

BIOMARCADORES DE METABOLITOS PARA ENFERMEDADES ASOCIADAS CON EL SISTEMA DE ACTIVACIÓN POR CONTACTO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de conformidad con el 35 USC § 119 (e) para las solicitud provisional de los Estados Unidos número 62/518,367, presentada el 12 de junio de 2017 y de la solicitud provisional de los Estados Unidos número 62/395,770, presentada el 16 de septiembre de 2016. Los contenidos totales de cada una de estas solicitudes a las que se hace referencia se incorporan en la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan los métodos y kits para analizar una muestra biológica obtenida de un sujeto que tenga, se sospeche de tener, o que esté en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El sistema de activación por contacto plasmático es un sistema pro-inflamatorio y pro-coagulante que implica un grupo de proteasas plasmáticas. Se activa ya sea mediante el factor XIIa con la exposición a superficies externas o cargadas negativamente o sobre las superficies celulares endoteliales mediante proilcarboxipeptidasas (Sainz I.M. et al., *Thromb. Haemost.* (2007) 98, 77-83). La activación inadecuada o no regulada del sistema por contacto ha estado implicada en diversas enfermedades, entre las que se incluyen el angioedema hereditario (HAE).

El HAE es una enfermedad provocada por ataques episódicos de hinchazón, que pueden afectar múltiples partes del cuerpo tales como la cara, extremidades, genitales, tracto GI y vías respiratorias superiores. Debido a que los síntomas del HAE con frecuencia se asemejan a los síntomas de alergias o cólicos intestinales, los pacientes con HAE con frecuencia son difíciles de identificar hasta que exhiben síntomas graves o mortales. El diagnóstico temprano podría permitir un mejor manejo de situaciones de emergencia que implican ataques agudos por el HAE y también podrían ayudar a manejar a los pacientes con HAE para prevenir o amortiguar los episodios agudos del HAE, por ejemplo, permitir que alguien que padece de HAE evite la exposición a estímulos que podrían activar los episodios del HAE.

Por lo tanto, es de gran interés identificar biomarcadores para el HAE y desarrollar métodos de diagnóstico y pronóstico confiables para identificar a sujetos que tengan ciertos tipos de HAE o que estén en riesgo de padecer un ataque agudo por el HAE. Estos biomarcadores también se podrían beneficiar de los estudios con respecto a los mecanismos

de enfermedad, lo cual podría facilitar el desarrollo de terapias novedosas efectivas para la enfermedad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente descripción se basa en la identificación de biomarcadores de metabolitos
 5 proteínas que estén presentes diferencialmente en muestras biológicas obtenidas de sujetos que tengan enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto, en comparación con individuos sanos o presentes diferencialmente en muestras biológicas obtenidas de sujetos en diferentes etapas de esta enfermedad (por ejemplo, ataque contra calma).

10 Por consiguiente, un aspecto de la presente descripción proporciona los métodos para analizar una muestra que comprende (i) proporcionar una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de suero o una muestras de plasma) obtenida de un sujeto, tal como un sujeto humano, que tenga, se sospeche de tener, o que esté en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto; y (ii) medir el nivel de un conjunto de biomarcadores
 15 de metabolitos, que comprende al menos un biomarcadores de metabolitos seleccionada de la Tabla 1. En algunas modalidades, la enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto es angioedema hereditario (HAE), tal como el HAE tipo 1 o el HAE tipo II. En algunos casos, el conjunto de biomarcadores consiste de 2-10 biomarcadores de metabolitos seleccionados de la Tabla 1.

20 En cualquiera de los métodos descrito en la presente, al menos uno de los metabolitos es serotonina o un metabolito asociado con el metabolismo de serotonina. En algunas modalidades, al menos uno de los biomarcadores de metabolitos es un metabolito asociado con la actividad de amida hidrolasa de ácido graso (por ejemplo, una amida de ácido graso, tal como una amida, oleamida, o linoleamida palmítica). En algunas modalidades, al menos uno
 25 de los biomarcadores de metabolitos es un peróxido lipídico (por ejemplo, ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE), ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE), ácido 9,10-di-hdroxi-12Z-octadecenoico (9,10-DiHOME), ácido 12,13-dihidroxi-9Z-octadecenoico (12,13-DiHOME), o 19,20-dihidroxi-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoico (19,20 DiHDPa)). En algunas modalidades, al menos uno de los biomarcadores de metabolitos es un metabolito
 30 implicado en el metabolismo del azufre (por ejemplo, N-acetilmetionina, metioninsulfona, S-adenosilhomocisteína, cistina, o ácido cisteinsulfínico). En algunas modalidades, al menos uno de los biomarcadores de metabolitos es un metabolito implicado en el metabolismo de esteroides (por ejemplo, sulfato de pregnenolona; 5 alfa-pregnan-3beta,20beta-diol monosulfatado; pregnen-diol disulfatado; pregn esteroide monosulfatado; prenandiol-3-
 35 glucurónido; Cortisol; corticoesterona; cortisona; sulfato de deshidroisoandrosterona (DHEA-S); 3-sulfato de 16a-hidroxi DHEA; sulfato de epiandrosterona; sulfato de androsterona; 4-

androstén-3β, 17β-diol monosulfatado; 4-androstén-3α, 17α-diol monosulfatado; 4-androstén-3β, 17β-diol disulfatado; 5α-androstan-3α, 17α-diol monosulfatado; 5α-androstan-3β, 17β-diol disulfatado; andro esteroide monosulfatado, glucurónido de eticolanolona o sulfato de pregnanolona/aloprenanolona). En algunas modalidades, al menos uno de los biomarcadores de metabolitos es un ácido graso (por ejemplo, eicosapentaenoato (EPA), ácido de aguamiel, o estearidonato). En algunas modalidades, al menos uno de los biomarcadores de metabolitos es un precursor de cofactores (por ejemplo, un precursor de cofactores de la enzima A, tal como nicotinamida o pantotenato).

En algunas modalidades, la medición del nivel de un conjunto de biomarcadores implica espectrometría de masas, cromatografía, o un inmunoensayo. En algunas modalidades, la medición del nivel de un conjunto de biomarcadores implica espectrometría de masas y en donde la muestra biológica se somete a un paso de separación antes de la espectrometría de masa (por ejemplo, cromatografía de gases, cromatografía líquida, o electroforesis capilar).

En algunas modalidades, el método comprende además identificar a un sujeto que tenga una enfermedad asociada con el sistema por contacto, si el nivel del conjunto de biomarcadores del sujeto se desvía del nivel del mismo conjunto de biomarcadores de un sujeto control. En algunas modalidades, el método comprende además administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente terapéutico para tratar la enfermedad, tal como un inhibidor de calicreína en plasma (pKal), un inhibidor del receptor de bradiquinina 2, y/o un inhibidor de la esterasa C1, si se identifica el sujeto tiene la enfermedad. En algunas modalidades, el inhibidor de pKal es un anticuerpo anti-pKal. En algunas modalidades, el agente terapéutico es lanadelumab, escalatida, icatibant o inhibidor de la esterasa C1 derivado de plasma humano.

En algunas modalidades, el sujeto es un paciente humano quien esté en tratamiento para la enfermedad, y en donde el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos, una desviación del conjunto de biomarcadores de metabolitos del nivel del sujeto proveniente de un sujeto control que será indicativo de la eficacia del tratamiento. En algunas modalidades, el método comprende además identificar un tratamiento adecuado para el sujeto con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos. En algunas modalidades, el método comprende además identificar al sujeto como un candidato para el tratamiento de la enfermedad con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos.

En algunas modalidades, el paciente humano tiene un historial de la enfermedad (por ejemplo, HAE). En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores de metabolitos comprende uno o más biomarcadores de metabolitos seleccionados del listado que consiste

de corticosterona, eicosapentaenoato, ácido de aguamiel, estearidonato, nicotinamida, y pantotenato. En algunas modalidades, el método comprende además evaluar el riesgo de un ataque de la enfermedad (por ejemplo, un ataque de HAE) con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos, una desviación en el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos a partir del cual un sujeto control será indicativo del riesgo de ataque de la enfermedad. En algunas modalidades, el método comprende además administrar un agente terapéutico al sujeto, si se identifica que el sujeto está en riesgo de un ataque de la enfermedad.

La presente descripción proporciona biomarcadores con capacidad para identificar a pacientes con enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, el HAE). Medir los niveles de los conjuntos de biomarcadores también puede ser útil en la evaluación y tratamiento de estas enfermedades.

Otro aspecto de la presente descripción proporciona los métodos para identificar a un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto, el método comprende (i) proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto; (ii) medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de metabolitos; y (iii) identificar que el sujeto tiene o está en riesgo de tener la enfermedad si el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolito se desvía del nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos en una muestra control.

Otros aspectos proporcionan los métodos para evaluar el riesgo de ataque de una enfermedad asociados con la activación del sistema de contacto (por ejemplo, un ataque de HAE), el método comprende (i) proporcionar una muestra biológica obtenida del sujeto; (ii) medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de metabolitos; y (iii) identificar al sujeto que esté en riesgo de tener un ataque de la enfermedad si el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolito se desvía del nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos en una muestra control.

En otro aspecto, se proporciona un kit para analizar una muestra de un sujeto que tenga, se sospeche que tenga, o esté en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema por contacto, el kit comprende un primer agente de unión específico para un primer marcador de metabolito seleccionado de la Tabla 1; y un segundo agente de unión específico para un segundo marcador de metabolito seleccionada de la Tabla 1; en donde el primer marcador de metabolito y el segundo marcador de metabolito son diferentes. En algunas modalidades, el kit comprende además al menos un agente de unión de adición por otro marcador de metabolitos seleccionado de la Tabla 1. En algunos ejemplos, el primer agente de unión es un anticuerpo específico para el primer biomarcador de metabolitos y/o el segundo agente de unión es un anticuerpo específico para el segundo biomarcador de metabolitos. En algunas modalidades,

el kit puede comprender además un primer agente para detección que se une al primer agente de unión y un segundo agente para detección que se une al segundo agente de unión. En algunas modalidades, el primer agente de unión y el segundo agente de unión se inmovilizan sobre un miembro de soporte.

- 5 Los detalles de una o más modalidades de la presente descripción se establecen en la siguiente descripción. Otras características y ventajas de la presente descripción serán evidentes a partir de los siguientes dibujos y la descripción detallada de las diversas modalidades, y también a partir de las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 10 Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente descripción, que se pueden comprender mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las modalidades específicas presentadas en la presente.

- La Figura 1 presenta gráficas que muestra los resultados de los análisis de metabolitos
15 obtenidos de sujetos control sanos y pacientes con HAE, ya sea durante un ataque o en estado basal, mediante un análisis *forest* aleatorio. A: los pacientes que tienen HAE en estado basal se separaron de los individuos sanos con el 77.5% de precisión a partir del análisis *forest* aleatorio B: los pacientes que tienen HAE en estado basal se separaron de los pacientes que tienen HAE durante un ataque con el 20% de precisión.

- 20 La Figura 2 presenta gráficas que muestra los niveles de serotonina detectados en muestras de plasma provenientes de pacientes que tienen HAE (tipo I/tipo II) y de voluntarios sanos. A: un diagrama que muestra los niveles de serotonina detectados en muestras de plasma provenientes de pacientes que tengan el HAE (tipo I/tipo II; n=20) en comparación con y voluntarios sanos (n=20). B: un diagrama que muestra los niveles de serotonina detectados
25 en las muestras del plasma provenientes de pacientes con HAE en estado basal (n=20) agrupados con base en el historial de ataques del HAE (menos de 1 vez al mes, 1-2 veces al mes, o más de 2 veces al mes). Los niveles de la serotonina se presentan como un aumento de veces con respecto a los niveles de serotonina en voluntarios sanos (n=20).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 30 El sistema de activación por contacto inicia la vía intrínseca de coagulación y estimula la inflamación a través de la liberación de péptido proinflamatorio bradiquinina. El Factor XII (FXII), también conocido como factor de Hageman, es una serina proteasa que desempeña una función en la activación de las vías intrínsecas de coagulación, así como el sistema de calicreína-quinina. FXII se activa mediante superficies cargadas negativamente (por ejemplo,
35 superficies polianiónicas, vidrio, polifosfato, ácido elágico) para producir la forma activa FXIIa. El FXIIa activado tiene la capacidad para segmentar la pre-calicreína, generando pKal activa.

Posteriormente, la pKal activada es capaz de segmentar el FXII en FXIIa, dando por resultado en un asa de retroalimentación positiva en la cual el FXIIa genera incluso más pKal, que activa además el FXII adicional en FXIIa. La pKal activada también tiene la capacidad para segmentar el quininógeno de alto peso molecular (HMWK) para liberar la bradiquinina. En las enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto, tal como el HAE, los niveles aumentados de bradiquinina pueden inducir la vasodilatación e inflamación que da por resultado en ataques de HAE edematoso. Se desea identificar los biomarcadores novedosos que se puedan utilizar, por ejemplo, para identificar las enfermedades según se median por el sistema de activación por contacto, identificar sujetos que tengan o que estén en riesgo de tener una esta enfermedad.

La presente descripción se basa, al menos en parte, en la identificación de metabolitos que estén presentes diferencialmente en muestras biológicas obtenidas provenientes de sujetos que tengan enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, basal o ataque) en comparación con individuos sanos vía un análisis metabolómico. Se ha observado inesperadamente que los metabolitos que pertenecen a vías o procesos celulares particulares (por ejemplo, los metabolitos implicados en metabolismo del azufre, metabolismo de esteroides, metabolismo de serotonina, asociados con la actividad de la amida hidrolasa de ácido graso) y metabolitos que pertenecen a las familias de metabolitos (por ejemplo, ácidos grasos) tuvieron tendencias similares (por ejemplo, niveles elevados o reducidos) en muestras provenientes de sujetos que tengan la enfermedad en comparación con individuos sanos. Además, se identificaron diversos metabolitos según se presentan diferencialmente en muestras biológicas obtenidas de sujetos durante un ataque de una enfermedad del sistema de activación por contacto en comparación con los sujetos que tienen la enfermedad en estado de calma (basal).

Por consiguiente, en la presente se proporcionan los métodos para analizar muestras biológicas provenientes de sujetos que tengan, se sospeche que tengan, o que estén en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, HAE) al detectar la presencia o al medir el nivel de un conjunto de biomarcadores metabólicos. Estos métodos pueden ser útiles, por ejemplo, para identificar a pacientes que estén en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, HAE), seleccionar un candidato para tratamiento, monitorear el progreso de la enfermedad o el estado de enfermedad, evaluar la eficacia de un tratamiento contra una enfermedad, determinar un curso de tratamiento, evaluar si un sujeto está en riesgo de un ataque de la enfermedad, identificar si una enfermedad o trastorno está asociado con el sistema de activación por contacto, y/o para fines de investigación, incluyendo, por ejemplo, estudiar el mecanismo de una enfermedad y/o las vías/procesos biológicos implicados en la enfermedad,

que pueden depender del desarrollo de terapias novedosas.

Biomarcadores metabólicos del sistema de activación por contacto

Los métodos y kits descritos en la presente se basan, al menos en parte, en la identificación de metabolitos que se encontró estarán diferencialmente presentes en muestras
 5 provenientes de sujetos que tengan HAE en comparación con las muestras provenientes de sujetos sanos, y/o presentes diferencialmente en muestras provenientes de sujetos en diferentes etapas de esta enfermedad (por ejemplo, basal contra ataque) en el sentido como se utiliza en la presente, el término “biomarcador de metabolito” o “conjunto de biomarcadores de metabolitos” se refiere a un metabolito o conjunto de metabolitos que estén presentes a
 10 diferentes niveles en muestras provenientes de diferentes grupos de sujetos, por ejemplo, sujetos que tengan una enfermedad asociada con el sistema por contacto contra sujetos sanos (por ejemplo, sujetos que no tengan la enfermedad), o sujetos que tengan la enfermedad y que estén en un estado de calma contra sujetos bajo el ataque de la enfermedad. Este biomarcador/conjuntos de biomarcadores se pueden utilizar tanto en
 15 aplicaciones de diagnóstico/pronóstico como aplicaciones no clínicas (por ejemplo, para fines de investigación).

En algunas modalidades, un biomarcador de metabolitos puede estar presente a un nivel elevado en muestras provenientes de sujetos que tengan una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, HAE) en comparación con el nivel del
 20 mismo biomarcador de metabolitos en muestras provenientes de sujetos sanos. En algunas modalidades, puede estar presente un biomarcador de metabolitos a un nivel reducido en muestras provenientes de sujetos que tengan una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, HAE) en comparación con el nivel del biomarcador en muestras provenientes de sujetos sanos. Todavía en otros casos, un biomarcador de
 25 metabolitos puede estar presente a un nivel elevado en muestras obtenidas provenientes de sujetos bajo el ataque de una enfermedad como se describe en la presente, en comparación con sujetos durante la calma de la enfermedad. Alternativamente, un biomarcador de metabolitos puede estar presente a un nivel reducido en las muestras obtenidas de sujetos bajo el ataque de una enfermedad como se describe en la presente, en comparación con
 30 sujetos durante la calma de la enfermedad.

En algunas modalidades, un conjunto de biomarcadores de metabolitos que contiene uno o más biomarcadores se pueden analizar en los métodos descritos en la presente. Cuando el conjunto de biomarcadores de metabolitos contenga más de un biomarcador, todos los biomarcadores pueden estar presentes a niveles elevados o niveles reducidos en sujetos
 35 que tengan una enfermedad en comparación con sujetos sanos. Alternativamente, un conjunto de biomarcadores de metabolitos puede contener al menos un biomarcador que sea elevado

en sujetos que tengan la enfermedad en comparación con sujetos sanos y al menos un biomarcador que se reduce en sujetos que tengan la enfermedad, en comparación con sujetos sanos.

Similarmente, un conjunto de biomarcadores de metabolitos para diferenciar sujetos bajo el ataque de una enfermedad provenientes de sujetos en calma de la enfermedad, el conjunto de biomarcadores puede contener múltiples biomarcadores que están todos elevados o reducidos en una primera etapa de la enfermedad (por ejemplo, un ataque) en comparación con una segunda etapa de la enfermedad (por ejemplo, la calma). Alternativamente, el conjunto de biomarcadores puede contener al menos un biomarcador que esté elevado en la primera etapa de la enfermedad en comparación con la segunda etapa de la enfermedad y al menos un biomarcador que esté reducido en la primera etapa de la enfermedad en comparación con la segunda etapa de la enfermedad.

La Tabla 1 más adelante proporciona biomarcadores de metabolitos que se pueden evaluar mediante los métodos descritos en la presente para evaluar a sujetos o muestras biológicas provenientes de sujetos para enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto.

Tabla 1: Biomarcadores de Activación del Sistema por Contacto

Vías de metabolismo	Biomarcador de Metabolitos
Producción de serotonina	Serotonina Triptófano Indolelactato Indolepropionato
Antioxidante	Ascorbato Gamma-/beta-tocoferol
Actividad de la amida hidrolasa de ácido graso	Amida palmítica Oleamida Linoleamida
Biomarcadores de peróxido lipídico	Ácido 9-hidroxi-octadecadienoico (9-HODE) Ácido 13-hidroxi-octadecadienoico (13-HODE) Ácido 9,10-di-hidroxi-12Z-octadecenoico (9,10-DiHOME) Ácido 12,13-dihidroxi-9Z-octadecenoico (12,13-DiHOME) Ácido 19,20-dihidroxi-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-docosapentaenoico (19,20 DiHDPA).

5	Metabolismo de azufre	N-acetilmetionina Metioninsulfona S-adenosilhomocisteína Cisteína Ácido cisteinsulfínico
10	Metabolismo de esteroide	Sulfato de pregnenolona 5 alfa-pregnan-3beta,20beta-diol monosulfatado Pregnen-diol disulfatado; pregn esteroide monosulfatado Prenandiol-3-glucurónido Cortisol Corticosterona* Cortisona Sulfato de dehidroisoandrosterona (DHEA-S) 3-sulfato 16a-hidroxi DHEA Sulfato de epiandrosterona Sulfato de androsterona 4-androsten-3beta, 17beta-diol monosulfatado 4-androsten-3alfa, 17alfa-diol monosulfatado 4-androsten-3beta, 17beta-diol disulfatado 5alfa-androstan-3alfa,17alfa-diol monosulfatado 5alfa-androstan-3beta,17-beta-diol disulfatado Androesteroide monosulfatado Glucurónido de eticolanolona Sulfato de pregnanolona/aloprenanolona
15	Ácidos grasos	Eicosapentaenoato * Ácido de aguamiel * Estearidonato *
20	Precusores de cofactores	Nicotinamida * Pantotenato *
25		
30		

* Indica los metabolitos que se identificaron para estar presentes diferencialmente en las muestras provenientes de pacientes con HAE durante un ataque en comparación con los pacientes con HAE durante la calma.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores que se medirá y analizará en cualquiera de los métodos descritos en la presente incluye al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) metabolitos seleccionados de la Tabla 1.

Como se describe en el Ejemplo 1, se encontró sorprendentemente que diversos metabolitos implicados en diferentes procesos y vías celulares estuvieron presentes diferencialmente en muestras provenientes de sujetos que tengan HAE en comparación con sujetos sanos. Estos datos indican que los metabolitos o las vías de metabolitos mostrados en la Tabla 1 pueden desempeñar una función o están afectados por las enfermedades asociadas con el sistema del contacto.

Los biomarcadores de metabolitos descritos en la presente se pueden caracterizar como “implicados en” o “asociados con” una vía o actividad particular. En el sentido como se utiliza en la presente, los términos “implicado en” o “asociado con” se refiere a un metabolito que contribuye a la vía. Por ejemplo, un metabolito que está implicado o asociado con una vía puede realizar una función dentro de la vía, ser un precursor de otra molécula en una vía, un sustrato para una enzima en una vía) o ser un producto, incluyendo un subproducto o una producción de degradación o una molécula, de una vía. En algunas modalidades, la vía es una vía metabólica, tal una vía biosintética o una vía catabólica. En algunas modalidades, un metabolito se puede describir que como asociado con la actividad de una enzima particular. Por ejemplo, un metabolito asociado con una actividad de una enzima puede ser un sustrato de la enzima, un producto de la actividad de la enzima, o un cofactor, la presencia del mismo regula o estimula la actividad de la enzima. En algunas modalidades, el nivel de un sustrato de una enzima o un producto de una enzima es una indicación del nivel de actividad de la enzima (por ejemplo, durante la enfermedad o un estado particular de la enfermedad).

En el sentido como se utiliza en la presente, el término “precursor,” tal como un precursor de cofactores, se refiere a un metabolito que precede otra molécula (por ejemplo, un producto) en una vía sintética. Por ejemplo, un precursor del cofactores es un metabolito que está en la vía sintética del cofactor y se puede modificar o utilizar de otra forma para producir el cofactor. En el sentido como se utiliza en la presente, el término “cofactor” se refiere a una molécula que interactúa con una enzima, estimulando con esto la actividad de la enzima.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye serotonina o uno o más metabolitos que están implicado en la producción de serotonina, por ejemplo, uno o más metabolito que estén implicados en la producción de serotonina seleccionados de la Tabla 1.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye uno o más metabolitos asociados con una actividad de amida hidrolasa de ácido graso, por ejemplo, uno o más metabolitos que están implicados en la producción de serotonina seleccionados de la Tabla 1. Los metabolitos asociados con la actividad de la amida hidrolasa de ácido graso puede ser cualquier metabolito que esté implicado en una reacción catalizada por la amida hidrolasa de ácido graso. Este metabolito puede ser un sustrato de la enzima, un producto de la enzima, o cualquier intermediario de las mismas.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluyen uno o más metabolito que sean un peróxido lipídico, que se refiere a cualquier producto de la reacción de la peroxidación de lípidos. Los ejemplos incluyen los compuestos de peróxido lipídico listados en la Tabla 1. En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluyen uno o más metabolitos asociados con el metabolismo del azufre, por ejemplo, uno o más metabolitos que estén implicados en el metabolismo del azufre, seleccionados de la Tabla 1.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye uno o más metabolito asociados con el metabolismo de esteroides, por ejemplo, uno o más metabolitos que estén implicados en el metabolismo de esteroides seleccionados de Tabla 1.

También como se describe en el Ejemplo 1, también se encontró que diversos metabolitos estuvieron presentes diferencialmente en muestras provenientes de sujetos que tienen HAE durante un ataque de HAE en comparación con sujetos que tengan HAE durante la calma (basal). En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluyen uno o más metabolitos que sean un ácido graso, por ejemplo, uno o más metabolitos que sean un ácido graso seleccionado de la Tabla 1. En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluyen uno o más metabolito que sean un precursor de cofactores, por ejemplo, uno o más metabolitos que sean un precursor de cofactores seleccionados de la Tabla 1. En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye corticosterona.

Utilidades de los biomarcadores de metabolitos

Un aspecto de la presente descripción se relaciona con métodos para analizar muestras obtenidas a partir de sujetos (por ejemplo, pacientes humanos) que tengan, se sospeche que tienen, o que estén en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto al medir el nivel de un conjunto de biomarcadores como se describe en la presente en la muestra. Los resultados obtenidos a partir de estos métodos de ensayo podrían ser útiles para fines de diagnóstico y/o pronóstico, así como para otros fines no clínicos, tales como fines de investigación.

(i) Análisis de muestras biológicas

Los métodos descritos en la presente implican proporcionar una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto. En el sentido como se utiliza en la presente, una “muestra biológica” se refiere a una composición que comprende tejido, por ejemplo, sangre, plasma, o proteína, proveniente de un sujeto. Una muestra incluye tanto una muestra no procesada inicial proveniente de un sujeto, así como las formas procesadas posteriormente, por ejemplo, purificadas o conservadas parcialmente. Las muestras ilustrativas incluyen sangre, plasma, lágrimas, o moco. En algunas modalidades, la muestra es una muestra de fluido corporal tal como una muestra de suero o plasma. En algunas modalidades, se puede recolectar de un sujeto múltiples (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, o más) muestras biológicas, durante el

tiempo o a intervalos particulares de tiempo, por ejemplo, para evaluar el progreso de la enfermedad o evaluar la eficacia de una tratamiento.

Una muestra biológica se puede obtener a partir de un sujeto utilizando cualesquiera medios conocidos en la técnica. En algunas modalidades, la muestra se obtiene a partir del
5 sujeto al recolectar la muestra (por ejemplo, una muestra de sangre) en un tubo de recolección evacuado (por ejemplo, un tubo de recolección de sangre evacuada). En algunas modalidades, el tubo de recolección evacuado contiene uno o más inhibidores de proteasa, por ejemplo, para reducir o prevenir la activación *ex vivo* del sistema por contacto durante la recolección de muestras. Estos inhibidores de proteasa pueden estar contenidos en una
10 formulación líquida. En algunas modalidades, los inhibidores de proteasa comprenden al menos un inhibidor de serina proteasa y al menos un inhibidor de cisteína proteasa. Estos tubos de recolección evacuada se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud del PCT No. US2016/046681. Opcionalmente, un tubo para recolección de sangre evacuada puede comprender además uno o más anti-coagulantes.

15 Los términos “paciente”, “sujeto” o “individuo” se pueden utilizar indistintamente y hacen referencia a un sujeto que necesite el análisis como se describe en la presente. En algunas modalidades, el sujeto es un ser humano o un mamífero no humano. En algunas modalidades, un sujeto se sospecha que tenga una enfermedad o trastorno o que esté en riesgo de la enfermedad o trastorno asociado con el sistema de activación por contacto (por
20 ejemplo, HAE). Este sujeto puede exhibir uno o más síntomas asociados con la enfermedad. Alternativamente, o además, este sujeto puede portar uno o más factores de riesgo para la enfermedad, por ejemplo, un factor genético asociado con la enfermedad (por ejemplo, un defecto genético en C1-INH).

Alternativamente, el sujeto que necesita el análisis descrito en la presente puede ser
25 un paciente de la enfermedad. Este sujeto puede estar bajo el ataque de la enfermedad actualmente, o puede haber padecido de la enfermedad en el pasado (por ejemplo, durante la calma en la enfermedad actualmente). En algunos ejemplos, el sujeto es un paciente humano que puede estar en un tratamiento de la enfermedad, por ejemplo, un tratamiento que implique un inhibidor de la esterasa C1 (C1-INH), un inhibidor de calicreína en plasma, o un inhibidor de
30 bradiquinina. En otros casos, este paciente humano puede no tener este tratamiento.

Los ejemplos de enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto incluyen, sin limitación, trastornos mediados por calicreína, por ejemplo, un trastorno mediado por bradiquinina, tal como angioedema hereditario (HAE), angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de
35 Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, lesión por isquemia cerebral/reperfusión, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis,

trombosis arterial o venosa, trombosis asociada con dispositivos o endoprotésis de ayuda ventricular, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica, y cardiopatía coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad ocular, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad por estenosis espinal-espinal degenerativa, íleo pos-operatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolismo pulmonar, accidente cerebrovascular, trauma en la cabeza o edema cerebral peri-tumoral, sepsis, caso isquémico (accidente cerebrovascular) agudo de la arteria cerebral media (MCA), restenosis (por ejemplo, después de la angioplastia), nefritis por lupus sistémico eritematoso, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el mal plegado de proteínas, una enfermedad asociada con la angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades alérgicas y respiratorias (por ejemplo, anafilaxis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de distrés respiratorio agudo, fibrosis quística, persistente, rinitis), y lesiones en tejidos (por ejemplo, lesión por quemadura o química).

En algunas modalidades, la enfermedad o condición que está asociada con el sistema de activación por contacto es angioedema hereditario (HAE). El angioedema hereditario (HAE) también se conoce como “edema de Quincke”, deficiencia del inhibidor de la esterasa C1, deficiencia de inhibidor C1, y edema angioneurótico hereditario (HANE). El HAE está caracterizado por episodios recurrentes de hinchazón grave (angioedema), que puede afectar, por ejemplo, las extremidades, cara, genitales, tracto gastrointestinal, y vías respiratorias. Los síntomas del HAE incluyen, por ejemplo, hinchazón en los brazos, piernas, labios, ojos, lengua, y/o garganta; bloqueo de las vías respiratorias que puede implicar hinchazón de la garganta y ronquera súbita; episodios repetidos de espasmos abdominales sin causa evidente; y/o hinchazón de los intestinos, que pueden ser grave y pueden conducir a espasmos abdominales, vómitos, deshidratación, diarrea, dolor y/o choque. Aproximadamente un tercio de individuos con HAE desarrollan una escisión sin picazón denominada eritema marginado durante un ataque.

La hinchazón en las vías respiratorias puede ser mortal y provoca la muerte en algunos pacientes.

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

El trauma o estrés, por ejemplo, los procedimientos dentales, náuseas (por ejemplo, dolencias virales tales como resfriados y la gripe), menstruación, y cirugía pueden activar un ataque de angioedema. Para evitar ataques agudos del HAE, los pacientes pueden intentar evitar estímulos específicos que les hayan provocado anteriormente ataques. Sin embargo, en

muchos casos, un ataque se presenta sin un activador conocido.

Típicamente, los síntomas del HAE primero aparecen en la niñez y empeoran durante la pubertad. En promedio, los individuos no tratados tienen un ataque cada 1 a 2 semanas, y la mayoría de los episodios duran aproximadamente de 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, incluso entre las personas de la misma familia.

Existen tres tipos de HAE, conocidos como los tipos I, II, y III. Se estima que el HAE afecta 1 de 50,000 personas, que tipo I significa aproximadamente el 85 por ciento de los casos, el tipo II significa aproximadamente el 15 por ciento de los casos, y el tipo III es muy raro. El tipo III es la forma discreta más recientemente y se pensó originalmente que se presentaba únicamente en mujeres, aunque se han identificado familias con hombres afectados.

El HAE es hereditario en un patrón dominante autosómico, de tal forma que una persona afectada puede heredar la mutación de un padre afectado. También se pueden presentar nuevas mutaciones en el gen, y de esta forma el HAE también se puede presentar en personas sin historial del trastorno en su familia. Se estima que el 20-25% de los casos resultan de una mutación espontánea novedosa.

Las mutaciones en el gen SERPING1 provocan el edema hereditario tipo I y tipo II. El gen SERPING1 proporciona las instrucciones para producir la proteína inhibidora de C1, que es importante para controlar la inflamación. El inhibidor de C1 bloquea la actividad de ciertas proteínas que estimulan la inflamación. Las mutaciones que provocan el angioedema hereditario tipo I conducen a niveles reducidos del inhibidor de C1 en la sangre. Por el contrario, las mutaciones que provocan el tipo II dan por resultado en la producción de un inhibidor de C1 que funciona anormalmente. Sin los niveles adecuados del inhibidor de C1 funcional, se generan cantidades excesivas de bradiquinina. La bradiquinina estimula la inflamación hasta aumentar la falta 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 hinchazón vistos en individuos con angioedema hereditario tipo I y tipo II.

Las mutaciones en el gen F12 están asociadas con algunos casos de angioedema hereditario tipo III. El gen F12 proporciona las instrucciones para producir el factor de coagulación XII. Además de desempeñar una función decisiva en el coagulante sanguíneo (coagulación), el factor XII también es un estimulador importante de inflamación y está implicado en la producción de bradiquinina. Ciertas mutaciones en el gen F12 da por resultado en la producción del factor XII con actividad aumentada. Como resultado, se genera más bradiquinina y las paredes de los vasos sanguíneos se hacen más débiles, lo cual conduce a

episodios de hinchazón. Sigue siendo desconocida la causa de otros casos de angioedema hereditario tipo III. Las mutaciones en uno o más genes hasta ahora no identificados pueden ser responsables del trastorno en estos casos.

El HAE se puede presentar similarmente para otras formas de angioedema que resulte de alergias u otras condiciones médicas, aunque difiere significativamente en la causa y tratamiento. Cuando el HAE está mal diagnosticado como una alergia, más comúnmente se trata con antihistaminas, esteroides, y/o epinefrina, que típicamente son ineficaces en el HAE, aunque la epinefrina se puede utilizar para reacciones potencialmente mortales. Los malos diagnósticos también han resultado en cirugía de exploración innecesaria para pacientes con hinchazón abdominal, y en algunos pacientes con HAE el dolor abdominal se ha diagnosticado incorrectamente como psicósomático.

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

El tratamiento agudo de ataques por HAE se proporciona para detener el progreso del edema tan rápido como sea posible. El concentrado del inhibidor de C1 proveniente de sangre de un donador, que se administre intravenosamente, es un tratamiento agudo; sin embargo, este tratamiento no está disponible en muchos países. En situaciones de emergencia donde no está disponible el concentrado del inhibidor de C1, se puede utilizar como una alternativa, plasma congelado recién preparado (FFP), ya que también contiene el inhibidor de C1.

El inhibidor de C1 purificado, derivado de sangre humana, se ha utilizado en Europa desde 1979. Actualmente están disponibles en los Estados Unidos diversos tratamientos por el inhibidor de C1 y en Canadá actualmente están disponibles dos productos del inhibidor de C1. Berinert (CSL Behring), que está pasteurizado, se aprobó con la FDA en 2009 para ataques agudos. CINRYZE®, que está nanofiltrado, se aprobó por la FDA en 2008 para profilaxis. Rhucin/Ruconest (pharming) es un inhibidor de C1 recombinante en desarrollo que no porta el riesgo de una transmisión de enfermedades infecciosas debida a patógenos portados en la sangre humana.

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

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

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

Los tratamientos más recientes atacan la cascada por contacto. Escalatida

(KALBITOR®) inhibe la calicreína en plasma y se ha aprobado en los Estados Unidos Icatibant (FIRAZYR®, Shire) inhibe el receptor de bradiquinina B2, y se ha aprobado en Europa y los Estados Unidos.

El diagnóstico del HAE puede depender, por ejemplo, del historial familiar y/o pruebas
5 sanguíneas. Los hallazgos de laboratorio asociados con los HAE tipos I, II, y III se describen, por ejemplo, en Kaplan, A.P., *J Allergy Clin Immunol*, 2010, 126(5):918-925. En el HAE tipo I, se disminuye el nivel del inhibidor de C1, como es el nivel de C4, mientras que el nivel de C1q es normal. En el HAE tipo II, el nivel del inhibidor de C1 es normal se aumenta; sin embargo, la función del inhibidor de C1 es anormal. El nivel de C4 se disminuye y el nivel de C1q es
10 normal. En el tipo III, los niveles del inhibidor C1, C4, y C1q pueden ser todos normales. La presente descripción se basa, al menos en parte, en la identificación de metabolitos que tengan niveles diferenciales en muestras provenientes de pacientes con HAE en comparación con individuos sanos (Tabla 1). En la medición de los niveles de los conjuntos de biomarcadores de estos metabolitos se pueden utilizar para identificar si un sujeto tiene una
15 enfermedad, tal como el HAE. En algunas modalidades, los métodos se pueden utilizar para determinar si un paciente ha tenido o está teniendo un ataque por HAE.

Los ataques del HAE se pueden evaluar, por ejemplo, utilizando cuestionarios, por ejemplo, cuestionarios que se completan por los pacientes, médicos, o miembros de la familia. Estos cuestionarios se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, escalas analógicas
20 visuales. Véase, por ejemplo, McMillan, C.V. et al. *Patient*. 2012; 5(2):113-26.

La muestra biológica descrita en la presente se puede someter a análisis al medir el nivel de un conjunto de biomarcadores como se describe en la presente en la muestra biológica. Los niveles (por ejemplo, la cantidad) de un biomarcador descrito en la presente, o los cambios en los niveles de biomarcadores, se pueden evaluar utilizando los ensayos
25 descritos en la presente y/o los ensayos conocidos en la técnica. Uno o más de los biomarcadores descritos en la presente se pueden analizar utilizando métodos convenciones. En algunas modalidades, el nivel de un biomarcador se evalúa o se mide al detectar directamente el metabolito en una muestra biológica. Alternativamente, o además, el nivel de un metabolito se puede evaluar o medir indirectamente en una muestra biológica, por ejemplo,
30 al detectar el nivel de un agente de unión que se une al metabolito (por ejemplo un anticuerpo en un inmunoensayo) o mediante la detección de una actividad del metabolito.

El tipo de ensayo de detección utilizado para la detección y/o cuantificación de un biomarcador del sistema de activación por contacto tal como aquellos proporcionados en la presente dependerá de la situación particular en la cual se utilizará el ensayo (por ejemplo,
35 aplicaciones clínicas o de investigación), y del tipo y número de biomarcadores que serán seleccionados, y/o el tipo y número de muestras del paciente que se ejecutarán en paralelo,

por nombrar algunos parámetros.

En algunas modalidades, el biomarcador se mide utilizando espectrometría de masas. En general, la espectrometría de masas depende de iones de separación de una molécula con base en la proporción de masa a carga del ion. En algunas modalidades, la espectrometría de masas es una espectrometría de masas en tándem en la cual implica más de un ciclo de la espectrometría de masas. Los niveles de metabolitos se pueden medir al comparar el espectro de masas obtenido de la espectrometría de masas para la muestra con el espectro de masas de otra muestra o una muestra de referencia o control. La identidad de los metabolitos en los espectros se puede determinar al comparar un espectro con una biblioteca de espectros o un espectro de un metabolito conocido. En algunas modalidades, los componentes de la muestra biológica se pueden separar, por ejemplo utilizando métodos cromatográficos como se describe en la presente, antes de detectar el biomarcador de metabolitos. Los ejemplos de métodos de separación incluyen por ejemplo, cromatografía de gases, cromatografía líquida, electroforesis capilar, o movilidad iónica. En algunas modalidades, el biomarcador se mide utilizando cromatografía de líquidos seguida por espectrometría de masas.

En algunas modalidades, el biomarcador se mide utilizando uno de los métodos cromatográficos. La cromatografía permite la separación de moléculas (en una fase móvil) con base en el movimiento de las moléculas a través de un medio (una fase sólida). Los ejemplos de métodos cromatográficos que pueden ser compatibles con los métodos descritos en la presente incluyen, sin limitación, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, cromatografía en fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por exclusión de tamaño, y cromatografía de afinidad.

En algunas modalidades, el biomarcador se mide utilizando inmunoensayo. Los ejemplos de inmunoensayos incluyen, sin limitación ensayos de inmunotransferencia (transferencia Western), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (por ejemplo, ELISA de emparejados), radioinmunoensayos, ensayos de detección basados en electroquimioluminiscencia, inmunoensayos magnéticos, ensayos de flujo lateral, y técnicas relacionadas. Los inmunoensayos adecuados adicionales para detectar un biomarcador proporcionados en la presente serán evidentes para aquellos expertos en la técnica. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que esta descripción no se limita a inmunoensayos, sin embargo, y esos ensayos de detección que dependen de un sustrato cromogénico también pueden ser útiles para la detección y/o cuantificación de los biomarcadores del sistema por contacto como se proporciona en la presente.

Los ELISA se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Crowther, John R (2009). "The ELISA Guidebook." 2ª ed. Humana Press and Lequin R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clin. Chem.* 51 (12): 2415–8) y los ELISA

ilustrativos se describen en la presente. Los kits para realizar los ELISA también se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, kits para ELISA de Life Technologies and BD Biosciences).

En algunas modalidades, se utiliza un inmunoensayo para medir los niveles de los biomarcadores de metabolitos. Los inmunoensayos descritos en la presente pueden estar en el formato de un ELISA de emparejado, en el cual un primer agente de unión que se une específicamente a un metabolito del conjunto de biomarcadores se inmoviliza en un miembro de soporte. El miembro de soporte entonces, se puede incubar con una muestra biológica, como se describe en la presente durante un periodo de tiempo adecuado bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el agente de unión y el metabolito en la muestra. Este complejo entonces se puede detectar utilizando un agente para detección que se une al metabolito, el complejo de agentes de unión-metabolito, o el agente de unión. El agente para detección puede estar conjugado a una marca, que puede liberar una señal directa o indirectamente. La intensidad de la señal representa el nivel del metabolito en la muestra. En algunas modalidades, se detecta el agente para detección y su nivel representa el nivel del metabolito en la muestra.

Cualquier agente de unión que se une específicamente a un metabolito deseado se puede utilizar en los métodos y kits descritos en la presente para medir el nivel de un metabolito en una muestra biológica. En algunas modalidades, el agente de unión es un anticuerpo que se une específicamente a un metabolito deseado. En algunas modalidades, el agente de unión es un anticuerpo aptamérico que se une específicamente a un metabolito deseado. En algunas modalidades, una muestra puede estar en contacto, simultánea o secuencialmente, con más de un agente de unión que se une a diferentes metabolitos (por ejemplo, un análisis multiplexado, por ejemplo el ensayo SOMAScan™ (SOMALogic)). La muestra biológica está en contacto con un agente de unión bajo condiciones adecuadas. En general, el término “contacto” se refiere a una exposición del agente de unión con la muestra biológica o un agente durante un periodo adecuado suficiente para la formación de complejos entre el agente y el metabolito en la muestra, en su caso. En algunas modalidades, el contacto se realiza mediante acción capilar en la cual una muestra biológica o un agente se mueve a través de una superficie de la membrana de soporte.

En algunas modalidades, los inmunoensayos se pueden realizar en plataformas de rendimiento reducido, en particular en formato de inmunoensayo individual. Por ejemplo, se puede utilizar una plataforma de rendimiento reducido, para medir la presencia y cantidad de un metabolito en muestras biológicas (por ejemplo, tejidos biológicos, extractos de tejidos) para métodos de diagnóstico, el monitoreo de una enfermedad y/o el progreso del tratamiento, y/o predecir si una enfermedad o trastorno se pueden beneficiar de un tratamiento particular.

En algunas modalidades, puede ser necesario inmovilizar un agente de unión al miembro de soporte. Los métodos para inmovilizar un agente de unión dependerán de factores tales como la naturaleza del agente de unión y el material de miembro de soporte y pueden requerir tampones particulares. Estos métodos serán evidentes para aquellos con experiencia normal en técnica. Por ejemplo, el conjunto de biomarcadores en una muestra biológica como se describe en la presente se pueden medir utilizando cualquiera de los kits y/o dispositivos para detección que también se describen en la presente.

En algunas modalidades, el biomarcador se mide con un ensayo acoplado a enzimas. Por ejemplo, un biomarcador presente en una muestra biológica se puede utilizar como el sustrato de una reacción enzimática que se puede acoplar a una segunda reacción. Esta reacción da por resultado en la generación de un producto (por ejemplo, un cofactor) que se puede detectar, por ejemplo mediante un cambio en la absorbancia o fluorescencia.

En el sentido como se utiliza en la presente, los términos “medir” o “medición”, o alternativamente “detectar” o “detección”, significa evaluar la presencia, ausencia, cantidad o monto (que puede ser una cantidad efectiva) de una sustancia dentro de una muestra, incluyendo la derivación de los niveles de concentración cualitativa o cuantitativa de estas sustancias, o evaluar de otra manera los valores o categorización de un sujeto.

Los ensayos, por ejemplo, los ensayos de transferencia Western, pueden implicar además el uso de un sistema cuantitativo para formación de imágenes, por ejemplo, la tecnología para formación de imágenes LICOR, que está disponible comercialmente (véase, por ejemplo, el sistema para formación de imágenes infrarrojas Odyssey® CLx de LI-COR Biosciences). En algunas modalidades, se utiliza un ensayo para detección por electroquimioluminiscencia o un ensayo que depende de una combinación de tecnología de arreglo de electroquimioluminiscencia y por patrones (por ejemplo, un ensayo de tecnología ECL o MULTI-ARRAY de Meso Scale Discovery (MSD)).

En cualquiera de los métodos descritos en la presente, el nivel del metabolito de un conjunto de biomarcadores se puede comparar con el nivel del metabolito en una muestra control o una muestra de referencia.

Los métodos y kits descritos en la presente, que implican cualquiera del conjunto de biomarcadores de metabolitos también descritos en la presente, se pueden aplicar para la evaluación de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto, tal como aquellas descritas en la presente.

(ii) Aplicaciones para el diagnóstico y/o pronóstico

Los niveles de metabolitos presentados en la Tabla 1 detectados en las muestras provenientes de sujetos se pueden utilizar como biomarcadores confiables para diagnosticar enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, el HAE),

monitorear el progreso de esta enfermedad, evaluar la eficacia de un tratamiento para la enfermedad, identificar los pacientes adecuados para un tratamiento particular, y/o predecir un ataque de la enfermedad en un sujeto.

Por consiguiente, en la presente se describen los métodos para diagnóstico y
5 pronóstico para una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto con base en el nivel de conjunto de biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un sujeto. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador, según se mide utilizando cualquiera de los métodos descritos en la presente, puede depender de evaluar si un sujeto (por ejemplo un paciente humano) a partir del cual se obtiene la muestra biológica, tenga o esté en riesgo de
10 una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto, tal como una enfermedad asociada con calicreína en plasma, por ejemplo, HAE o una enfermedad autoinmune tal como RA, UC, y la enfermedad de Crohn.

En algunas modalidades, el nivel del biomarcador luego se puede comparar con una muestra de referencia o una muestra control para determinar un valor que indica la cantidad
15 del metabolito en la muestra. En algunas modalidades, un valor para un biomarcador se obtiene al comparar el nivel de un metabolito proteína en una muestra con el nivel de otro metabolito (por ejemplo, un control interno o un estándar interno) en la muestra. Este valor del biomarcador puede ser un valor normalizado con respecto al control interno o el estándar interno. El valor del biomarcador se puede comparar con un valor de referencia para
20 determinar si el sujeto tiene o está en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema por contacto. El valor de referencia puede representar el nivel del biomarcador correspondiente en los sujetos (por ejemplo, sujetos humanos) libres de la enfermedad blanco. En algunas modalidades, si el nivel o valor del biomarcador es mayor que un nivel o valor de referencia, se puede identificar que el sujeto tiene o está en riesgo de una enfermedad asociada con el
25 sistema de activación por contacto. En algunas modalidades, si el nivel o valor del biomarcador es menor que un nivel o valor de referencia, se puede identificar que el sujeto tiene o está en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto.

En algunas modalidades, el nivel del biomarcador se puede comparar con un umbral predeterminado para el metabolito, una desviación a partir de la cual se pueda indicar que el
30 sujeto tiene una enfermedad asociada con el sistema por contacto. El umbral predeterminado puede representar el valor del biomarcador que distingue el nivel del biomarcador en pacientes que tengan la enfermedad blanco del nivel del biomarcador en pacientes sin la enfermedad blanco.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye más de uno de los
35 metabolitos que estén presentes diferencialmente (elevados y/o reducidos) en un sujeto que tenga o que esté en riesgo de tener la enfermedad con relación a los individuos sanos. En

algunos ejemplos, el conjunto de biomarcadores incluye al menos un biomarcador de metabolitos que tenga un nivel elevado en un sujeto que tenga o que esté en riesgo de tener la enfermedad y al menos uno los biomarcadores de metabolito que tenga un nivel reducido en el sujeto que tenga o esté en riesgo de la enfermedad. En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye más de uno de los biomarcadores de metabolitos que tengan niveles elevados en un sujeto que tenga o que esté en riesgo de tener la enfermedad con relación a aquellos en los controles sanos. En otras modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye más de uno de los biomarcadores de metabolitos que tengan niveles reducidos en un sujeto que tenga o que esté en riesgo de tener la enfermedad con relación a aquellos en los controles sanos.

En algunas modalidades, la muestra control o la muestra de referencia es una muestra biológica obtenida de un individuo sano. En algunas modalidades, la muestra control o la muestra de referencia contiene una cantidad conocida del metabolito que será evaluado.

En el sentido como se utiliza en la presente, una muestra control puede ser un sujeto sano o individuo sano, que aparentemente esté libre de la enfermedad blanco (por ejemplo, una enfermedad asociada con el sistema por contacto) en el momento en el que se mide el nivel de metabolitos o que no tenga historial de la enfermedad.

El término “sujeto control” abarca un sujeto individual o un grupo de sujetos que tengan características similares, por ejemplo un grupo de individuos sanos que tengan ciertas características que coincidan con aquellas del sujeto candidato, por ejemplo, edad, género, grupo étnico, etc. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador en un sujeto control se utiliza para estabilizar un valor de referencia (por ejemplo, el nivel promedio del biomarcador en un sujeto control, que incluye un grupo de sujetos) que se puede comparar con el nivel del biomarcador en el sujeto candidato o de prueba.

El nivel control se refiere al nivel de un conjunto de biomarcadores de metabolitos como se describe en la presente en un sujeto control. El nivel de control puede ser un nivel o umbral predeterminado. Este nivel predeterminado puede representar el nivel del metabolito en una población de sujetos que no tenga o no estén en riesgo de tener la enfermedad blanco (por ejemplo, el nivel promedio de la población de sujetos sanos). También puede representar el nivel del metabolito en una población de sujetos que tengan la enfermedad blanco.

El nivel predeterminado puede tomar una variedad de formas. Por ejemplo, puede ser valor de corte individual, tal como mediano o medio. En algunas modalidades, este nivel predeterminado se puede establecer con base en grupos comparativos, tales como se sabe que un grupo definido único tiene una enfermedad blanco y otro grupo definido se sabe que no tiene la enfermedad blanco. Alternativamente, el nivel predeterminado puede ser una variación, por ejemplo, una variación que represente los niveles de metabolitos en una

población control.

Los niveles de control, como se describe en la presente se puede determinar mediante tecnología de rutina. En algunos ejemplos, el nivel de control se puede obtener al realizar un método convencional (por ejemplo, el mismo ensayo para obtener el nivel del metabolito en una muestra de prueba como se describe en la presente) sobre una muestra control como también se describe en la presente. En otros ejemplos, los niveles de metabolitos se pueden obtener a partir de miembros de una población control y los resultados se pueden analizar mediante, por ejemplo, un programa de computación, para obtener el nivel de control (un nivel predeterminado) que represente el nivel del metabolito en la población control.

Al comparar el nivel de un biomarcador en una muestra obtenida de un candidato o sujeto, un valor de referencia como se describe en la presente, se puede determinar si el sujeto candidato tiene o está en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema por contacto (por ejemplo, HAE). Por ejemplo, si el nivel de biomarcadores en una muestra del sujeto candidato se desvía del valor de referencia (por ejemplo, aumenta en comparación con el valor de referencia), se podría identificar que el sujeto candidato tiene o está en riesgo de la enfermedad. Cuando el valor de referencia representa la variación de valores del nivel del biomarcador en una población de sujetos que tenga la enfermedad blanco, el valor del biomarcador en una muestra de un candidato que queda en la variación indica que el sujeto candidato tiene o está en riesgo de una enfermedad blanco.

En el sentido como se utiliza en la presente, “un nivel elevado” o “un nivel por encima de un valor de referencia” significa que el nivel del biomarcador es mayor que un valor de referencia, tal como un umbral predeterminado de un nivel del biomarcador en una muestra control. Los niveles de control se describen en detalle en la presente. Un nivel elevado de un biomarcador incluye un nivel del biomarcador que es, por ejemplo, del 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más por encima de un valor de referencia. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador en la muestra de prueba es de al menos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 10000 veces o mayor que el nivel del biomarcador en una muestra de referencia.

En el sentido como se utiliza en la presente, “un nivel disminuido” o “un nivel por debajo de un valor de referencia” significa que el nivel del biomarcador es menor que un valor de referencia, tal como un umbral pre-determinado del biomarcador en una muestra control. Los niveles de control se describen en detalle en la presente. Un nivel disminuido del biomarcador incluye un nivel del biomarcador que es, por ejemplo, del 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% o más superior que un valor de referencia. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador en la

muestra de prueba es de al menos 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 1000, 10000 veces o menor que el nivel del biomarcador en una muestra de referencia.

En algunas modalidades, el sujeto candidato es un paciente humano que tiene un
5 síntoma de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto, tal como un trastorno mediado por pKal, por ejemplo, el HAE o una enfermedad autoinmune, tal como RA, UC, y la enfermedad de Crohn. Por ejemplo, el sujeto tiene edema, hinchazón en donde la hinchazón es completa o predominantemente periférica; ronchas; irritación, dolor e hinchazón en ausencia de evidencia de infección; edema mediado que no es por histamina, ataques
10 recurrentes de hinchazón, o una combinación de los mismos. En otras modalidades, el sujeto no tiene síntoma de un trastorno mediado por pKal en el momento en que se recolecta la muestra, no tiene historial de un síntoma de un trastorno mediado por pKal, o ningún historial de un trastorno mediado por pKal tal como HAE. Todavía en otras modalidades, el sujeto es resistente a una terapia anti-histamínica, una terapia con corticosteroides, o ambas.

15 Un sujeto identificado en los métodos descritos en la presente puede ser un sujeto para un tratamiento adecuado, tal como el tratamiento con un inhibidor de pKal, como se describe en la presente.

Los métodos de ensayo y kits descritos en la presente también se pueden aplicar para la evaluación de la eficacia de un tratamiento para una enfermedad asociada con el sistema
20 por contacto, tal como aquellos descritos en la presente, dada la correlación entre el nivel de los biomarcadores y estas enfermedades. Por ejemplo, se pueden recolectar múltiples muestras biológicas (por ejemplo, muestras de sangre o plasma) provenientes de un sujeto a quien se le realice un tratamiento ya sea antes y después del tratamiento o durante el curso del tratamiento. Los niveles del biomarcador se pueden medir mediante cualquiera de los
25 métodos de ensayo como se describe en la presente y los valores (por ejemplo, cantidades) del biomarcador se pueden determinar por consiguiente. Por ejemplo, si un nivel elevado de un biomarcador indica que un sujeto tiene una enfermedad blanco y el nivel del biomarcador disminuye después del tratamiento o durante el curso del tratamiento (el nivel del biomarcador en una muestra recolectada posterior en comparación con el de una muestra recolectada
30 anterior), indica que el tratamiento es efectivo. Como otro ejemplo, si un nivel reducido de un biomarcador indica que un sujeto tiene una enfermedad blanco y el nivel de biomarcadores aumenta después del tratamiento o durante el curso del tratamiento (el nivel del biomarcador en una muestra recolectada posterior en comparación con el de una muestra recolectada anterior), indica que el tratamiento es efectivo. En algunos ejemplos, el tratamiento implica una
35 cantidad efectiva de un agente terapéutico, tal como un inhibidor de calicreína en plasma, un antagonista del receptor de bradiquinina B2, o un inhibidor de la esterasa C1 (C1-INH). Los

ejemplos de los agentes terapéuticos incluyen, de manera enunciativa, lanadelumab, escalatida, icatibant, y C1-INH derivado de plasma humano.

Si se identifica que el sujeto no responde al tratamiento, se administran al sujeto identificado una dosis mayor y/o una frecuencia de dosificación del agente terapéutico. En algunas modalidades, la dosis o frecuencia de dosificación del agente terapéutico se mantiene, se disminuye, o se interrumpe en un sujeto identificado que responde al tratamiento o que no necesita de tratamiento adicional. Alternativamente, se puede aplicar al sujeto un tratamiento diferente quien se encuentra que no responde al primer tratamiento.

En otras modalidades, los valores de un biomarcador o conjunto de biomarcadores también pueden depender de identificar que un trastorno está asociado con el sistema por contacto o que el trastorno puede ser tratable, por ejemplo, mediante un inhibidor de pKal. Para practicar este método, el nivel de un biomarcador en una muestra recolectada de un sujeto (por ejemplo, una muestra sanguínea o una muestra de plasma) que tenga una enfermedad blanco se puede medir mediante un método adecuado, por ejemplo, aquellos descritos en la presente, tales como espectometría de masas, cromatografía, inmunoensayos. Si el nivel del biomarcador se desvía del valor de referencia (por ejemplo, elevado o disminuido), indica que un inhibidor de pKal puede ser efectivo para tratar la enfermedad. Si la enfermedad se identifica que es susceptible (se puede tratar por), a un inhibidor de pKal, el método puede comprender además administrar al sujeto que tenga la enfermedad una cantidad efectiva de un inhibidor de pKal, tal como un anticuerpo anti-pKal o un péptido inhibidor (por ejemplo, lanadelumab, escalatida, etc.), un inhibidor del receptor de bradiquinina 2 (por ejemplo, icatibant); y/o un C1-INH (por ejemplo, el C1-INH derivado de plasma humano).

También quedan dentro del alcance de la presente descripción los métodos para evaluar la gravedad de una enfermedad asociada con el sistema por contacto o el estado de enfermedad. Por ejemplo, como se describe en la presente, el HAE puede estar en el estado de calma (estado basal), durante el cual el sujeto no experimenta los síntomas de la enfermedad. Los ataques del HAE típicamente son episodios recurrentes en los cuales el sujeto puede experimentar dolor e hinchazón, por ejemplo, de las manos, pies, cara, tracto gastrointestinal, genitales y laringe (garganta) que pueden durar desde dos hasta cinco días. En algunas modalidades, el nivel de uno o más biomarcadores es indicativo de si el sujeto experimentará, está experimentando, o pronto experimentará un ataque del HAE. En algunas modalidades, los métodos implican comparar el nivel de un biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tenga HAE con el nivel del biomarcador en una muestra del mismo sujeto, por ejemplo una muestra obtenida del mismo sujeto en estado basal o una muestra obtenida del mismo sujeto durante un ataque de HAE.

Otros aspectos de la descripción proporcionan métodos para evaluar el riesgo del ataque de una enfermedad (por ejemplo, un ataque por HAE). Como se describe en la presente, los ataques por HAE típicamente son episodios recurrentes durante los cuales el sujeto puede experimentar síntomas tales como dolor e hinchazón. En algunas modalidades, el nivel de uno o más biomarcadores es indicativo de si el sujeto está en riesgo o tiene un ataque por HAE. En algunas modalidades, los métodos implican comparar el nivel de un biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tenga HAE con el nivel del biomarcador en una muestra proveniente del mismo sujeto, por ejemplo una muestra obtenida del mismo sujeto en un estado basal o una muestra obtenida del mismo sujeto durante un ataque por HAE. Por ejemplo, un aumento (o una disminución) en el nivel de un biomarcador asociado con un ataque por HAE en comparación con el nivel del biomarcador en otra muestra proveniente del sujeto puede indicar que el sujeto está en riesgo de tener un ataque por HAE.

En algunas modalidades, los métodos implican comparar el nivel de un biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tenga HAE con el nivel del biomarcador en una muestra de control o de referencia. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador en la muestra de control o de referencia representa el nivel del biomarcador que indica un estado del ataque por HAE. Por ejemplo, un nivel del biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tiene HAE que sea similar al nivel del biomarcador en uno de referencia que representa un estado de ataque por HAE, puede indicar que el sujeto está en riesgo de tener un ataque por HAE. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador en la muestra de control o referencia representa el nivel del biomarcador que indica el HAE en el estado basal. Por ejemplo, un nivel del biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tenga HAE que se desvía (se eleva o se reduce) al nivel del biomarcador en una referencia que representa un HAE en el estado basal, puede indicar que el sujeto está en riesgo de tener un ataque por HAE.

(iii) Aplicaciones no clínicas

Además, los niveles de cualquiera del conjunto de biomarcadores descritos en la presente se pueden utilizar para fines de investigación. Aunque se han identificado muchas enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto, es posible que otras enfermedades estén mediadas por mecanismos similares o impliquen componentes similares. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para identificar una enfermedad que estará asociada con el sistema de activación por contacto o con los componentes del sistema de activación por contacto. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente se pueden utilizar para estudiar los mecanismos (por ejemplo, el descubrimiento de vías biológicas novedosas o los procesos implicados en el desarrollo de la enfermedad) o el progreso de una enfermedad.

En algunas modalidades, los niveles de los conjuntos de biomarcadores, como se describe en la presente, se pueden depender del desarrollo de terapias novedosas para una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto. Por ejemplo, los niveles de un conjunto de biomarcadores se pueden medir en muestras obtenidas de un sujeto al que se le haya administrado una terapia novedosa (por ejemplo, un ensayo clínico). En algunas modalidades, el nivel del conjunto de biomarcador puede indicar la eficacia del terapéutico novedoso o el progreso de la enfermedad en el sujeto antes, durante, o después de la terapia novedosa.

Kits y dispositivos de detección para medir los conjuntos de biomarcadores de metabolitos

La presente descripción también proporciona los kits y dispositivos de detección para utilizarse en medir el nivel del conjunto de biomarcadores como se describe en la presente. Este kit o dispositivo para detección puede comprender agentes de unión que se unen específicamente a biomarcadores de metabolitos, tales como aquellos listados en la Tabla 1. Por ejemplo, este kit o dispositivo para detección puede comprender al menos dos agentes de unión que son específicos para dos diferentes biomarcadores de metabolitos seleccionados de la Tabla 1. En algunos casos, el kit o el dispositivo para detección comprende agentes de unión específicos para todos los miembros del conjunto de biomarcadores de metabolitos descritos en la presente.

En algunas modalidades, uno o más de los agentes de unión es un anticuerpo que se une específicamente a un metabolito del conjunto de biomarcadores. En algunas modalidades, uno o más agentes de unión es un aptámero, tal como un aptámero peptídico o un aptámero oligonucleotídico, que se une específicamente a un metabolito de un conjunto de biomarcadores.

En algunas modalidades, los kits comprenden además un agente para detección (por ejemplo, un anticuerpo que se une al agente de unión) para detectar la unión del agente a los metabolitos del conjunto de biomarcadores. El agente para detección se puede conjugar con una marca. En algunas modalidades, el agente para detección es un anticuerpo que se une específicamente a al menos uno de los agentes de unión. En algunas modalidades, el agente de unión comprende una marca que se puede identificar y, se une directa o indirectamente por un agente para detección.

En algunas modalidades, el kit o dispositivo que incluye además un miembro de soporte. En algunas modalidades, el miembro de soporte es una membrana, tal como una membrana de nitrocelulosa, una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), o una membrana de acetato de celulosa. En algunos ejemplos, el inmunoensayo puede estar en un formato de ensayo de transferencia Western o un formato de ensayo de flujo lateral.

En algunas modalidades, el miembro de soporte es una placa de múltiples pocillos, tal como una placa de ELISA. En algunas modalidades, los inmunoensayos descritos en la presente se pueden llevar a cabo en plataformas de alto rendimiento. En algunas modalidades, las placas de múltiples pocillos, por ejemplo, 24-, 48-, 96-, 384- o placas con mayor número de pocillos, se pueden utilizar para inmunoensayos de alto rendimiento. Los inmunoensayos individuales se pueden llevar a cabo en cada pocillo en paralelo. Por lo tanto, en general es conveniente utilizar un lector de placas para medir los múltiples pocillos en paralelo para aumentar el rendimiento del ensayo. En algunas modalidades, los lectores de placas tienen la capacidad de formar imágenes de múltiples pocillos (por ejemplo, 4, 16, 24, 48, 96, 384, o más pocillos) en paralelo se puede utilizar para esta plataforma. Por ejemplo, se puede utilizar un lector de placas disponibles comercialmente (por ejemplo, el sistema de placa:visión disponible de Perkin Elmer, Waltham, MA). Este lector de placas tiene la capacidad para analizar la fluorescencia de base cinética. El sistema de placa:visión tiene alta óptica de eficiencia de recolección y tiene ópticas especiales diseñadas para el análisis de 96 pocillos en paralelo. Los lectores de placa paralelos adecuados adicionales incluyen, de manera enunciativa SAFIRE (Tecan, San Jose, CA), el FLIPRTETRA® (Molecular Devices, Union City, CA), el FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ), y el CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA).

En el kit o el dispositivo para detección, uno o más de los agentes de unión se pueden inmovilizar sobre un miembro de soporte, por ejemplo, que puede ser una membrana, una perla, un portaobjetos, o una placa de múltiples pocillos. La selección de un miembro de soporte adecuado para el inmunoensayo dependerá de diversos factores tales como el número de muestras y método para detectar la señal liberada de la marca conjugada con el segundo agente.

El kit también puede comprender uno o más tampones como se describe en la presente, aunque no se limita a un tampón de recubrimiento, un tampón de bloqueo, un tampón de lavado, y/o un tampón de paro.

En algunas modalidades, el kit puede comprender las instrucciones para utilizarse de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de la forma en que se deben utilizar los componentes contenidos en el kit para medir el nivel de metabolitos de un conjunto de biomarcadores en una muestra biológica recolectada de un sujeto, tal como un paciente humano.

Las instrucciones relacionadas con el uso del kit en general incluyen la información sobre la cantidad de cada componente y las condiciones adecuadas para realizar los métodos de ensayo descritos en la presente. Los componentes en el kit pueden estar en dosis unitarias, empaques a granel (por ejemplo, empaquetes de dosis múltiples), o dosis sub-

unitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la presente descripción típicamente son instrucciones escritas en una etiqueta o un inserto del empaque (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), aunque también son aceptables instrucciones legibles en máquina (por ejemplo, las instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

5 La etiqueta o inserto del empaque indica que el kit se utiliza para evaluar el nivel de metabolitos de un conjunto de biomarcadores. Las instrucciones se pueden proporcionar para practicar cualquiera de los métodos descritos en la presente.

Los kits de la presente descripción están en un empaque adecuado. El empaque adecuados incluye, de manera enunciativa, viales, botellas, frascos, empaques flexibles (por ejemplo, bolsas selladas Mylar o de plástico), y lo semejante. También se contemplan los empaques para utilizarse en combinación con un dispositivo específico, tal como un inhalador, un dispositivo para administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa con solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica).

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

25 **Tratamiento de enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto**

Un sujeto en riesgo de padecer de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto, según se identifica utilizando los métodos descritos en la presente, se puede tratar con cualquier agente terapéutico adecuado. En algunas modalidades, los métodos proporcionados incluyen seleccionar un tratamiento para un sujeto con base en el resultado del método descrito, por ejemplo, medir el nivel de un conjunto de biomarcadores.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente proporcionan métodos para identificar un sujeto como un candidato para tratamiento preventivo (profiláctico). En el sentido como se utiliza en la presente, un tratamiento “preventivo” incluye cualquier terapia o régimen de tratamiento que esté destinado a prevenir o reducir la incidencia de una enfermedad (por ejemplo, un ataque por HAE). En algunas modalidades, los métodos

comprenden además administrar un tratamiento preventivo al sujeto. Cualquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente (por ejemplo, inhibidores de pKal, tales como lanadelumab). En algunas modalidades, el nivel del conjunto de biomarcadores de metabolitos en una muestra obtenida de un sujeto indica que el paciente tiene o está en riesgo de tener HAE (por ejemplo, al comparar el nivel del biomarcador de metabolitos con el nivel en una muestra de referencia o de control). A cualquier sujeto que tenga o esté en riesgo de tener HAE se le puede administrar un tratamiento profiláctico. La selección de un agente terapéutico adecuado y el régimen de administración para un tratamiento preventivo serán evidentes para alguien con experiencia normal en la técnica.

En algunas modalidades, el método comprende uno o ambos de seleccionar o administrar un agente terapéutico, por ejemplo, un inhibidor de calicreína, un inhibidor del receptor de bradiquinina B2, y/o un inhibidor de la esterasa C1, para la administración al sujeto con base en el resultado del ensayo, por ejemplo, la detección de biomarcadores.

En algunas modalidades, el agente terapéutico se administra una o más veces al sujeto. En algunas modalidades, se le administra a un sujeto un inhibidor de calicreína en plasma. En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína es un péptido, un inhibidor de molécula pequeña, un anticuerpo de calicreína, o un fragmento de los mismos. En algunas modalidades, se administra a un sujeto un antagonista receptor de bradiquinina B2. En algunas modalidades, se administra a un sujeto, un C1-INH.

El agente terapéutico, por ejemplo, el inhibidor de calicreína, el inhibidor del receptor de bradiquinina B2, y/o el C1-INH, se pueden administrar junto con otra terapia como parte de una terapia de combinación para el tratamiento de una enfermedad o una condición que implique el sistema de activación por contacto. La terapia de combinación, por ejemplo, con uno o más de un inhibidor de calicreína, un antagonista del receptor bradiquinina B2, o un agente para reemplazo de C1-INH, por ejemplo, con uno o más de un inhibidor de calicreína, un antagonista del receptor bradiquinina B2 o un agente para reemplazo de C1-INH y otra terapia, se puede proporcionar en múltiples configuraciones diferentes. El primer agente se puede administrar antes o después de la administración de la otra terapia. En algunas situaciones, el primer agente y la otra terapia (por ejemplo, un agente terapéutico) se administran concurrentemente, o en proximidad temporal cercana (por ejemplo, un intervalo corto de tiempo entre las inyecciones, tal como durante la misma sesión de tratamiento). El primer agente y la otra terapia también se pueden administrar a intervalos temporales mayores.

Agentes terapéuticos

Los agentes de unión a calicreína de plasma (por ejemplo, proteínas de unión, por ejemplo, polipéptidos, por ejemplo, polipéptidos inhibidores, por ejemplo, anticuerpos, por

ejemplo, anticuerpos inhibidores, u otros agentes de unión, por ejemplo, moléculas pequeñas) son agentes terapéuticos útiles para una variedad de enfermedades y condiciones, por ejemplo, enfermedades y condiciones que impliquen la actividad de calicreína en plasma. Por ejemplo, en algunas modalidades, la enfermedad o condición que implique una actividad de calicreína en plasma es angioedema hereditario (HAE). En algunas modalidades, un agente de unión a calicreína en plasma tal como un inhibidor de calicreína en plasma se administra a un sujeto en riesgo de padecer de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto.

Una serie de inhibidores proteicos útiles de calicreína, ya sea calicreína en tejido y/o plasma, incluye un dominio de Kunitz. En el sentido como se utiliza en la presente, un “dominio de Kunitz” es un dominio polipéptido que tiene al menos 51 aminoácidos y que contiene al menos dos, y de preferencia tres, disulfuros. El dominio está plegado de tal forma que la primera y sexta cisteínas, la segunda y cuarta, y la tercera y quinta cisteínas forman los enlaces disulfuro (por ejemplo, en un dominio de Kunitz que tiene 58 aminoácidos, las cisteínas pueden estar presentes en las posiciones correspondientes a los aminoácidos 5, 14, 30, 38, 51, y 55, de acuerdo con el número de secuencias homólogas BPTI proporcionan más adelante, y los que se pueden formar disulfuros entre las cisteínas en las posiciones 5 y 55, 14 y 38, y 30 y 51), o, si están presentes dos disulfuros, los mismos se pueden formar entre un subconjunto correspondiente de cisteínas de los mismos. La separación entre las cisteínas respectivas puede estar entre 7, 5, 4, 3, 2, 1 ó 0 aminoácidos de la siguiente separación entre las posiciones correspondientes a: 5 a 55, 14 a 38, y 30 a 51, de acuerdo con la numeración de la secuencia de BPTI proporciona más adelante. La secuencia BPTI se puede utilizar como una referencia para mencionar una posición específica en cualquier dominio de Kunitz genérico. La comparación de un dominio de Kunitz de interés con BPTI se puede realizar al identificar el mejor alineamiento de ajuste en el cual se aumenta al máximo el número de cisteínas alineadas.

Se conoce la estructura 3D (a alta resolución) del dominio de Kunitz de BPTI. Una de las estructuras por rayos X se deposita en el Brookhaven Protein Data Bank como “6PTI”. Se conoce la estructura 3D de algunos homólogos de BPTI (Eigenbrot et al., *Protein Engineering* (1990) 3(7):591-598; Hynes et al., *Biochemistry* (1990) 29:10018-10022). Se conocen al menos ochenta y una secuencias de dominio de Kunitz. Los homólogos humanos conocidos incluyen tres dominios de Kunitz de LACI también conocido como el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (Wun et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263(13):6001-6004; Girard et al., *Nature* (1989) 338:518-20; Novotny et al., *J. Biol. Chem.* (1989) 264(31):18832-18837) dos dominios de Kunitz del inhibidor de inter- α -tripsina, APP-I (Kido et al. *J. Biol. Chem.* (1988) 263(34):18104-18107), un dominio de Kunitz proveniente de colágeno, tres dominios de Kunitz

de TFPI-2 (Sprecher *et al.*, *PNAS USA* (1994) 91:3353-3357), los dominios de Kunitz del tipo 1 del inhibidor activador del factor de crecimiento de hepatocitos, los dominios de Kunitz del tipo 2 del inhibidor activador del factor de crecimiento de hepatocitos, los dominios de Kunitz descritos en la publicación de Patente de los Estados Unidos No.: 2004-0152633. LACI es una fosfoglucoproteína sérica humana con un peso molecular de 39 kDa (secuencia de aminoácidos en la Tabla 2) que contiene tres dominios de Kunitz.

Tabla 2: Dominios de Kunitz naturales ilustrativos

LACI (SEC ID NO: 1)	1 <u>MIYTMKKVHA</u> <u>LWASVCLLLN</u> <u>LAPAPLN</u>Ads eedeehtiit dtelpplkIM 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC 101 KKMCTRDnan riikttlqqe <u>kpdfCf</u>leed <u>pgiCrgyitr</u> <u>yfynnqtqkC</u> 151 <u>erfkyggClg</u> <u>nmnnfetlee</u> <u>CkniCedgpn</u> <u>gfqvdnygtq</u> <u>Inavnnsltp</u> 201 qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC 251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm La secuencia de señal (1-28) está en mayúsculas y subrayadas LACI-K1 (50-107) está en mayúsculas LACI-K2 (121-178) están subrayadas LACI-K3 (211-270) están en negrillas
BPTI (SEC ID NO:2)	1 2 3 4 5 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 RPDF<u>C</u>LEPPYTGP<u>C</u>KARIIRYFYNAKAGL<u>C</u>QTFVYGG<u>C</u>RAKRNNFKSAED<u>C</u>MR T<u>C</u>GGA

Los dominios de Kunitz anteriores se denominan como LACI-K1 (residuos 50 a 107), LACI-K2 (residuos 121 a 178), y LACI-K3 (213 a 270). La secuencia de ADNc de LACI se reporta en Wun et al. (*J. Biol. Chem.* (1988) 263(13):6001-6004). Girard et al. (*Nature* (1989) 338:518-20) reportan estudios mutacionales en los cuales los residuos de P1 de cada uno de los tres dominios de Kunitz se alteraron. LACI-K1 inhibe el factor VIIa (F.VIIa) cuando F.VIIa se compleja con el factor tisular y LACI-K2 inhibe el factor Xa.

Las proteínas que contienen dominios de Kunitz ilustrativas incluyen las siguientes, con los números de acceso SWISS-PROT entre paréntesis:
A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),

A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAISC (Q95241),
AMBP_PLEPL (P36992), APP2_HUMAN (Q06481), APP2_RAT (P15943),
AXP1_ANTAF (P81547), AXP2_ANTAF (P81548), BPT1_BOVIN (P00974),
BPT2_BOVIN (P04815), CA17_HUMAN (Q02388), CA36_CHICK (P15989),
 5 **CA36_HUMAN (P12111), CRPT_BOOMI (P81162), ELAC_MACEU (O62845),**
ELAC_TRIVU (Q29143), EPPI_HUMAN (O95925), EPPI_MOUSE (Q9DA01),
HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
IMAP_DROFU (P11424), IP52_ANESU (P10280), ISC1_BOMMO (P10831),
 10 **ISC2_BOMMO (P10832), ISH1_STOHE (P31713), ISH2_STOHE (P81129),**
ISIK_HELPO (P00994), ISP2_GALME (P81906), IVB1_BUNFA (P25660),
IVB1_BUNMU (P00987), IVB1_VIPAA (P00991), IVB2_BUNMU (P00989),
IVB2_DABRU (P00990), IVB2_HEMHA (P00985), IVB2_NAJNI (P00986),
IVB3_VIPAA (P00992), IVBB_DENPO (P00983), IVBC_NAJNA (P19859),
 15 **IVBC_OPHHA (P82966), IVBE_DENPO (P00984), IVBI_DENAN (P00980),**
IVBI_DENPO (P00979), IVBK_DENAN (P00982), IVBK_DENPO (P00981),
IVBT_ERIMA (P24541), IVBT_NAJNA (P20229), MCPI_MELCP (P82968),
SBPI_SARBU (P26228), SPT3_HUMAN (P49223), TKD1_BOVIN (Q28201),
TKD1_SHEEP (Q29428), TXCA_DENAN (P81658), UPTI_PIG (Q29100),
 20 **AMBP_BOVIN (P00978), AMBP_HUMAN (P02760), AMBP_MERUN (Q62577),**
AMBP_MESAU (Q60559), AMBP_MOUSE (Q07456), AMBP_PIG (P04366),
AMBP_RAT (Q64240), IATR_HORSE (P04365), IATR_SHEEP (P13371),
SPT1_HUMAN (O43278), SPT1_MOUSE (Q9R097), SPT2_HUMAN (O43291),
SPT2_MOUSE (Q9WU03), TFP2_HUMAN (P48307), TFP2_MOUSE (O35536),
 25 **TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),**
TFPI_RABIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

Se pueden utilizar una variedad de métodos para identificar un dominio de Kunitz a partir de una base de datos de secuencia. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos conocida de un dominio de Kunitz, una secuencia consensual, o un motivo (por ejemplo, el Motivo ProSite) se puede investigar contra las bases de datos de las secuencias GenBank (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda MD) , por ejemplo, utilizando BLAST; contra la base de datos Pfam de HMM (Hidden Markov Models) (por ejemplo, utilizando los parámetros por predeterminados para una búsqueda Pfam; contra la base de datos SMART; o en contra la base de datos ProDom. Por ejemplo, el Número de acceso de Pfam PF00014 de Pfam Liberada 9 proporciona muchos dominios de

Kunitz y un HMM para identificar los dominios de Kunitz. Una descripción de la base de datos Pfam se puede encontrar en Sonhammer et al. *Proteins* (1997) 28(3):405-420 y una descripción detallada de los HMM se puede encontrar, por ejemplo, en Gribskov et al. *Meth. Enzymol.* (1990) 183:146-159; Gribskov et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84:4355-4358; 5 Krogh et al. *J. Mol. Biol.* (1994) 235:1501-1531; and Stultz et al. *Protein Sci.* (1993) 2:305-314. La base de datos SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE) de los HMM como se describe en Schultz et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:5857 y Schultz et al. *Nucl. Acids Res* (2000) 28:231. La base de datos SMART contiene los dominios identificados mediante la perfilación con los modelos Markov escondidos del 10 programa de búsqueda HMMer2 (R. Durbin et al. (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). La base de datos también se anota y monitorea. La base de datos de dominios proteicos ProDom consiste de una compilación automática de dominios homólogos (Corpet et al. *Nucl. Acids Res.* (1999) 27:263-267). Las versiones actuales de ProDom se integran utilizando investigaciones PSI- 15 BLAST recursivas (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:3389-3402; Gouzy et al. *Computers and Chemistry* (1999) 23:333-340.) de las bases de datos de proteínas SWISS-PROT 38 y TREMBL. La base de datos genera automáticamente una secuencia consensual para cada dominio. PROSITE lista el dominio de Kunitz como un motivo e identifica las proteínas que incluyen un dominio de Kunitz. Véase, por ejemplo, Falquet et al. *Nucleic Acids* 20 *Res.* (2002) 30:235-238.

Los dominios de Kunitz interactúan con una proteasa blanco utilizada, principalmente, aminoácidos de dos regiones de asa ("asas de unión"). La primera región de asa está entre aproximadamente los residuos correspondientes a los aminoácidos 13-20 de BPTI. La segunda región de asa es de aproximadamente los residuos correspondientes a los 25 aminoácidos 31-39 de BPTI. Una biblioteca ilustrativa de los dominios de Kunitz varían de una o más posiciones de aminoácidos en la primera y/o la segunda regiones de asa. Las posiciones particularmente útiles pueden variar, cuando se seleccionan para los dominios de Kunitz con el que interactúan con calicreína o cuando se seleccionan para variantes mejoradas de afinidad, incluyen: las posiciones 13, 15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34, y 39 con 30 respecto a la secuencia de BPTI. Se espera que al menos algunas de estas posiciones estén en contacto cercano con la proteasa blanco. También es útil variar otras posiciones, por ejemplo, las posiciones que estén adyacentes a las posiciones mencionadas anteriormente en la estructura tridimensional.

La "región de cadena principal" de un dominio de Kunitz se define como aquellos 35 residuos que forman parte de un dominio de Kunitz, aunque excluyendo específicamente los residuos en la primera y segunda regiones de asas de unión, es decir, aproximadamente los

residuos correspondiente a los aminoácidos 13-20 de BPTI y 31-39 de BPTI. Inversamente, los residuos que no están en el asa de unión pueden tolerar una gama más amplia de sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, conservadoras y/o no conservadoras).

En una modalidad, estos dominios de Kunitz son formas variantes de la estructura de asa que incluye el Dominio de Kunitz 1 de la proteína del inhibidor de coagulación asociado con la lipoproteína humana (LACI). LACI contiene tres, estructuras de asa peptídica bien definidas, internas, que son los dominios de Kunitz paradigma (Girard, T. et al., *Nature* (1989) 338:518-520). Las variantes del dominio de Kunitz 1 de LACI descritas en la presente se han seleccionado, aislado y se unen a la calicreína con una afinidad y especificidad mejoradas (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos. Nos. 5,795,865 y 6,057,287). Estos métodos también se pueden aplicar a las cadenas principales del dominio de Kunitz para obtener otros dominios de Kunitz que interactúen con la calicreína, por ejemplo, la calicreína en plasma. Los moduladores útiles de la función de calicreína típicamente se unen y/o inhiben la calicreína, según se determina utilizando los ensayos de unión e inhibición con calicreína.

En algunos aspectos, el inhibidor de calicreína en plasma se une a la forma activa de la calicreína en plasma. En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína en plasma, se une e inhibe la calicreína en plasma, por ejemplo, la calicreína en plasma humana y/o la calicreína murina. Los agentes de calicreína en plasma polipeptídica ilustrativos se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5,795,865, la patente de Estados Unidos No. 5,994,125, la patente de Estados Unidos No. 6,057,287, la patente de Estados Unidos No. 6.333.402, la patente de Estados Unidos No. 7,628,983, y la patente de Estados Unidos No. 8,283,321, la patente de Estados Unidos No. 7,064, 107, la patente de Estados Unidos No. 7,276,480, la patente de Estados Unidos No. 7,851,442, la patente de Estados Unidos No. 8,124,586, la patente de Estados Unidos No. 7,811,991, y la Publicación de los Estados Unidos No. 20110086801, los contenidos totales de las mismas se incorporan en la presente como referencia. En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína en plasma es un polipéptido o péptido inhibidor. En algunas modalidades, el péptido inhibidor es escalatida (también denominada como DX-88 o KALBITOR®; SEC ID NO: 3). En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína comprende o consiste de una secuencia de aproximadamente 58 aminoácido de los aminoácidos 3-60 de la SEC ID NO: 3 o el polipéptido DX-88 que tiene la secuencia de 60 aminoácido de la SEC ID NO: 3.

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp (SEC ID NO: 3).

El inhibidor de calicreína en plasma puede ser los anticuerpos de longitud total (por ejemplo, un IgG (por ejemplo, un IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por ejemplo, IgA1, IgA2),

IgD, e IgE) o pueden incluir sólo un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento Fab, F(ab')₂ o scFv). La proteína de unión puede incluir dos inmunoglobulinas de cadena pesada y dos inmunoglobulinas de cadena ligera, o puede ser un anticuerpo de una sola cadena. El inhibidor de calicreína en plasma puede ser proteínas recombinantes, tales como los anticuerpos humanizados, CDR injertados, quiméricos, desinmunizados, o generados *in vitro*, y puede incluir opcionalmente las regiones constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una modalidad, el inhibidor de calicreína en plasma es un anticuerpo monoclonal.

Las proteínas de unión a calicreína en plasma ilustrativas se describen en la Publicación de los Estados Unidos No. 20120201756, los contenidos totales de la misma se incorporan en la presente como referencia. En algunas modalidades, la proteína de unión a calicreína es un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano) que tiene las cadenas ligera y/o pesada de los anticuerpos seleccionados del grupo que consiste de M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (también denominados como DX-2922), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01 (también denominados en la presente como DX-2930 o lanadelumab), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas modalidades, la proteína de unión a calicreína en plasma compite o se une al mismo epítipo que M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (también denominados en la presente como DX-2922), X81-B01, X67-D03, X67-G04, X81-B01, X67-D03, X67-G04, X115-B07, X115-D05, X115-E09, X115-H06, X115-A03, X115-D01, X115-F02, X124-G01,, X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 y M35-G04. En algunas modalidades, la proteína de unión a calicreína en plasma es lanadelumab. Véase la Publicación de los Estados Unidos No. 20110200611 y la Publicación de los Estados Unidos No. 20120201756, que se incorporan como referencia en la presente.

Un ejemplo de un anticuerpo inhibidor de calicreína en plasma es lanadelumab. Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de lanadelumab se proporcionan más adelante con las regiones CDR identificadas en negrillas y subrayadas.

Secuencia de la región variable de cadena pesada Lanadelumab (SEC ID NO: 4)

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

Secuencia de la región variable de cadena ligera Lanadelumab (SEC ID NO: 5)

DIQMTQSPS TLSASVGDRV TITCRASQSI SSWLAWYQQK PGKAPKLLIY

KASTLESGVP SRFSGSGSGT EFTLTISLQ PDDFATYYCQ QYNTYWTFGQ GTKVEI

En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína en plasma puede tener una identidad de secuencia de aproximadamente el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 5 97%, 98%, 99% o mayor con un inhibidor de calicreína en plasma descrito en la presente. En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína en plasma puede tener una identidad de secuencia de aproximadamente el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor en las regiones de cadena principal de HC y/o LC (por ejemplo, HC y/o LC FR 1, 2, 3, y/o 4) con un inhibidor de calicreína en plasma descrito en la presente. En algunas 10 modalidades, un inhibidor de calicreína en plasma puede tener una identidad de secuencia de aproximadamente el 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor que las CDR de HC y/o LC (por ejemplo, la CDR1, 2 y/o 3 de HC y/o LC) con un inhibidor de calicreína en plasma descrito en la presente. En algunas modalidades, un inhibidor de calicreína en plasma puede tener una identidad de secuencia de aproximadamente el 85%, 15 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor en la región constante (por ejemplo, CH1, CH2, CH3, y/o CL1) con un inhibidor de calicreína en plasma descrito en la presente.

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

20 Inhibidores del receptor de bradiquinina B2

En algunas modalidades, un inhibidor del receptor de bradiquinina B2 (por ejemplo, un antagonista) se administra a un sujeto. Los antagonistas del receptor de bradiquinina B2 ilustrativos incluyen icatibant (Firazyr®), que es un fármaco peptidomimético que contiene 10 aminoácidos, que bloquean la unión de la bradiquinina natural con el receptor de bradiquinina 25 B2.

Agentes para reemplazo de C1-INH

En algunas modalidades, un inhibidor de la esterasa C1 (C1-INH), tal como un agente para reemplazo de C1-INH se administra a un sujeto. Los agentes para reemplazo de C1-INH ilustrativos están disponibles al público e incluyen, por ejemplo, el C1-INH derivados de 30 plasma humano, por ejemplo Berinert® y CINRYZE®.

Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, con base en la descripción anterior, utilizar la presente descripción a su grado total. Las siguientes modalidades específicas por lo tanto se deben interpretar simplemente como ilustrativas, y no limitativas del resto de la descripción de ninguna forma. Todas las publicaciones citadas en la 35 presente se incorporan como referencia para los fines de la materia expuesta a la que se hace referencia en la presente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de metabolitos presentes diferencialmente en muestras provenientes de pacientes con HAE en comparación con individuos sanos

Para investigar los biomarcadores metabólicos novedosos de la angioedema hereditario, se realizó un análisis que compara la composición de metabolitos de muestras de plasma obtenidas de pacientes con HAE con la composición de metabolitos de muestras obtenidas de individuos sanos. Se recolectó plasma tratado con citrato de 20 individuos sanos y 20 pacientes que tienen HAE durante la calma de la enfermedad ("basal") y durante un ataque edematoso ("ataque"). Las muestras se sometieron a una metodología de cromatografía líquidos validada-espectrometría de masas (LC-MS) para detectar los metabolitos presentes en las muestras. Los análisis detectaron 1069 diferentes metabolitos en plasma. La abundancia de cada metabolito se comparó a través de las muestras y se sometió a análisis estadístico.

Como se muestra en la Tabla 3, estuvieron presentes diferencialmente 187 diferentes metabolitos en muestras provenientes de pacientes con HAE en estado basal en comparación con individuos sanos (73 fueron elevados, 114 se redujeron); estuvieron presentes diferencialmente 156 diferentes metabolitos en muestras provenientes de pacientes con HAE durante un ataque en comparación con individuos sanos (51 estuvieron elevados, 105 se redujeron); y estuvieron presentes diferencialmente 59 metabolitos diferentes en muestras provenientes de pacientes con HAE durante un ataque en comparación con pacientes con HAE en estado basal (25 estuvieron elevados durante un ataque, 34 se redujeron durante un ataque).

Tabla 3: Sumario del análisis metabólico

Sumario de conteos	Prueba t de pares equiparados	Prueba para dos muestras de Welch	
	Ataque basal	Ataque normal	Ataque normal
Número total de bioquímicos con $p < 0.05$	59	156	187
Bioquímicos ($\uparrow\downarrow$)	25 34	51 105	73 114

Un análisis *forest* aleatorio indicó la separación de pacientes con HAE de individuos sanos con una precisión de clasificación del 78% (Figura 1, panel A) y una separación de pacientes con HAE en estado basal de pacientes con HAE durante un ataque con una precisión de clasificación del 20% (Figura 1, panel B).

Análisis metabolómico que compara muestras provenientes de pacientes con HAE con individuos sanos

La comparación metabolómica de muestras provenientes de pacientes con HAE e individuos sanos identificó diversos metabolitos potenciales que exhiben diferencias específicas de la enfermedad en los niveles detectados en las muestras de plasma. Por ejemplo, se encontró que el neurotransmisor serotonina estará significativamente elevado ($P < 0.05$ Prueba t para dos muestras de Welch) en las muestras de plasma provenientes de pacientes con HAE en comparación con muestras de plasma provenientes de individuos sanos y elevado específicamente durante un ataque por HAE (Tabla 4; Figura 2, panel A). El triptófano, un precursor de serotonina, se encontró que estará disminuido en las muestras de plasma provenientes de pacientes con HAE en comparación con las muestras de plasma provenientes de individuos sanos, indicando adicionalmente que el metabolismo de la serotonina se altera durante el HAE. Se encontró que otros metabolitos implicados en la producción de serotonina (por ejemplo, indolelactato e indolepropionato) serán significativamente diferentes entre pacientes con HAE e individuos sanos (Tabla 4).

Tabla 4: Metabolitos implicados en la producción de serotonina

	Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
Bioquímico			
Triptófano	1.04	0.87	0.86
Indolelactato	0.94	0.76	0.84
Indolepropionato	1.58	0.7	0.78
Quinurenina	1.05	1.07	1.05
Quinurenato	1.05	1.07	1.17
Sserotonina	3.89	5.63	5.21

La serotonina es un neurotransmisor y una amina vasoactiva que actúan en el sistema nervioso central, el tracto gastrointestinal, y las plaquetas sanguíneas y está implicada en la regulación del tono vascular. Cuando se seleccionan los niveles de serotonina con base en las tasas de ataque por HAE, se observó que los niveles de serotonina serán mayores en pacientes que tengan ataques por HAE más frecuente (>2 ataques al mes) (Figura 2, panel B). Por consiguiente, la detección de niveles de serotonina pueden ser útiles para identificar a pacientes con una enfermedad más activa o pacientes cuya enfermedad que sea menos probablemente que se controle por la terapia.

Diversos metabolitos asociados con la actividad de la amida hidrolasa de ácido graso

(FAAH) se aumentaron significativamente en muestras provenientes de pacientes con HAE, lo que sugiere una actividad reducida de la amida hidrolasa de ácido graso en pacientes con HAE (Tabla 5). Por ejemplo, la amida palmítica, oleamida, y linoleamida (18:2n6) se elevaron significativamente en el plasma de HAE en comparación con el plasma sano (Tabla 5).

Tabla 5: Metabolitos asociados con la actividad de la amida hidrolasa de ácido graso (FAAH)

	Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
Bioquímico			
Amida palmítica	1.53	3.21	2.98
Oleamida	3.57	13.73	6.7
Linoleamida (18:2n6)	3.81	10.51	7.71

Se encontró que diversos marcadores de peróxido lipídico entre los que se incluyen 9/13-HODE, 9,10-DiHOME, 12,13-DiHOME y 19,20 DiHDPA se reducirán en las muestras provenientes de pacientes con HAE en comparación con individuos sanos (Tabla 6). Esto es consistente con el estrés oxidativo disminuido en la membrana asociada predicho en pacientes con HAE.

Tabla 6: Biomarcadores de peróxido lipídico

	Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
Bioquímico			
13-HODE + 9-HODE	1.93	0.67	0.58
12, 13-DiHOME	1.14	0.44	0.59
9, 10-DiHOME	0.91	0.47	0.67
12-HETE	2.08	1.48	1.24

También se encontró que el antioxidante unido a lípidos gamma/beta-tocoferol tiene niveles significativamente elevados en las muestras provenientes de pacientes con HAE (Tabla 7).

Tabla 7: Metabolitos con propiedades antioxidantes

	Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
Bioquímico			
Ascorbato (Vitamina C)	2.78	0.7	0.64
gamma-tocoferol/beta-tocoferol	1.09	1.45	1.47

Los datos metabolónicos sugieren adicionalmente que el metabolismo del azufre y el metabolismo de esteroides pueden estar implicados en el HAE. Como se muestra en la Tabla 8, muchos metabolitos asociados con el metabolismo de azufre se detectaron a niveles elevados, incluyendo la N-acetilmetionina, la metioninsulfona, la S-adenosilhomocisteína (SAH), la cistina, y el ácido cisteinsulfínico. Diversos metabolitos esteroideos, entre los que se incluyen el cortisol, se detectaron a niveles reducidos en pacientes con HAE con relación a individuos sanos (Tabla 9).

Tabla 8: Metabolitos asociados con el metabolismo del azufre

		Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
10	Bioquímico			
	Metionina	1.1	0.92	0.91
	N-acetilmetionina	1.1	1.3	1.24
	Metioninsulfona	1	1.36	1.41
15	S-adenosilhomocisteína (SAH)	1.11	1.53	1.35
	Alfa-quetobutirato	1.09	1.25	1.29
	Cistina	0.97	1.21	1.26
	Ácido cisteinsulfínico	0.9	3.13	3.99
	Hipotaurina	1.09	1.12	1.07
20	Taurina	1.24	1.52	1.17
	Disulfuro de cistein-glutación	1.15	0.89	0.81
	cys-gly, oxidado	1.19	1.09	0.9

Estos resultados indican que cualquiera de los metabolitos identificados en el estudio de metabolónicos se puede utilizar como biomarcadores para distinguir entre las muestras provenientes de pacientes con HAE de los individuos sanos. Además, este estudio identificó el estrés antiinflamatorio, oxidativo, y las vías de metabolismo de esteroides según se altere en pacientes con HAE. Estas vías pueden proporcionar una fuente potencial para biomarcadores novedosos.

Análisis metabolónico que compara muestras provenientes de pacientes con HAE en estado basal contra durante un ataque

El análisis de metabolónicos también identificó diversos metabolitos que estuvieron presentes a diferentes niveles entre los pacientes que tienen HAE en estado basal en comparación con pacientes que tienen HAE durante un ataque. La corticoesterona, un intermediario en la forma de aldosterona, se encontró que se reducirá significativamente durante un ataque de HAE (Tabla 9). Adicionalmente, diversos ácidos grasos poliinsaturados

se elevaron significativamente elevados durante un ataque en comparación con durante el estado basal, incluyendo eicosapentaenoato, ácido de aguamiel, y estearidonato (Tabla 10). Por último, se observó que dos precursores metabólicos del cofactor de la coenzima A (nicotinamida y pantotenato) se elevaron significativamente durante un ataque en comparación con el estado basal.

Tabla 9: Metabolitos implicados en el metabolismo de esteroides

		Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
10	Bioquímico			
	Sulfato de pregnenolona	1.24	0.62	0.57
	5alfa-pregnan-3beta, 20beta-diol monosulfatado (1)	1.25	0.24	0.34
	Pregnen-diol disulfatado	0.94	0.67	0.72
	Pregn esteroide monosulfatado	1.11	0.69	0.74
15	Pregnanediol-3-glucurónido	1.23	0.33	0.43
	Cortisol	1.81	0.67	0.59
	Corticoesterona	0.89	0.89	1.11
	Cortisona	1.18	0.74	0.72
	Dehidroisoandrosterona (DHEA-S)	1.04	0.69	0.69
20	3-sulfato de 16a-hidroxi DHEA	0.82	0.68	0.93
	Sulfato de epiandrosterona	1.18	0.66	0.61
	Sulfato de androsterona	1.12	0.58	0.56
	4-androsten-3beta, 17beta-diol monosulfatado (1)	1.1	0.82	0.76
	4-androsten-3beta, 17beta-diol monosulfatado (2)	0.99	0.56	0.58
25	4-androsten-3alfa, 17alfa-diol monosulfatado (2)	1.16	0.83	0.89
	4-androsten-3alfa, 17alfa-diol monosulfatado (3)	1.04	0.55	0.55
	4-androsten-3beta, 17beta-diol disulfatado (1)	1.04	0.52	0.52
	4-androsten-3beta, 17beta-diol disulfatado (2)	0.92	0.71	0.8
	5alfa-androstan-3alfa, 17beta-diol monosulfatado (1)	1.15	0.69	0.62
30	5alfa-androstan-3alfa, 17alfa-diol monosulfatado	1.19	0.59	0.55
	5alfa-androstan-3beta, 17beta-diol monosulfatado (2)	1.17	0.82	0.72
	5alfa-androstan-3beta, 17alfa-diol disulfatado	0.99	0.83	1.62
	5alfa-androstan-3alfa, 17 beta-diol disulfatado	1.59	0.55	0.69
	5alfa-androstan-3beta, 17beta-diol disulfatado	1.13	0.5	0.52
35	andro esteroide monosulfatado (1)	0.98	0.66	0.89

Etiocolanolona de glucurónido	1.14	0.72	0.82
5alfa-androstan-3alfa, 17beta-diol monosulfatado (2)	1	1.14	1.23
Sulfato de pregnanolona/alopregnanolona	1.27	0.18	0.28

5 Tabla 10: Ácidos grasos poliinsaturados

	Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
Bioquímico			
Eicosapentaenoato (EPA; 20:5n3)	1.62	1.23	0.81
Ácido de aguamiel (20:3n9)	1.69	1.02	0.66
Estearidonato (18:4n3)	2.41	1.34	0.85

10 Tabla 11: Precusores metabólicos del cofactor de la coenzima A

	Ataque Basal	Ataque Normal	Basal Normal
Bioquímico			
Nicotinamida	1.55	1	0.74
Pantotenato	1.22	0.88	0.77

20 Estos resultados indican que estos metabolitos, por ejemplo, aquellos que tienen una proporción significativa de cambio de veces se pueden utilizar como biomarcadores confiables para HAE y otras enfermedades asociadas con el sistema por contacto, ya sea tomadas solas o en combinación.

25 Los datos del metabolónicos también proporcionan una percepción novedosa en la patobiología del HAE. Por ejemplo, un subconjunto de metabolitos estuvieron asociados con edema, entre los que se incluyen la serotonina y las amidas lipídicas; los metabolitos asociados con estrés oxidativo, tales como, límites oxidativos, gamma-/beta-tocoferol; y esteroides. El análisis también proporcionó una percepción en la patobiología del HAE en estado basal en comparación con durante un ataque. Por ejemplo, algunas de las diferencias entre el estado basal y durante un ataque incluyeron precursores lipídicos antiinflamatorios, corticoides minerales (corticoesterona), y reguladores del equilibrio del agua y sales.

30 El análisis metabolónico también identificó muchos metabolitos que estuvieron presentes a niveles que difirieron en pacientes con HAE e individuos sanos y entre los pacientes con HAE en estado basal en comparación con durante un ataque. Cualquiera del metabolitos identificados en la presente (por ejemplo, los metabolitos que tienen un cambio significativo de pliegues entre los pacientes con HAE e individuos sanos), se puede utilizar como un biomarcador (individualmente o en combinación (conjunto de biomarcadores)) para

enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto, por ejemplo en los métodos para identificar a pacientes que estén en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, HAE), seleccionar un candidato para tratamiento, monitorear el progreso de la enfermedad o el estado de la enfermedad, evaluar la

5 eficacia de un tratamiento contra la enfermedad, determinar un curso de tratamiento, identificar si una enfermedad o trastorno está asociado con el sistema de activación por contacto, y/o para fines de investigación, incluyendo, por ejemplo, estudiar el mecanismo de una enfermedad, que puede depender del desarrollo de terapias novedosas.

OTRAS MODALIDADES

10 Todas las características descritas en esta especificación se pueden combinar de cualquier combinación. Cada característica descrita en esta especificación se puede reemplazar por una característica alternativa que sirva al mismo, equivalente, o similar finalidad. De esta forma, a menos que se establezca expresamente otra cosa, cada característica descrita es sólo un ejemplo de una serie genérica de características

15 equivalentes o similares.

A partir de la descripción anterior, un experto en la técnica puede determinar fácilmente las características esenciales de la presente descripción, y sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la presente descripción para adaptarla a diversos usos y condiciones. De esta forma, también quedan

20 dentro de las reivindicaciones otras modalidades.

EQUIVALENTES Y ALCANCE

Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más de una experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la presente descripción descrita en la presente. El alcance de la presente descripción no

25 pretende estar limitado a la descripción anterior, sino que en su lugar es como se establece en las reivindicaciones anexas.

En las reivindicaciones los artículos tales como “uno”, “un” y “el” pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o de otra manera sea evidente a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyan “o” entre uno o más miembros de

30 un grupo se considerará que se satisfacen si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otra manera son relevantes para un producto o proceso determinado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otra manera a partir del contexto. La presente descripción incluye modalidades en las cuales exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en, o de otra manera es relevante para un

35 producto o proceso determinado. La presente descripción incluye modalidades en las cuales más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otra

manera son relevantes para un producto o proceso determinado.

Además, la presente descripción abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las cuales una o más limitaciones, elementos, cláusulas y términos descriptivos provenientes de una o más de las reivindicaciones listadas se presentan en otra reivindicación. Por ejemplo, cualquier reivindicación que dependa de otra reivindicación se puede modificar para que incluya una o más limitaciones encontradas en cualquier otra reivindicación que dependa de la misma reivindicación base. Cuando se presenten elementos como listas, por ejemplo, en el formato de grupo Markush, también se describe cada subgrupo de los elementos, y se pueden eliminar del grupo cualesquiera elementos. Se debe entender que, en general, donde la presente descripción, o aspectos de la presente descripción, se haga referencia a que comprenda elementos y/o características particulares, ciertas modalidades de la presente descripción o aspectos de la presente descripción consisten, o consisten esencialmente de, estos elementos y/o características. Para fines de simplicidad, aquellas modalidades que no se hayan establecido específicamente *in haec verba* en la presente. También se debe observar que los términos “que comprende” y “que contiene” están destinados para ser abiertos y permite la inclusión de elementos o pasos adicionales. Cuando se proporcionen variaciones, se incluyen puntos finales. Además, a menos que se indique otra cosa o sea evidente otra cosa a partir del contexto y la comprensión de alguien con experiencia normal en la técnica, los valores que se expresen como variaciones pueden asumir cualquier valor específico o sub-variación dentro de las variaciones establecidas en las diferentes modalidades de la presente descripción, al décimo de la unidad del límite inferior de la variación, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

La solicitud se refiere a diversas patentes expedidas, solicitudes de patente publicadas, artículos periodísticos, y otras publicaciones, todas se incorporan en la presente como referencia. Si existiera un conflicto en cualquiera de las referencias incorporadas y la especificación actual, prevalecerá la especificación. Además, cualquier modalidad particular de la presente descripción que quede dentro de la técnica anterior se puede excluir explícitamente de cualquiera de una o más de las reivindicaciones. Debido a que se considera que estas modalidades serán conocidas por alguien con experiencia normal en la técnica, las mismas se pueden excluir incluso si la exclusión no se estableciera explícitamente en la presente. Cualquier modalidad particular de la presente descripción se puede excluir de cualquier reivindicación, por cualquier razón, ya sea que esté o no relacionada con la existencia de la técnica anterior.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar utilizando no más de una experimentación de rutina cualesquiera equivalentes a las modalidades específicas descritas en la presente. El alcance de las modalidades de la presente descritas

en la presente no pretende ser limitado por la descripción anterior, aunque en su lugar es como se establece en las reivindicaciones anexas. Aquellos con experiencia normal en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones a esta descripción sin apartarse del espíritu o alcance de la presente descripción, como se define en

5 las siguientes reivindicaciones.

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención como antecede, se considera como una novedad y, por lo tanto, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes

REIVINDICACIONES: