plazo se define como C1-INH, andrógenos atenuados, o anti-fibrinolíticos utilizados para evitar complicaciones de angioedema de procedimientos médicamente indicados.

7. Cualquiera de las siguientes anormalidades de prueba funcional hepática: alanina aminotransferasa (ALT) > 3x límite superior del normal, o aspartato aminotransferasa (AST) > 3x límite superior del normal, bilirrubina total > 2x límite superior del normal (a menos que la elevación de la bilirrubina sea un resultado de síndrome de Gilbert).

8. Embarazo o lactancia.

9. Los sujetos tienen cualquier afección que pueda ser considerada que comprometen su seguridad o cumplimiento, impiden la condición exitosa del estudio, o interfieren con la interpretación de los resultados (*por ejemplo*, historial de abuso de dependencia de sustancias, enfermedad preexistente significativa u otra comorbilidad mayor que el Investigador considera puede confundir la interpretación de los resultados del estudio).

Puntos Finales Primarios y Secundarios

Los siguientes puntos finales de eficacia primarios y secundarios se evalúan del Día 14 al Día 182:

El punto final primario del estudio es el número de ataques de HAE.

Los puntos finales secundarios incluyen, en el orden de clasificación:

1. Número de ataques de HAE que requieren tratamiento agudo
2. Número de ataques de HAE moderados a graves

Puntos Finales de Eficacia Exploratorios

1. Tiempo al primer ataque después del día 14, es decir, duración que un sujeto está libre de ataques después del día 14 hasta su primer ataque.

2. Número por semana de ataques de HAE de alta morbilidad; un ataque de HAE de alta morbilidad se define como cualquier ataque que tenga al menos una de las siguientes características: grave, da por resultado la hospitalización (excepto hospitalización para observación < 24 horas), hemodinámicamente significativo (presión sanguínea sistólica < 90, requiere hidratación IV, o asociado con síncope o casi síncope) o laríngeo.

Pruebas de Laboratorio Clínicas

Los sujetos implicados en el estudio clínico se someten a una prueba de laboratorio que incluye parámetros de seguridad generales (hematología, coagulación, urinalisis, y química de suero), serología, pruebas de embarazo, ensayo funcional C1-INH, ensayo C4, ensayo C1q, muestras PK, prueba de anticuerpos anti-fármaco plasmáticos, y muestras PD. Todas las pruebas de laboratorio se llevan a cabo utilizando métodos establecidos y validados.

Ejemplo 2: Un estudio de etiqueta abierta para evaluar la eficacia y seguridad de DX-2930

Lista General del Estudio

Un ensayo de extensión, de etiqueta abierta, aleatorizado, multicentro, fase 3 se describe para evaluar la eficacia y seguridad de DX-2930, un producto medicinal de investigación (IMP), prevenir ataques de angioedema agudos en pacientes con HAE Tipo I y Tipo II quienes se han sometido al tratamiento previo de HAE implica DX-2930. Este estudio sigue en general un régimen de tratamiento de HAE previo que implicó múltiples dosis de aproximadamente 150 mg o 300 mg de DX-2930 cada cuatro semanas o 300 mg de DX-2930 cada dos semanas. En general, los sujetos (pacientes de repetición, por ejemplo aquellos quienes han sido tratados con DX-2930 después del régimen descrito en el Ejemplo 1, o pacientes no de repetición, por ejemplo, aquellos quienes nunca han sido tratados con DX-2930) de 12 años de edad y más con una diagnosis documentada de HAE Tipo I o Tipo II, y previo al tratamiento con DX-2930 quienes experimentan al menos 1 ataque por 4 semanas durante un período de inclusión son incluidos.

Los sujetos para este estudio son de 12 años de edad y más con una diagnosis confirmada de HAE (Tipo I o II) quienes experimentan al menos 1 ataque confirmado por 4 semanas antes del tratamiento de HAE previo que implica el DX-2930. La diagnosis de HAE se confirma a través del historial clínico documentado consistente de HAE y la prueba de diagnóstico conocida ya sea antes o durante la visita de clasificación.

Período del Tratamiento

(i) Sujetos de Repetición

Cada sujeto de repetición (*por ejemplo*, pacientes humanos quienes han sido tratados con DX-2930 después de los regímenes del tratamiento descritos en la presente, *por ejemplo*, en el Ejemplo 1 anterior) recibe una dosis de etiqueta abierta individual de 300 mg de DX-2930 administrada subcutáneamente (SC) en el Día 0. Los sujetos no recibirán ninguna dosis de DX-2930 adicional hasta su primer ataque de HAE, confirmado por el investigador y reportado. La duración de tiempo entre la primera dosis de etiqueta abierta y el primer ataque de HAE reportado varía por el sujeto de repetición. Hasta que un sujeto de repetición reporte su primer ataque de HAE, sus visitas de estudio programadas donde las siguientes pruebas y evaluaciones se llevan a cabo deben ser: pruebas de embarazo, prueba de laboratorio clínico, examen físico, ECG de 12 Derivaciones, QoL, PK, PD y recolección de muestras de anticuerpos anti-fármaco.

Una vez que el sujeto de repetición reporta su primer ataque de HAE, el sujeto se presenta al sitio de investigación para la segunda dosis de etiqueta abierta de DX-2930 tan rápido como el sujeto y los programas de sitio lo permitan. En la visita en la cual la segunda dosis de etiqueta abierta de DX-2930 se administra, el sujeto se somete a evaluaciones

previas a la dosis de signos vitales, examen físico, prueba de laboratorio clínico, y muestreo de sangre para PK, PD y evaluaciones de anticuerpos anti-fármacos. Los signos vitales se obtienen a 1 hora pos-dosificación.

5 Sin considerar cuando un primer ataque de HAE del sujeto de repetición se presenta, habrá un mínimo de 10 días entre su primera dosis de etiqueta abierta y su segunda dosis de etiqueta abierta. Después de su segunda dosis, los sujetos de repetición continuarán recibiendo administraciones SC repetidas de 300 mg de DX-2930 de etiqueta abierta cada 2 semanas para la duración restante del período de tratamiento por la dosificación programada. El período de tratamiento dura 350 días a partir de la fecha de la primera dosis de etiqueta
10 abierta. El número de dosis administrada durante este período varía por sujeto basado en la fecha de la cada segunda dosis del sujeto, pero no excederá 26 dosis.

(ii) Sujetos No de Repetición

Una vez que todas las evaluaciones de clasificación se han completado y la elegibilidad se ha confirmado, los sujetos no de repetición llegarán al sitio del estudio y, después de las
15 evaluaciones de pre-dosis, recibirán una dosis de etiqueta abierta de 300 mg de DX-2930 administrada SC en el Día 0. Los sujetos no de repetición continúan recibiendo las administraciones SC de 300 mg de DX-2930 de etiqueta abierta cada 2 semanas por toda la duración del período de tratamiento por la dosificación programada. Un total de 26 dosis se administran con la última dosis administrada en la visita del estudio del Día 350.

20 *(iii) Todos los Sujetos:*

Todas las dosis (con excepción de la segunda dosis para los sujetos de repetición) requieren un mínimo de 10 días y un máximo de 18 días entre administraciones, y deben encontrarse dentro de la ventana del día ± 4 resultado alrededor de las visitas del estudio. Si un sujeto experimenta un ataque de angioedema agudo en cualquier momento durante el estudio que
25 en la opinión del investigador requiere intervención médica, el estándar de terapia de cuidado se debe proporcionar basado en el historial médico del sujeto y por la información del producto localmente aprobado.

La administración de DX-2930 y los procedimientos del estudio continúan sin alteración al programa de las actividades del estudio del protocolo, aún si un sujeto recibe
30 tratamiento para un ataque de angioedema generalizado en el día de una dosis programada del fármaco del estudio (si se autoadministra) o en la visita del estudio programada.

(iv) Duración del Tratamiento:

Todos los sujetos reciben DX-2930 de etiqueta abierta durante un período de tratamiento de 350 días. El número de dosis que los sujetos de repetición reciben durante este período varía
35 por sujeto pero no excederá 26 dosis. La última dosis del DX-2930 de etiqueta abierta administrada a estos sujetos se puede administrar en la visita del estudio del Día 350.

Los sujetos no de repetición reciben 300 mg de DX-2930 cada 2 semanas para un total de 26 dosis, con la primera dosis administrada en el Día 0 y la dosis final administrada en la visita del estudio en el Día 350.

Existe una ventana de ± 4 días alrededor de cada visita del estudio. Existe un mínimo de 10 días entre cualquiera de las dos dosis. Excluyendo el intervalo entre la primera y segunda dosis de etiqueta abierta para los sujetos de repetición, existe un máximo de 18 días entre cualquiera de las dos dosis. Los sujetos se monitorean en el sitio del estudio a 1 hora post-dosis para las visitas del sitio del estudio programadas. No se llevan a cabo monitoreo de los signos vitales para los sujetos quienes eligen autoadministrarse lejos del sitio de investigación.

Producto de Prueba; Dosis; y Modo de Administración:

El DX-2930 (DX-2930) es una solución sin conservación, estéril para inyección, pH 6.0. El ingrediente activo, DX-2930, se formula utilizando los siguientes componentes no farmacopéicos: dihidrato dibásico de fosfato de sodio 30 mM, ácido cítrico 19.6 mM (*por ejemplo*, monohidrato de ácido cítrico), histidina 50 mM (*por ejemplo*, L-histidina), cloruro de sodio 90 mM, 0.01% de Polisorbato 80. Cada vial contuvo una concentración nominal de 150 mg del ingrediente activo DX-2930 en 1 mL de solución. El producto de prueba se administra por inyección subcutánea en el brazo superior en una manera ciega.

Para cada 300 mg de dosis de DX-2930, cada sujeto recibió un total de 2 mL, dividido en 2 inyecciones SC de 1.0 mL separadas de DX-2930. Las 2 inyecciones se administraron en el mismo brazo superior, con al menos 2 cm de separación entre cada sitio de inyección.

Para cada 150 mg de dosis de DX-2930, cada sujeto recibió un total de 2 mL, dividido en 2 inyecciones SC de 1.0 mL separadas, donde una inyección fue DX-2930 y la otra placebo. Las 2 inyecciones se administraron en el mismo brazo superior, con al menos 2 cm de separación entre cada sitio de inyección.

El DX-2930 se puede autoadministrarse sin supervisión (supervisión parenteral requerida para el sujeto adolescente) después de que los sujetos reciben entrenamiento apropiado por el investigador o el diseñador y entendimiento se confirma. Los sujetos les permiten iniciar la autoadministración después de recibir las primeras 2 dosis de DX-2930 en el sitio del estudio y pueden continuar autoadministrarse todas las dosis subsecuentes. Ver también las descripciones en la presente.

Período de Seguimiento

Los sujetos se someten a evaluaciones de seguridad y adicionales (*es decir*, evaluaciones farmacocinéticas y farmacodinámicas) durante un período de seguimiento de 8 semanas. Los sujetos (o cuidadores) se les instruye informar al sitio de cualquier ataque de HAE que experimenten después de la visita de seguimiento final.

Reglas de Detención

Si se determina en cualquier momento que la dosis tiene una señal de seguridad importante, cualquiera de las dosis de DX-2930 se puede reducir. La dosificación para cualquier sujeto individual se interrumpe si el sujeto experimenta un efecto adverso grave relacionado con DX-2930 (o un efecto adverso no serio clínicamente significativo, relacionado con DX-2930) que garantice la interrupción de la dosificación adicional para el bienestar del sujeto.

Criterios de Inclusión del Sujeto

Los pacientes quienes cumplen con los siguientes criterios se someten al tratamiento descrito en la presente:

- 10 1. Hombres y mujeres de 12 años o más en el momento de la clasificación.
2. Diagnóstico documentada de HAE (Tipo I o II) basado en todo lo siguiente:
 - Historial clínico documentado consistente con HAE (subcutánea o de la mucosa, episodios de hinchamiento no pruríticos sin urticaria acompañante)
 - Resultados de prueba de diagnóstico obtenidos durante la clasificación que
 - 15 confirman el HAE Tipo I o II: nivel funcional del inhibidor de C1 (C1-INH) < 40% del nivel normal. Los sujetos con el nivel de C1-INH funcional de 40-50% del nivel normal se pueden enrolar si también tienen un nivel C4 abajo del intervalo normal. Los sujetos pueden comenzar a participar en el período de inclusión antes de que estos resultados de diagnóstico estén disponibles. Los sujetos se les puede volver a someter a prueba si los resultados son
 - 20 incongruentes con el historial clínico o se cree que están confundidos por el uso reciente de LTP.
 - Al menos uno de lo siguiente: edad en el inicio reportado de los primeros síntomas de angioedema $\leq$ 30 años, un historial familiar consistente con HAE Tipo I o II, o C1q dentro del intervalo normal
- 25 3. Que experimente una tasa de línea base de al menos 1 ataque de HAE confirmado por el Investigador por 4 semanas o confirmado durante el período de inclusión.
4. Sujetos adultos y cuidadores de los sujetos bajo la edad de 18 que estén disponibles y sean capaces de leer, entender, y firmar una forma de consentimiento informada. Los sujetos son de 12 y 17, quienes el cuidador proporcionan el consentimiento
- 30 informado, que estén dispuestos y sean capaces de leer, entender, y firmar una forma de consentimiento.
5. Hombres y mujeres quienes son fértiles y sexualmente activos deben apegarse a requisitos de anticoncepción por la duración del estudio como sigue:
 - Mujeres en edad fértil deben acordar estar abstinentes o deben haber utilizado una
 - 35 forma sumamente efectiva de anticoncepción de la clasificación a 30 días después de la visita del estudio final. Esto incluyó dosis estables, por 3 meses antes de la clasificación del estudio,

de anticoncepción hormonal que contiene estrógeno y progestina combinados asociados con la inhibición de ovulación (oral, inyectable o implantable), anticoncepción hormonal solo de progestina asociado con inhibición de ovulación, dispositivo intrauterino (IUD, todos los tipos) o sistemas de liberación de hormonas intrauterinas (IUS). Cabe destacar que una mujer quien su pareja hombre ha tenido una vasectomía debe acordar utilizar una forma adicional de anticoncepción médicamente aceptable. También, el uso de un condón masculino con o sin espermicida o tapa cervical, diafragma o esponja con espermicida o una combinación (métodos de barrera doble) no se consideraron sumamente eficaces.

- Mujeres de potencial no fértil, definido como quirúrgicamente estériles (estado post histerectomía, ooforectomía bilateral, o ligación de las trompas de Falopio bilaterales) o postmenopáusicas durante al menos 12 meses no requieren anticoncepción durante el estudio.

- Hombres, incluyendo hombres quienes son quirúrgicamente estériles (post vasectomía) con sus parejas femeninas de potencial fértil deben acordar abstenerse o también usar una forma médicamente aceptable de anticoncepción de la clasificación a 60 días después de la visita del estudio final.

Criterios de Exclusión de Sujetos

Los pacientes quienes tienen uno o más de los siguientes criterios se deben excluir del tratamiento descrito en la presente:

1. Diagnóstico concomitante de otra forma de angioedema recurrente, crónico, tal como angioedema adquirido (AAE), HAE con C1-INH normal (también conocido como HAE Tipo III), angioedema idiopático o angioedema recurrente asociado con urticaria.

2. Dosificación con un fármaco de investigación (diferente a DX-2930 u otras terapias de HAE) o exposición a un dispositivo en investigación dentro de 4 semanas antes de la clasificación.

3. Exposición a inhibidores de la enzima que convierte la angiotensina (ACE) o cualquiera de medicamentos que contengan estrógenos con absorción sistémica (tal como anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal) dentro de 4 semanas antes de la clasificación.

4. Cualquiera de las siguientes anomalías de prueba de la función hepática: alanina aminotransferasa (ALT) > 3x límite superior del normal o aspartato aminotransferasa (AST) > 3x límite superior del normal o bilirrubina total > 2x límite superior del normal (a menos que la elevación de bilirrubina sea un resultado del síndrome de Gilbert).

5. Embarazo o lactancia.

6. El sujeto tiene cualquier afección que se pueda considerar que compromete su seguridad o cumplimiento, que impida el conducto exitoso del estudio, o interfiera con la interpretación de los resultados (por ejemplo, historial de abuso de sustancias, enfermedad

preexistente significativa u otra comorbidez mayor que el Investigador considera que puede confundir la interpretación de los resultados del estudio).

Tratamientos Concomitantes Prohibidos

El uso de los siguientes tratamientos no será permitido durante el estudio:

- 5 - Profilaxis a largo plazo (LTP) para HAE (*por ejemplo*, uso de C1-INH para profilaxis a largo plazo, andrógenos atenuados, o anti-fibrinolíticos) una vez que el LTP se interrumpe (dentro de 3 semanas después de la primera dosis de DX-2930).
- Inhibidores de enzima que convierte la angiotensina (ACE).
- Medicamentos que contienen estrógenos con absorción sistémica (tal como
- 10 anticonceptivos orales o terapia de reemplazo hormonal).
- Uso de andrógenos (*por ejemplo*, estanozolol, danazol, oxandrolona, metiltestosterona, testosterona) para afecciones médicas relacionadas no con HAE o para HAE después de la interrupción durante las primeras tres semanas.
- Cualquier otro fármaco o dispositivo de investigación.

Pruebas de Laboratorio Clínicas

Los sujetos implicados en el estudio clínico se someterán a prueba de laboratorio incluyendo parámetros de seguridad generales (hematología, coagulación, urinalisis y química de suero), serología, pruebas de embarazo, ensayo funcional C1-INH, ensayo C4, ensayo C1q, muestras PK, muestras PD, y prueba de anticuerpos antifármaco en plasma. Todas las pruebas de

20 laboratorio se llevarán a cabo utilizando los métodos establecidos y validados.

Autoadministración

Todos los sujetos (adolescentes o adultos) quienes se consideran candidatos adecuados (es decir, aquellos con capacidad física y mental de aprendizaje y disponibilidad serán entrenados) se les permitirá auto-administrar el tratamiento. Los sujetos deben haber

25 completado el entrenamiento apropiado por el investigador o diseñador y el entendimiento del entrenamiento se debe confirmar por el investigador o diseñador.

A los sujetos se les permite iniciar la autoadministración después de recibir las primeras 2 dosis de DX-2930 en el sitio del estudio. Una vez iniciado, los sujetos se dejan auto-administrar la dosis subsecuente de DX-2930 en el sitio de investigación (cuando las

30 visitas fueron visitas del programadas) o el hogar del sujeto u otra ubicación acordada (cuando el estudio permitió la dosificación fuera del sitio). Los sujetos adolescentes que se auto-administran el producto de investigación son supervisados por un padre/guardián legal/cuidador. Alternativamente, un padre/guardián legal/cuidador, después de completar el entrenamiento apropiado, se le permite administrar el DX-2930 a un adolescente sin

35 supervisión del personal del sitio del estudio. El personal del sitio llamó a los sujetos después de las autoadministraciones fuera del sitio planeadas para asegurar que la administración se presentó, para recolectar los eventos adversos (AEs), medicamentos concomitantes, y para

asegurar que todos los ataques han sido apropiadamente documentado.

Evaluaciones de eficacia:

Los criterios adicionales para los puntos finales de eficacia incluyeron:

- Tiempo al primer ataque de HAE para los sujetos de repetición (basado en el tiempo en la primera de dosis de estudio de etiqueta abierta hasta el primer ataque de HAE)
- Número de ataques de HAE confirmados por el investigador durante el período de tratamiento
- Número de ataques de HAE confirmados por el investigador que requieren tratamiento agudo durante el período de tratamiento
- Número de ataques de HAE moderados o graves durante el período de tratamiento
- Números de ataques de HAE de alta morbilidad durante el período de tratamiento; un ataque de HAE de alta morbilidad se define como cualquier ataque que tenga al menos una de las siguientes características: grave, de por resultados hospitalización (excepto hospitalización para observación < 24 horas), hemodinámicamente significativo (presión sanguínea sistólica < 90, requiere hidratación IV, o asociado con síncope o cerca del síncope) o laríngeo.
- Medidas adicionales incluidas:
 - Desarrollo de anticuerpos antifármaco
 - Farmacocinética (PK)
 - Efectos farmacodinámicos (PD)
 - Evaluaciones de la Calidad de Vida
 - Reporte de la inyección de DX-2930
 - Autoadministración de DX-2930 y Estudio de Inyección Subcutánea

Ejemplo 3: Evaluación de HMWK después del tratamiento de DX-2930

Los pacientes HAE se eligieron al azar en grupos que reciben el fármaco activo (DX-2930), incluyendo diferentes grupos de dosificación (30 mg, 100 mg, 300 mg y 400 mg) y un grupo que recibe un placebo, y dosis subcutáneas administradas del placebo o DX-2930 (DX-2930). Las muestras de plasma se recolectaron en los puntos de tiempo antes de recibir la dosis ("pre-dosis") y después de la administración en los días 8, 22, 50, 64, 92 y 120.

Las muestras de plasma se sometieron a ensayos de biomarcadores para evaluar la actividad farmacodinámica de DX-2930 en el plasma del paciente. En particular, las muestras se evaluaron para la presencia de HMWK de 2 cadenas en un ensayo utilizando un anticuerpo que se enlaza específicamente al HMWK de 2 cadenas.

Como se muestra en la FIGURA 3, la administración de DX-2930 condujo a una reducción en el nivel de HMWK de 2 cadenas en pacientes que reciben DX-2930, por ejemplo, 300 mg o 400 mg de DX-2930. Los niveles de HMWK de 2 cadenas en estos sujetos se aproximaron a los niveles de HMWK de 2 cadenas detectados en los sujetos sanos a 8 y 22 días después de la administración y aún se redujeron al menos en el día 92 después de la

administración.

Estos resultados indican que la administración con DX-2930 redujo los niveles de HMWK de 2 cadenas (un biomarcador para evaluar la inestabilidad de la calicreína plasmática y el efecto estabilizante de Dx-2930), que se puede detectar por varios meses después de la administración. El HMWK de 2 cadenas también se utiliza como un biomarcador para evaluar la calicreína plasmática.

OTRAS MODALIDADES

Todas las características descritas en esta especificación se pueden combinar en cualquier combinación. Cada característica descrita en esta especificación se puede reemplazar por una característica alternativa para el mismo propósito, equivalente o similar. De esta manera, a menos que se establezca expresamente de otra manera, cada característica descrita es solo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

A partir de la descripción anterior, uno experto en la técnica puede evaluar fácilmente las características esenciales de la presente invención, y sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede hacer varios cambios y modificaciones de la invención para adaptarlo a varios usos y condiciones. De esta manera, otras modalidades también están dentro de las reivindicaciones.

EQUIVALENTES

Aunque se varias modalidades inventivas se han descrito e ilustrado en la presente, aquellos de experiencia ordinaria en la técnica visualizarán fácilmente una variedad de otros medios y/o estructuras para llevar a cabo la función y/u obtener los resultados y/o una o más de las ventajas descritas en la presente, y cada una de estas variaciones y/o modificaciones se consideran que están dentro del alcance de las modalidades inventivas descritas en la presente. De manera más general, aquellos expertos en la técnica apreciarán fácilmente que todos los parámetros, dimensiones, materiales, y configuraciones descritas en la presente se proponen para ser ejemplares y que los parámetros actuales, dimensiones, materiales, y/o configuraciones dependerán de la aplicación o aplicaciones específicas por lo cual las enseñanzas inventivas se utilizan. Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de evaluar utilizando no más de la experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades inventivas específicas descritas en la presente. Por lo tanto, se va a entender que las modalidades anteriores se presentan a manera de ejemplo solamente y que, dentro del alcance de las reivindicaciones equivalentes adjuntas a las mismas, las modalidades inventivas se pueden practicar de otra manera que como se describen específicamente y se reclaman. Las modalidades inventivas de la presente descripción se dirigen a cada característica, sistema, artículo, material, kit, y/o método individual descritos en la presente. Además, cualquier combinación de dos o más estas características, sistemas, artículos, materiales, kits, y/o métodos, si tales características, sistemas, artículos, materiales, kits, y/o

métodos no son mutuamente inconsistentes, se incluye dentro del alcance inventivo de la presente descripción.

Todas las definiciones, como se definen y se utilizan en la presente, se debe entender que controlan sobre definiciones de diccionario, definiciones en los documentos incorporados a manera de referencia, y/o significados ordinarios de los términos definidos.

Los artículos indefinidos “un” y “uno/una”, como se utilizan en la presente en especificación y en las reivindicaciones, a menos que se indique claramente lo contrario, se debe entender que proponen “al menos uno”.

La frase “y/o”, como se utiliza en la presente en la especificación y en las reivindicaciones, se debe entender que proponen “cualquiera o ambos” de los elementos unidos de esta manera, es decir, los elementos que están conjuntamente presentes en algunos casos o disyuntivamente presentes en otros casos. Los múltiples elementos listados con “y/o” se deben considerar en la misma forma, es decir, “uno o más” de los elementos de esta manera unidos. Otros elementos pueden estar emocionalmente presentes diferentes a los elementos identificados específicamente por la cláusula “y/o”, ya sea relacionados o no relacionados a aquellos elementos específicamente identificados. De esta manera, como un ejemplo no limitante, una referencia a “A y/o B”, cuando se utilizan en conjunción con el lenguaje indefinido tal como “que comprenden” puede referirse, en una modalidad, a A solamente (incluyendo opcionalmente elementos diferentes a B); en otra modalidad, a B solamente (opcionalmente incluyendo elementos diferentes a A); en todavía otra modalidad, tanto a A como B (opcionalmente incluyendo otros elementos); etcétera.

Como se utiliza en la presente en especificación y en las reivindicaciones, “o” se debe entender que tiene el mismo significado como “y/o” como se define en lo anterior. Por ejemplo, cuando se separan artículos en una lista, “o” o “y/o” se debe interpretar por ser inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también que incluyen más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos no listado adicionales. Solo los términos indicados claramente lo contrario, tal como “solo uno de” o “exactamente uno de”, o, cuando se utilizan en las reivindicaciones, “que consisten de” se referirán a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término “o” como se utiliza en la presente solo se debe interpretar por indicar alternativas exclusivas (es decir, “uno u otro pero no ambos”) cuando es precedido por términos de exclusividad, tal como “cualquiera”, “uno de”, “solo uno de” o “exactamente uno de”. “Que consiste esencialmente de”, cuando se utilizan en las reivindicaciones, tendrá su significado ordinario como se utiliza en el campo de la ley de patentes.

Como se utiliza en la presente en especificación y en las reivindicaciones, la frase “al menos uno”, con referencia a una lista de uno o más elementos, se debe entender que propone al menos un elemento seleccionado de cualquiera de uno o más de los elementos en

la lista de elementos, pero que incluyen innecesariamente al menos uno de cada uno y cada elemento específicamente listado dentro de la lista de elementos y que no excluye ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos puedan estar opcionalmente presentes diferentes a los elementos identificados específicamente dentro de la lista de elementos a los cuales la frase “al menos uno” se refiera, ya sea relacionado o no relacionado a esos elementos específicamente identificados. De esta manera, un ejemplo no limitante, “al menos uno de A y B” (o, equivalentemente, “al menos uno de A o B”, o, equivalentemente, “al menos uno de A y/o B”) puedan referirse, en una modalidad, a al menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes a B); en otra modalidad, al menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos diferentes a A); en todavía otra modalidad, al menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, A, y al menos uno, opcionalmente incluyendo más de uno, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos); etcétera.

Cabe destacar que, a menos que se indique claramente lo contrario, en cualquiera de los métodos reclamados en la presente que incluyen más de un paso o acto, el orden de los pasos o actos del método no ese limita necesariamente al orden en el cual los pasos o actos del método se citan.

En las reivindicaciones, así como en la especificación anterior, todas las frases transicionales tal como “que comprende”, “que incluye”, “que lleva”, “que tiene”, “que contiene”, “que implica”, “que mantiene”, “compuesto de”, y similar se va a entender que son indefinidos, es decir, que proponen incluir pero no limitado a. Solo las frases transicionales “que consisten de” y “que consisten esencialmente de” deben ser frases transicionales cerradas o semi-cerradas, respectivamente, como es expone en el Manual de Oficina de Patentes de los Estados Unidos del Procedimientos de Examen de Patentes, Sección 2111.03.

30

35