

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **045712**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2023.12.20**

(51) Int. Cl. **G01N 33/68** (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201990736**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.09.15**

---

(54) **БЕЛКОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ЗАБОЛЕВАНИЙ, АССОЦИИРОВАННЫХ С  
КОНТАКТНОЙ СИСТЕМОЙ АКТИВАЦИИ**

---

(31) **62/395,712; 62/518,492**

(32) **2016.09.16; 2017.06.12**

(33) **US**

(43) **2020.01.16**

(86) **PCT/US2017/051749**

(87) **WO 2018/053244 2018.03.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ТАКЕДА ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КОМПАНИ ЛИМИТЕД (JP)**

(72) Изобретатель:  
**Секстон Дэниел Дж., Висванатан  
Малини, Фосетт Райан, Гаур Трипти  
(US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-2015061183**

FARKAS HENRIETTE ET AL. "Nuts and Bolts" of Laboratory Evaluation of Angioedema", CLINICAL REVIEWS IN ALLERGY AND IMMUNOLOGY, HUMANA PRESS, TOTOWA, NJ, US, vol. 51, no. 2, 3 May 2016 (2016-05-03), pages 140-151, XP036056931, ISSN: 1080-0549, DOI: 10.1007/S12016-016-8539-6, [retrieved on 2016-05-03], abstract, tables 1-2

M. CUGNO ET AL. "Plasma biomarkers of acute attacks in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency", ALLERGY, vol. 64, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages 254-257, XP055419341, United Kingdom ISSN: 0105-4538, DOI: 10.1111/j.1398-9995.2008.01859.x, the whole document

**WO-A1-2015112578**

BORK KONRAD. "Diagnosis and treatment of hereditary angioedema with normal C1 inhibitor", ALLERGY, ASTHMA & CLINICAL IMMUNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 6, no. 1, 28 July 2010 (2010-07-28), page 15, XP021079196, ISSN: 1710-1492, DOI: 10.1186/1710-1492-6-15, the whole document

---

(57) Обеспечиваются способы и наборы для анализа биологического образца, полученного от субъекта, имеющего заболевание, с подозрением на наличие заболевания или имеющего риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации.

---

**B1**

**045712**

**045712 B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно 35 U.S.C. 119(e) предварительной заявки на патент США № 62/518492, поданной 12 июня 2017, и предварительной заявки на патент США № 62/395712, поданной 16 сентября 2016. Полное содержание каждой из указанных заявок включено в настоящий документ посредством ссылки.

### Уровень техники

Контактная система активации плазмы крови представляет собой провоспалительную и прокоагулянтную систему, включающую группу плазменных протеаз. Она активируется фактором XIIa при воздействии чужеродных или отрицательно заряженных поверхностей или на поверхности эндотелиальных клеток пролилкарбокисептидазами (Sainz I.M. et al., *Thromb. Haemost.* (2007) 98, 77-83). Несоответствующая или нерегулируемая контактная система активации вовлечена в развитие различных заболеваний, включая наследственный ангионевротический отек (НАЕ).

НАЕ представляет заболевание, которое вызывает эпизодические приступы отеков, которые могут возникать в различных частях тела, таких как лицо, конечности, половые органы, желудочно-кишечный тракт и верхние дыхательные пути. Поскольку симптомы НАЕ часто напоминают симптомы аллергии или кишечных колик, то пациентов с НАЕ часто трудно идентифицировать, пока у них не проявляются тяжелые или угрожающие жизни симптомы данного заболевания. Ранняя диагностика позволит лучше контролировать неотложные ситуации, включающие острые приступы НАЕ, а также поможет контролировать пациентов с НАЕ для предупреждения или ослабления острых приступов НАЕ, например, позволяя пациенту с НАЕ избегать воздействия стимулов, которые могут вызвать приступы НАЕ.

Следовательно, представляет большой интерес идентификация биомаркеров для НАЕ и разработка надежных диагностических и прогностических способов для выявления субъектов, страдающих определенными типами НАЕ или имеющих риск развития острого приступа НАЕ. Такие биомаркеры также будут полезными для изучения механизмов заболевания, что может способствовать разработке новых эффективных способов лечения заболевания.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение основано на идентификации белков, которые дифференциально присутствуют в биологических образцах, полученных от субъектов, имеющих заболевания, ассоциированные с контактной системой активации, по сравнению со здоровыми субъектами или дифференциально присутствуют в биологических образцах, полученных от субъектов на разных стадиях такого заболевания (например, приступ против состояния ремиссии).

Следовательно, один аспект настоящего изобретения обеспечивает способы анализа образца, включающие (i) обеспечение биологического образца (например, образца сыворотки или образца плазмы), полученного от субъекта, такого как человек, имеющего заболевание, с подозрением на наличие заболевания или с риском развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации; и (ii) измерение уровня панели биомаркеров, которая включает, по меньшей мере, один белок, выбранный из таблицы 1, где, если панель биомаркеров состоит из одного белка, то указанный белок не является C4, плазменным прекалликреином, тромбином, активатором плазминогена тканевого типа (tPA) и белком теплового шока 90. В некоторых вариантах заболевание, ассоциированное с контактной системой активации, представляет собой наследственный ангионевротический отек (НАЕ), такой как НАЕ I типа или НАЕ II типа.

В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров состоит из 2-10 белков, выбранных из табл. 1. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один белок представляет собой митохондриальный белок, который может представлять субъединицу O АТФ-синтазы (АТРО), циклофилин F или митохондриальный белок теплового шока 60 (HSP60). В некоторых вариантах, по меньшей мере, один белок представляет белок 14-3-3 зета/дельта или 14-3-3 бета/альфа. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один белок представляет протеинкиназу, которая может представлять протеинкиназу YES, протеинкиназу LYN или митоген-активируемую протеинкиназу 14 (MAPK14). В некоторых вариантах, по меньшей мере, один белок представляет киназу гликогенсинтазы-3-альфа/бета. В некоторых вариантах, по меньшей мере, один белок представляет АТФ-зависимую РНК-геликазу DDx19B (белок DEAD-box 19B). В некоторых вариантах, по меньшей мере, один белок представляет эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1 (eIF-5A-1).

В некоторых вариантах осуществления обеспечение биологического образца включает отбор биологического образца в вакуумную пробирку для забора крови, которая содержит один или более ингибиторов протеаз. В некоторых вариантах осуществления измерение уровня панели биомаркеров проводят с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуноблоттинга или латерального проточного иммуноанализа.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта как имеющего заболевание, ассоциированное с контактной системой, если уровень панели биомаркеров субъекта отклоняется от уровня той же панели биомаркеров у контрольного субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение субъекту эффективного количества терапевтического агента для лечения заболевания, такого как ингибитор плазменного калликреина (pKal),

ингибитор рецептора брадикинина 2 и/или ингибитор С1-эстеразы, если субъект идентифицирован как имеющий заболевание. В некоторых вариантах осуществления (например, ланаделумаб) или ингибиторный пептид (например, экаллантин). В некоторых примерах ингибитор рецептора брадикинина 2 представляет ингибиторный пептид (например, икатибант). В некоторых примерах ингибитор С1-эстеразы представляет выделенный из плазмы человека ингибитор человеческой С1-эстеразы.

В некоторых вариантах осуществления субъект представляет пациента-человека, который проходит лечение заболевания, и где способ дополнительно включает оценку эффективности лечения на основе уровня панели биомаркеров, отклонения уровня панели биомаркеров у субъекта от такового у контрольного субъекта, указывающих на эффективность лечения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию подходящего лечения для субъекта на основе уровня панели биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает идентификацию субъекта в качестве кандидата для лечения заболевания на основе уровня панели биомаркеров.

Настоящее изобретение обеспечивает биомаркеры, способные идентифицировать пациентов с заболеваниями, ассоциированными с контактной системой активации (например, НАЕ). Измерение уровней панелей биомаркеров также может быть полезным в оценке и лечении таких заболеваний.

В еще одном аспекте обеспечивается набор для анализа образца субъекта, имеющего заболевание, с подозрением на наличие заболевания или с риском развития заболевания, ассоциированного с контактной системой, где набор содержит первый связывающий агент, специфичный для первого белкового биомаркера, выбранного из табл. 1, и второй связывающий агент, специфичный для второго белкового биомаркера, выбранного из табл. 1; где первый белковый биомаркер и второй белковый биомаркер являются различными. В некоторых примерах первый и/или второй связывающий агент представляет антитело, специфичное к белковому маркеру. В некоторых вариантах осуществления набор может дополнительно содержать первый детектирующий агент, который связывается с первым связывающим агентом, и второй детектирующий агент, который связывается со вторым связывающим агентом. В некоторых вариантах осуществления первый связывающий агент и второй связывающий агент иммобилизованы на опорном элементе.

Детали одного или более вариантов осуществления настоящего раскрытия изложены в приведенном ниже описании. Другие признаки или преимущества настоящего раскрытия будут очевидны из следующих фигур и подробного описания нескольких вариантов осуществления, а также из прилагаемой формулы изобретения.

#### Краткое описание фигур

Следующие фигуры составляют часть настоящего описания и включены для дополнительной демонстрации определенных аспектов настоящего изобретения, которое можно лучше понять при обращении к одной или более из этих фигур в сочетании с подробным описанием конкретных вариантов осуществления, представленных в данном документе.

На фиг. 1 представлены столбчатые диаграммы, показывающие уровни белка, определенные в образцах плазмы от пациентов с НАЕ (тип I/тип II) на базальном уровне ("базальный уровень", N=33) и во время приступа НАЕ ("приступ", N=33) и здоровых субъектов ("нормальный уровень", N=22). А: уровни белка 4 системы комплемента (С4). В: уровни прекалликреина в образцах плазмы, полученных от здоровых субъектов (N=22), в образцах плазмы пациентов с НАЕ на базальном уровне (I/II типа) (N=33) и в образцах плазмы пациентов во время приступа НАЕ (I/II типа) (N=33). RFU - относительные единицы флуоресценции.

На фиг. 2 представлен график, показывающий уровень продукции плазменного калликреина после активации FXIIa в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("базальный уровень НАЕ", N=9), от пациентов с НАЕ во время приступа НАЕ ("приступ НАЕ", N=10) и от здоровых субъектов ("HV", N+28).

На фиг. 3 представлены столбчатые диаграммы, показывающие уровни белка ингибитора С1-эстеразы (С1-INH), определенные в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("НАЕ В", N=18) во время приступа НАЕ ("НАЕ А", N=19) и здоровых субъектов ("нормальный уровень", N=22). А: показан уровень С1-INH, определенный в образцах плазмы каждого субъекта, включая субъекта с выпадающим значением, обозначенным стрелкой. В: показан уровень С1-INH, определенный в образцах плазмы от каждого субъекта, без субъекта с выпадающим значением. RFU - относительные единицы флуоресценции. Среднее значение С1-INH в образцах плазмы от здоровых субъектов составляет  $6522 \pm 1852$  RFU (стандартное отклонение, SD). Среднее значение С1-INH в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ на базальном уровне, составляет  $1231 \pm 673$  RFU (SD), и среднее значение С1-INH в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ, составляет  $1082 \pm 530$  RFU (SD).

На фиг. 4 представлены столбчатые диаграммы, показывающие уровни нескольких белков, участвующих в митохондриальной функции, определенных в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("НАЕ В") и во время приступа НАЕ ("НАЕ А"), и здоровых субъектов ("нормальный уровень"). А: уровень субъединицы О АТФ-синтазы. В: уровень циклофилина F. С: уровень митохондриального белка теплового шока 60 (HSP60). RFU - относительные единицы флуоресценции.

ции.

На фиг. 5 представлены столбчатые диаграммы, показывающие уровни белка 4-3-3 зета/дельта, определенные в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("НАЕ В", N=33) и во время приступа НАЕ ("НАЕ А", N=33) и здоровых субъектов ("нормальный уровень", N=22). RFU - относительные единицы флуоресценции.

На фиг. 6 представляет столбчатые диаграммы, показывающие уровни белка IL-1F6 в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("НАЕ В", N=33) и во время приступа НАЕ ("НАЕ А", N=33) и здоровых субъектов ("нормальный уровень", N=22). RFU - относительные единицы флуоресценции.

На фиг. 7 представлен график, показывающий уровни протеинкиназы в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("базальный уровень, НАЕ"), от пациентов с НАЕ во время приступа НАЕ ("приступ НАЕ") и от здоровых субъектов ("HV"). А: уровень тирозинпротеинкиназы (YES). В: уровень тирозинпротеинкиназы Lyn (LYN). С: уровень митоген-активируемой протеинкиназы 14 (МАРК14). RFU - относительные единицы флуоресценции.

На фиг. 8 представляет график, показывающий уровни белка киназы гликогенсинтазы-3-альфа/бета (GSK-3 альфа/бета) в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("базальный уровень, НАЕ"), от пациентов с НАЕ во время приступа НАЕ ("приступ НАЕ") и от здоровых субъектов ("HV"). RFU - относительные единицы флуоресценции.

На фиг. 9 представлен график, показывающий уровни белка АТФ-зависимой РНК-геликазы DDX19B (белка DEAD-box 19B) в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("базальный уровень, НАЕ"), от пациентов с НАЕ во время приступа НАЕ ("приступ НАЕ") и от здоровых субъектов ("HV"). RFU - относительные единицы флуоресценции.

На фиг. 10 представлен график, показывающий уровни белка эукариотического фактора инициации трансляции 5A1 (eIF-5A-1) в образцах плазмы от пациентов, имеющих НАЕ (I тип/II тип) на базальном уровне ("базальный уровень, НАЕ"), от пациентов с НАЕ во время приступа НАЕ ("приступ НАЕ") и от здоровых субъектов ("HV"). RFU - относительные единицы флуоресценции.

#### **Подробное описание изобретения**

Контактная система активации инициирует внутренний путь свертывания крови и способствует воспалению посредством высвобождения провоспалительного пептида брадикинина. Фактор XII (FXII), также известный как фактор Хагемана, представляет собой сериновую протеазу, которая играет роль в активации внутренних путей коагуляции, а также калликреин-кининовой системы. FXII активируется отрицательно заряженными поверхностями (например, полианионными поверхностями, стеклом, полифосфатом, эллаговой кислотой) для продукции активной формы FXIIa. Активированный FXIIa обладает способностью расщеплять прекалликреин, образуя активный rKал. Затем активированный rKал способен расщеплять FXII с образованием FXIIa, что приводит к петле положительной обратной связи, в которой FXIIa генерирует еще больше rKал, который дополнительно активирует дополнительный FXII с образованием FXIIa. Активированный rKал также способен расщеплять высокомолекулярный кининоген (HMWK) с высвобождением брадикинина. При заболеваниях, ассоциированных с контактной системой активации, таких как НАЕ, повышенный уровень брадикинина может индуцировать расширение сосудов и воспаление, что приводит к приступам отеков НАЕ. Желательно идентифицировать новые биомаркеры, которые можно использовать, например, для идентификации заболеваний, опосредованных контактной системой активации, идентификации субъектов, имеющих заболевание или имеющих риск развития такого заболевания.

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере, частично, на идентификации белков, которые дифференциально присутствуют в биологических образцах, полученных от субъектов, имеющих заболевание, ассоциированное с контактной системой активации (например, на базальном уровне или во время приступа), по сравнению со здоровыми субъектами посредством протеомного анализа. Неожиданно было обнаружено, что белки, относящиеся к определенным клеточным путям или процессам (например, белки, участвующие в митохондриальной функции), и белки, принадлежащие к семействам белков (например, семейству белков из 7 членов), имеют сходные тенденции (например, повышенные или пониженные уровни) в образцах от субъектов, имеющих заболевание, по сравнению со здоровыми субъектами.

Следовательно, обеспечиваются способы анализа биологических образцов от субъектов, имеющих заболевание, с подозрением на наличие заболевания или с риском развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации (например, НАЕ), посредством детектирования присутствия или измерения уровня панели белковых биомаркеров. Такие способы могут быть пригодными, например, для идентификации пациентов, которые имеют риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации (например, НАЕ), отбора кандидата для лечения, мониторинга прогрессирования заболевания или стадии заболевания, оценки эффективности лечения заболевания, определения курса лечения, оценки того, насколько субъект имеет риск развития приступа заболевания, выявления того, насколько заболевание или расстройство ассоциировано с контактной системой активации, и/или для исследовательских целей, включая, например, изучение механизма заболевания и/или биологических

путей/процессов, вовлеченных в заболевание, на которые можно основываться при разработке новых методов лечения.

Белковые биомаркеры контактной системы активации.

Способы и наборы, описанные здесь, основаны, по меньшей мере, частично, на идентификации белков, которые, как было установлено, дифференциально присутствуют в образцах от субъектов, имеющих НАЕ, по сравнению с образцами от здоровых субъектов, и/или дифференциально присутствуют в образцах от субъектов на различных стадиях такого заболевания (например, базальный уровень или приступ). Как здесь используется, термин "белковый биомаркер" или "панель белковых биомаркеров" относится к белку или панели белков, которые присутствуют на разных уровнях в образцах от разных групп субъектов, например, субъектов, имеющих заболевание, ассоциированное с контактной системой, по сравнению со здоровыми субъектами (например, субъектами, у которых заболевание отсутствует), или субъектов, имеющих заболевание и находящихся на стадии ремиссии, по сравнению с субъектами, у которых имеет место приступ заболевания. Такой биомаркер/панель биомаркеров можно использовать как в диагностических/прогностических применениях, так и в неклинических применениях (например, в исследовательских целях).

В некоторых вариантах осуществления белковый биомаркер может присутствовать на повышенном уровне в образцах от субъектов, имеющих заболевание, ассоциированное с контактной системой активации (например, НАЕ), по сравнению с уровнем того же белкового биомаркера в образцах от здоровых субъектов. В некоторых вариантах осуществления белковый биомаркер может присутствовать на пониженном уровне в образцах от субъектов, имеющих заболевание, ассоциированное с контактной системой активации (например, НАЕ), по сравнению с уровнем биомаркера в образцах от здоровых субъектов. В еще одних случаях белковый биомаркер может присутствовать на повышенном уровне в образцах, полученных от субъектов, имеющих приступ заболевания, как здесь описано, по сравнению с субъектами во время ремиссии заболевания. Альтернативно, белковый биомаркер может присутствовать на пониженном уровне в образцах, полученных от субъектов, имеющих приступ заболевания, как здесь описано, по сравнению с субъектами во время ремиссии заболевания.

В некоторых вариантах осуществления панель белковых биомаркеров, содержащую один или более биомаркеров, можно анализировать способами, описанными здесь. Когда панель белковых биомаркеров включает более одного биомаркера, то все биомаркеры могут присутствовать на повышенных или пониженных уровнях у субъектов, имеющих заболевание, по сравнению со здоровыми субъектами. Альтернативно, панель белковых биомаркеров может включать, по меньшей мере, один биомаркер, который повышен у субъектов, имеющих заболевание, по сравнению со здоровыми субъектами, и, по меньшей мере, один биомаркер, который понижен у субъектов, имеющих заболевание, по сравнению со здоровыми субъектами.

Аналогичным образом, панель белковых биомаркеров для дифференциации субъектов, имеющих приступ заболевания, от субъектов, находящихся в состоянии ремиссии, панель биомаркеров может включать многочисленные биомаркеры, которые все повышены или понижены на первой стадии заболевания (например, приступ) по сравнению со второй стадией заболевания (например, ремиссия). Альтернативно, панель биомаркеров может включать, по меньшей мере, один биомаркер, который повышен на первой стадии заболевания по сравнению со второй стадией заболевания, и, по меньшей мере, один биомаркер, который понижен на первой стадии заболевания по сравнению со второй стадией заболевания.

В приведенной ниже табл. 1 представлены маркеры, которые можно оценить с помощью способов, описанных здесь, для оценки субъектов или биологических образцов от субъектов на предмет заболеваний, ассоциированных с контактной системой активации.

В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров, которая должна измеряться и анализироваться в любом из способов, описанных здесь, включает, по меньшей мере, один (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более) белков, выбранных из табл. 1. Когда панель биомаркеров включает один белок, то этот белок не может быть белком 4 системы комплемента (C4), C1-ингибитором, прекалликреином, белком теплового шока 90, активатором плазминогена тканевого типа или тромбином. В некоторых примерах панель биомаркеров, которая должна измеряться и анализироваться способом, описанным здесь, не включает комбинацию любого из белка 4 системы комплемента (C4), C1-ингибитора, прекалликреина, белка теплового шока 90, активатора плазминогена тканевого типа и тромбина.

Как описано в примере 1, неожиданно было обнаружено, что несколько белков, вовлеченных в митохондриальную функцию, дифференциально присутствовали в образцах от субъектов, имеющих НАЕ, по сравнению со здоровыми субъектами. В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров включает один или более митохондриальных белков, приведенных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления панель митохондриальных белковых биомаркеров включает субъединицу O АТФ-синтазы (АТРО), митохондриальный белок теплового шока 60 (HSP60), циклофилин F (также относится к циклофилину D или пептидил-пролил-цис-транс-изомеразе F; EC: 5.2.1.8) или их комбинацию.

Также как описано в примере 1, было также обнаружено, что несколько белков, относящихся к родственному семейству белков, были дифференциально представлены в образцах от субъектов, имеющих НАЕ, по сравнению со здоровыми субъектами. В некоторых вариантах осуществления биомаркер пред-

ставляет белок 14-3-3 зета/дельта или 14-3-3 бета/альфа. В некоторых вариантах осуществления биомаркером является протеинкиназа, такая как тирозинпротеинкиназа YES, тирозинпротеинкиназа LYN или митоген-активируемая протеинкиназа 14 (MARK14), или их комбинация. В некоторых вариантах осуществления биомаркером является киназа гликогенсинтазы-3-альфа/бета (GSK-3-альфа/бета). В некоторых вариантах осуществления биомаркером является АТФ-зависимая РНК-геликаза DDX19B (белок DEAD-box DDX19B). В некоторых вариантах осуществления биомаркером является эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1 (eIF-5A-1). Любая комбинация этих белковых биомаркеров также входит в объем настоящего изобретения.

Таблица 1  
Биомаркеры контактной системы активации

Белок	q	p	n	C-Stat	C-Stat вероятн ость	T-тест, если означает объединенную дисперсию	Приступ/ нормальный уровень	Базальный/ нормальный уровень	Приступ/ба зальный уровень
Белок C4 системы комплемента	6,81E-09	5,20E-12	5,20E+01	0,998	6,70E-02	2,07E-33	0,10	0,16	0,62
Интерлейкин-36 альфа (IL-1F6)	1,07E-08	1,63E-11	4,97E+01	0,986	9,80E-05	1,53E-13	0,19	0,24	0,78
Эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1 (eIF-5A-1)	7,80E-04	6,91E-05	1,92E+01	0,947	2,19E-05	2,93E-05	1,36	1,41	0,96
Митохондриальный белок теплового шока 60 кДа (HSP 60)	3,00E-07	1,12E-09	4,12E+01	0,938	5,22E-05	1,16E-06	2,88	3,77	0,76
Семейство белков 14-3-3	4,09E-07	2,75E-09	3,94E+01	0,938	4,65E-05	6,79E-03	2,32	2,77	0,83
АТФ-зависимая РНК- геликаза DDX19B (белок DEAD-box 19B)	3,00E-07	1,14E-09	4,12E+01	0,936	4,27E-05	2,21E-05	1,82	2,03	0,89
Митоген- активируемая протеинкиназа 14 (MARK14)	4,09E-07	3,61E-09	3,89E+01	0,934	2,23E-05	1,89E-03	1,65	1,88	0,88
Тирозинпротеинкина за Lyn (LYN)	4,09E-07	3,59E-09	3,89E+01	0,934	9,56E-05	9,58E-07	3,16	3,80	0,83
Киназа гликогенсинтазы-3- альфа/бета (GSK-3 альфа/бета)	4,09E-07	3,75E-09	3,88E+01	0,933	2,50E-05	7,34E-05	2,18	2,45	0,89
Тирозинпротеинкина за (YES)	4,09E-07	3,37E-09	3,90E+01	0,933	3,79E-05	9,96E-04	1,36	1,54	0,88
Митоген- активируемая протеинкиназа 3 (ERK-1)	5,06E-07	6,18E-09	3,78E+01	0,929	1,28E-05	1,78E-05	1,89	2,05	0,92
Цитохром P450 3A4	5,06E-07	5,69E-09	3,80E+01	0,928	1,27E-05	1,27E-05	1,66	1,89	0,88
Протеинкиназа C альфа-типа (PKC-A)	5,06E-07	5,99E-09	3,79E+01	0,927	2,80E-05	8,36E-06	3,79	4,40	0,86
Тирозинпротеинкина за Lyn, изоформа B (LYNB)	5,06E-07	5,93E-09	3,79E+01	0,927	4,92E-05	3,73E-08	3,09	3,59	0,86
Белок C2 системы комплемента	5,41E-07	7,02E-09	3,75E+01	0,922	3,90E-06	8,45E-14	0,61	0,68	0,90
Тирозинпротеинкина за CSK (CSK)	8,54E-07	1,17E-08	3,65E+01	0,920	2,35E-05	4,67E-04	3,34	3,93	0,85
Сортирующий нексин 4	9,51E-07	1,38E-08	3,62E+01	0,919	2,89E-05	5,03E-05	2,36	2,62	0,90
Малый убиквитин- подобный модификатор 3	2,11E-05	1,19E-06	2,73E+01	0,918	6,75E-06	1,70E-09	1,50	1,72	0,87

(SUMO3)										
Протеиндисульфидизомераза A3	1,12E-06	1,78E-08	3,57E+01	0,917	2,52E-05	2,87E-04	1,58	1,75	0,90	
MAP киназа-активируемая протеинкиназа 2 (MARK2)	1,28E-06	2,52E-08	3,50E+01	0,915	1,40E-05	6,75E-05	2,31	2,53	0,91	
Тирозинпротеинкиназа BTK (BTK)	1,12E-06	1,89E-08	3,56E+01	0,914	1,98E-05	2,34E-03	3,20	3,77	0,85	
EGF-содержащий фибулин-подобный белок 1 внеклеточного матрикса (FBLN3)	4,01E-04	3,34E-05	2,06E+01	0,913	1,26E-05	2,87E-07	1,26	1,25	1,01	
Комплекс циклинзависимая киназа 8:циклин-С (CDK8/циклин С)	1,30E-06	2,68E-08	3,49E+01	0,913	2,29E-05	2,56E-04	1,31	1,41	0,93	
Пируваткиназа PKM (M2-PK)	1,28E-06	2,50E-08	3,50E+01	0,912	1,86E-05	6,82E-05	2,70	3,01	0,89	
Белок 14-3-3 тета	3,13E-03	3,45E-04	1,59E+01	0,910	2,55E-05	1,35E-03	1,19	1,26	0,94	
Тирозинпротеинкиназа Fer (FER)	1,62E-06	4,21E-08	3,40E+01	0,908	4,12E-05	7,68E-04	2,79	3,15	0,89	
Тирозинпротеинкиназа Fyn (FYN)	1,49E-06	3,74E-08	3,42E+01	0,908	1,22E-04	1,20E-04	1,88	2,08	0,91	
71кДа-гомолог белка теплового шока (HSP70 белок 8)	5,62E-03	6,99E-04	1,45E+01	0,906	2,28E-05	3,88E-06	1,23	1,29	0,95	
Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза D (PP1D)	1,98E-06	5,60E-08	3,34E+01	0,906	7,48E-05	6,23E-04	3,32	3,68	0,90	
RAC-альфа/бета/гамма серин/треониновая протеинкиназа (PKBa/b/g)	1,49E-06	3,75E-08	3,42E+01	0,906	2,77E-05	2,07E-03	1,74	2,08	0,84	
Кальцийерин	1,68E-06	4,48E-08	3,38E+01	0,905	6,52E-05	4,21E-03	1,79	2,06	0,87	
Гистон-лизин-N-метилтрансфераза EHMT2 (NG36)	4,47E-03	5,26E-04	1,51E+01	0,900	4,74E-05	2,68E-04	0,73	0,73	0,99	
Хаа-Pro аминопептидаза 1 (XPPEP1)	1,40E-06	3,10E-08	3,46E+01	0,899	4,41E-05	8,70E-04	1,79	2,42	0,74	
3-гидроксиацил-CoA- дегидрогеназа типа-2 (ERAB)	1,75E-06	4,80E-08	3,37E+01	0,897	3,39E-05	8,61E-03	1,88	2,37	0,79	
Серин/треониновая протеинкиназа PAK6 (PAK6)	3,10E-06	1,05E-07	3,21E+01	0,896	6,78E-05	1,07E-04	3,55	3,55	1,00	
Белок 1 внутриклеточных хлоридных каналов (NCC27)	2,88E-06	8,80E-08	3,25E+01	0,896	1,97E-05	3,38E-03	2,21	2,57	0,86	

Белок 2, связанный с рецептором фактора роста (адаптерный белок GRB2)	1,28E-06	2,49E-08	3,50E+01	0,895	1,31E-04	6,14E-04	2,66	3,23	0,82
Сфингозинкиназа 1	2,91E-06	9,55E-08	3,23E+01	0,894	3,34E-05	1,32E-04	2,45	2,80	0,88
Метионинаминопептидаза 1 (METAP1)	2,91E-06	9,34E-08	3,24E+01	0,894	7,58E-05	3,97E-03	1,90	2,19	0,87
C1r-субкомпонент системы комплемента	3,10E-06	1,06E-07	3,21E+01	0,893	3,05E-05	9,79E-09	1,72	1,62	1,06
Убиквитин-подобный модификатор-конъюгирующий фермент 1 (UFC1)	2,71E-06	8,07E-08	3,27E+01	0,892	2,99E-05	1,17E-05	1,52	1,75	0,87
Переносчик сигнала и активатор транскрипции 1-альфа/бета (STAT1)	4,07E-06	1,50E-07	3,14E+01	0,890	4,75E-05	5,44E-05	2,20	2,27	0,97
Альфа-энолаза	4,07E-06	1,43E-07	3,15E+01	0,889	2,61E-05	2,18E-04	1,81	2,03	0,89
Переносчик сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3)	4,07E-06	1,47E-07	3,15E+01	0,889	1,06E-04	3,14E-03	1,82	2,09	0,87
Трансляционно контролируемый	4,07E-06	1,52E-07	3,14E+01	0,888	5,11E-05	1,24E-03	1,93	2,24	0,86
опухолевый белок (TSTR)									
Матери против декапентаплегического гомолога 3 (SMAD3)	5,47E-06	2,13E-07	3,07E+01	0,887	6,69E-05	6,78E-05	1,53	1,57	0,97
Киназа 1 бета-адренорецептора (BARK1)	4,53E-06	1,73E-07	3,11E+01	0,887	5,28E-05	3,47E-04	2,07	2,34	0,88
Митоген-активируемая протеинкиназа 1 (MK01)	5,68E-06	2,25E-07	3,06E+01	0,886	1,11E-04	2,67E-04	1,82	1,89	0,97
Матери против декапентаплегического гомолога 2 (SMAD2)	6,40E-06	2,64E-07	3,03E+01	0,881	2,66E-05	2,80E-04	2,05	2,29	0,89
cAMP-регулируемый фосфопротеин 19 (ARP19)	7,11E-06	3,10E-07	3,00E+01	0,879	5,17E-05	5,74E-04	1,72	1,82	0,94
Белок созревания рибосом SBDS (SBDS)	7,50E-06	3,32E-07	2,98E+01	0,879	5,76E-05	5,27E-04	2,00	2,23	0,90
Легкая цепь динеина roadblock-type 1 (DLRB1)	6,94E-06	2,91E-07	3,01E+01	0,879	4,10E-04	8,47E-03	1,87	2,36	0,79
Bcl-2-подобный белок 1	7,96E-06	3,65E-07	2,96E+01	0,876	5,45E-05	2,85E-04	1,23	1,38	0,89



Белок 14-3-3 бета/альфа	1,02E-05	4,73E-07	2,91E+01	0,876	4,66E-05	3,93E-03	1,77	2,00	0,88
Эукариотический фактор инициации трансляции 4 гамма 2 (IF4G2)	5,89E-06	2,38E-07	3,05E+01	0,875	6,94E-05	1,18E-03	2,49	3,33	0,75
Протеинфосфатаза 3 двойной специфичности (DUS3)	7,96E-06	3,60E-07	2,97E+01	0,875	3,39E-03	9,30E-03	1,53	1,92	0,80
Белок, содержащий суперспиральный домен 80 (URB)	1,05E-05	5,01E-07	2,90E+01	0,874	5,64E-05	4,13E-06	1,37	1,26	1,09
Белок теплового шока бета-1 (HSP 27)	1,08E-05	5,29E-07	2,89E+01	0,873	4,77E-05	4,69E-05	2,49	2,66	0,94
Кофилин-1 (кофилин-1)	1,05E-05	5,04E-07	2,90E+01	0,872	5,73E-05	7,02E-05	1,49	1,63	0,92
3-фосфоинозитид- зависимая протеинкиназа 1 (PDK1)	1,24E-05	6,34E-07	2,85E+01	0,871	9,29E-05	2,61E-03	2,00	2,29	0,87
Интерлейкин-17B (IL-17B)	1,31E-05	6,82E-07	2,84E+01	0,871	5,83E-02	1,63E-02	0,88	0,89	0,99
Нуклеозиддифосфат- киназа B (NDP- киназа B)	1,15E-05	5,70E-07	2,88E+01	0,870	3,16E-05	2,79E-05	1,76	2,08	0,84
Ras-зависимый C3 субстрат ботулинистического токсина 1 (RAC1)	1,22E-05	6,16E-07	2,86E+01	0,869	2,48E-05	3,68E-04	1,84	2,13	0,86
Плазменный прекалликреин	2,50E-05	1,45E-06	2,69E+01	0,863	7,37E-06	4,30E-09	0,77	0,78	0,98
Тирозинпротеинкина за Tec (TEC)	2,26E-05	1,29E-06	2,71E+01	0,863	2,25E-04	4,14E-03	1,58	1,68	0,94
Медиатор транскрипции субъединицы 1 РНК- полимеразы II (MED-1)	9,52E-04	8,72E-05	1,87E+01	0,862	5,43E-05	4,05E-04	0,84	0,82	1,03
Тромбоцитарный гликопротеин VI (GPVI)	2,05E-05	1,14E-06	2,74E+01	0,862	3,53E-05	8,61E-04	1,65	1,94	0,85
Белок теплового шока HSP 90- альфа/бета (HSP 90a/b)	2,05E-05	1,13E-06	2,74E+01	0,862	1,26E-04	2,24E-03	1,63	1,87	0,87
Протеинкиназа C бета-типа (сплайсинговый вариант бета-II) (PKC-β-II)	1,37E-06	2,92E-08	3,47E+01	0,858	1,35E-04	2,25E-03	3,42	3,99	0,86
Глицилпептид N- тетрадеканойлтранс фераза 1 (NMT1)	2,86E-05	1,71E-06	2,66E+01	0,857	2,72E-04	2,26E-04	1,68	1,77	0,95
Бета-Ala-His	1,68E-03	1,64E-04	1,74E+01	0,856	4,30E-05	5,57E-04	0,68	0,63	1,08

дипептидаза (CNDP1)					04					
Альдегидредуктаза афлатоксина В1, член 2	2,86E-05	1,72E-06	2,65E+01	0,855	1,48E-04	1,66E-03	1,98	2,36	0,84	
Пептидил-пролил- цис/транс- изомераза А (циклофилин А)	2,99E-05	1,82E-06	2,64E+01	0,855	7,84E-05	2,10E-05	1,44	1,54	0,94	
Тромбопоэтин (Тро)	9,68E-04	8,94E-05	1,86E+01	0,855	1,15E-04	3,11E-04	1,28	1,40	0,91	
Белок amnionless (AMNLS)	4,20E-05	2,66E-06	2,57E+01	0,851	2,64E-05	2,53E-09	0,75	0,76	0,99	
Дребрин-подобный белок (DBNL)	7,00E-05	4,75E-06	2,45E+01	0,848	1,18E-04	3,14E-03	1,34	1,46	0,92	
Лактадгерин (MFGM)	5,96E-05	4,00E-06	2,49E+01	0,848	1,06E-05	2,60E-08	0,62	0,59	1,05	
Альфа-2- макроглобулин	5,24E-05	3,48E-06	2,51E+01	0,848	6,07E-05	4,39E-07	0,66	0,65	1,02	
Член 2 семейства метилтрансфераз НемК (HEMK2)	5,00E-05	3,25E-06	2,53E+01	0,848	2,84E-03	1,38E-02	1,38	1,51	0,91	
Ангиотензиноген	4,99E-05	3,20E-06	2,53E+01	0,847	8,71E-04	4,91E-09	0,64	0,61	1,04	
Трансгелин-2 (трансгелин-2)	3,13E-04	2,51E-05	2,12E+01	0,847	3,22E-03	1,63E-02	1,38	1,60	0,86	
Тирозинпротеинфосф атаза	8,07E-05	5,67E-06	2,42E+01	0,844	1,52E-	3,90E-03	1,69	1,84	0,92	
нерецепторная типа 6 (PTR-1C)					04					
Протеинкиназа С тета-типа (KPCТ)	5,08E-05	3,34E-06	2,52E+01	0,844	2,32E-04	1,83E-03	1,66	1,90	0,87	
Кальпаин I	9,12E-05	6,47E-06	2,39E+01	0,839	1,64E-04	1,32E-03	1,48	1,65	0,90	
Рецептор эпидермального фактора роста (ERBB1)	9,97E-05	7,31E-06	2,37E+01	0,836	5,63E-05	1,37E-06	0,81	0,81	1,01	
сАМР-зависимой протеинкиназы каталитическая субъединица альфа (PRKACA)	1,52E-05	8,14E-07	2,80E+01	0,836	8,71E-03	4,02E-02	1,70	2,68	0,63	
Глицеральдегид-3- фосфатдегидрогеназ а (GAPDH, печень)	9,97E-05	7,27E-06	2,37E+01	0,834	3,32E-04	1,84E-04	1,75	1,90	0,92	
Комплекс интегрин альфа-I: бета-1 (интегрин alb1)	1,32E-04	9,80E-06	2,31E+01	0,833	3,72E-04	2,64E-03	1,50	1,59	0,94	
фактор роста фибробластов 17 (FGF-17)	8,04E-05	5,59E-06	2,42E+01	0,832	2,84E-04	1,12E-06	0,86	0,85	1,02	
Белок теплового шока HSP 90-бета (HSP 90b)	3,51E-05	2,20E-06	2,61E+01	0,831	3,46E-04	3,72E-04	1,47	1,57	0,93	

Белок-ингибитор роста 1 (ING1)	1,73E-04	1,32E-05	2,25E+01	0,830	3,83E-04	4,08E-03	1,58	1,66	0,95
Кошаперон Hsp90 Cdc37 (CDC37)	1,92E-04	1,50E-05	2,22E+01	0,828	6,35E-03	1,64E-02	1,36	1,51	0,90
Фактор системы комплемента D	1,90E-04	1,47E-05	2,23E+01	0,826	1,15E-04	8,86E-07	1,22	1,24	0,98
Серотрансферрин (трансферрин)	1,69E-04	1,27E-05	2,26E+01	0,823	3,65E-05	2,11E-07	0,86	0,84	1,02
Белок вакуолярного сортирования-ассоциированный белок VTA1, гомолог (DRG-1)	2,99E-04	2,38E-05	2,13E+01	0,818	9,38E-03	6,18E-03	1,55	1,70	0,91
Адаптерная молекула crk (CRK)	7,67E-05	5,27E-06	2,43E+01	0,813	1,77E-03	6,63E-03	1,33	1,76	0,76
Метионинаминопептидаза 2 (AMPM2)	3,32E-04	2,71E-05	2,10E+01	0,812	1,25E-03	6,28E-04	1,50	1,63	0,92
Активатор плазминогена тканевого типа (tPA)	4,00E-04	3,30E-05	2,06E+01	0,809	9,44E-04	4,59E-04	1,68	1,77	0,95
Субъединица бета-1 импортина (IMB1)	2,17E-04	1,71E-05	2,20E+01	0,806	3,15E-02	3,92E-02	1,49	2,15	0,69
Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, субъединица дельта (CAMK2D)	5,25E-04	4,53E-05	2,00E+01	0,805	2,20E-03	9,71E-03	1,43	1,59	0,90
Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGFR2)	7,51E-04	6,59E-05	1,93E+01	0,802	1,02E-03	8,79E-05	0,82	0,83	0,99
Гистондеацетилаза 8 (HDAC8)	2,21E-03	2,35E-04	1,67E+01	0,802	1,82E-03	4,83E-02	1,15	1,19	0,96
Карбоангидраза 13	4,49E-04	3,77E-05	2,04E+01	0,801	3,99E-03	2,50E-02	1,64	2,31	0,71
Субъединица O АТФ-синтазы, митохондриальной (ATPO)	3,00E-07	1,05E-09	4,14E+01	0,800	4,56E-03	2,45E-03	3,76	4,34	0,87
Митоген-активируемая протеинкиназа 3 двойной специфичности (MP2K3)	4,48E-03	5,30E-04	1,51E+01	0,799	1,20E-04	7,84E-06	1,22	1,31	0,93
Гистон H2A.z	3,19E-04	2,58E-05	2,11E+01	0,795	7,40E-04	2,46E-03	1,69	1,42	1,19
Тирозинпротеинкиназа протоонкогенов Src (SRCN1)	1,28E-06	2,55E-08	3,50E+01	0,794	3,95E-03	9,74E-03	3,83	3,97	0,97
Бета-2-микроглобулин	2,21E-03	2,37E-04	1,67E+01	0,793	5,16E-04	8,62E-05	1,21	1,20	1,01
Гемоглобин	8,67E-04	7,75E-05	1,89E+01	0,791	4,41E-02	3,34E-03	0,33	0,35	0,93
Рецептор костного	1,26E-03	1,17E-04	1,81E+01	0,787	3,72E-	9,16E-06	0,75	0,72	1,05

морфогенетического белка типа-1A (BMPRIA)					04				
Нейрогенный локус, гомолог белка notch 1 (Notch 1)	1,57E-03	1,51E-04	1,76E+01	0,787	6,95E-05	1,22E-06	0,86	0,85	1,01
Тромбин	1,54E-03	1,47E-04	1,76E+01	0,786	3,40E-04	2,07E-02	0,52	0,55	0,95
Каллистратин	1,70E-03	1,73E-04	1,73E+01	0,786	2,01E-04	8,12E-06	0,83	0,85	0,98
Дизинтегрин А и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 13 (ATS13)	1,70E-03	1,71E-04	1,73E+01	0,785	5,40E-04	3,41E-05	0,73	0,74	1,00
Лактопероксидаза (PERL)	1,69E-03	1,67E-04	1,74E+01	0,784	6,52E-04	8,40E-05	0,67	0,73	0,91
Эукариотический фактор инициации трансляции 4Н (eIF-4H)	1,52E-05	8,01E-07	2,81E+01	0,783	4,09E-04	3,20E-05	2,17	3,32	0,65
Макрофагальный рецептор маннозы 1	2,17E-03	2,28E-04	1,68E+01	0,782	7,38E-04	2,04E-04	1,21	1,17	1,03
Е3 убиквитин- протеин-лигаза Mdm2 (MDM2)	4,79E-04	4,06E-05	2,02E+01	0,781	3,63E-03	6,30E-03	1,14	1,30	0,88
Супероксиддисмутаза [Mn],	2,03E-03	2,09E-04	1,69E+01	0,779	1,07E-03	1,24E-04	0,81	0,79	1,02
митохондриальная (Mn SOD)									
Член В семейства с лектиновым доменом С-типа (CLC1B)	1,70E-03	1,70E-04	1,74E+01	0,779	8,59E-04	4,74E-04	1,45	1,62	0,90
Рецептор D интерлейкина-17 (IL-17 RD)	2,36E-03	2,54E-04	1,66E+01	0,777	3,10E-03	6,05E-04	0,87	0,87	1,00
Е3 убиквитин- протеин-лигаза CHIP (CHIP)	2,17E-03	2,29E-04	1,68E+01	0,775	5,84E-02	4,07E-02	1,36	1,58	0,86
Рецептор фактора роста гепатоцитов (Met)	3,13E-03	3,49E-04	1,59E+01	0,772	7,58E-04	1,26E-04	0,84	0,83	1,01
Глобулин, связывающий половые гормоны (SHBG)	3,87E-03	4,40E-04	1,55E+01	0,770	1,80E-04	5,82E-07	0,41	0,43	0,96
Каспаза-3	2,36E-03	2,55E-04	1,65E+01	0,770	2,33E-02	2,29E-02	1,37	1,72	0,80
Катепсин L2 (катепсин V)	3,87E-03	4,44E-04	1,54E+01	0,769	3,64E-04	1,50E-05	0,70	0,74	0,94
Молекула 1 адгезии нервных клеток, изоформа 120 кДа (NCAM-120)	3,68E-03	4,13E-04	1,56E+01	0,769	6,59E-04	1,22E-04	0,80	0,80	0,99
Белок 6, связывающий	5,63E-03	7,10E-04	1,45E+01	0,766	8,96E-04	5,00E-04	1,17	1,17	0,99

инсулиноподобный фактор роста (IGFBR-6)										
Интерлейкин-19 (IL-19)	5,62E-03	6,92E-04	1,46E+01	0,763	4,61E-04	7,78E-05	0,83	0,80	1,04	
Член К семейства 4 с лектиновым доменом С-типа (CLC4K)	5,14E-03	6,16E-04	1,48E+01	0,761	9,87E-03	4,73E-03	0,91	0,91	1,01	
Цепь тропомиозина альфа-4 (тропомиозина 4)	4,09E-07	2,95E-09	3,93E+01	0,761	5,91E-04	1,08E-04	4,21	4,39	0,96	
Фрагмент фибронектина 3 (FN1.3)	5,45E-03	6,66E-04	1,46E+01	0,759	1,65E-03	6,75E-04	1,35	1,34	1,01	
Белок 14-3-3 зета/дельта	1,12E-06	1,79E-08	3,57E+01	0,758	2,43E-03	8,35E-04	2,22	2,28	0,97	
Дипептидилпептидаза 2 (DPP2)	9,74E-03	1,38E-03	1,32E+01	0,757	3,56E-03	6,71E-04	0,86	0,85	1,01	
Фосфоглицератмутаза 1	7,04E-03	9,14E-04	1,40E+01	0,757	1,11E-02	1,20E-02	2,49	2,56	0,97	
Рецептор интерлейкина-1 типа 2 (IL-1 sRII)	7,08E-03	9,34E-04	1,40E+01	0,756	4,01E-04	8,44E-05	0,83	0,81	1,03	
Склеростин (SOST)	7,82E-03	1,06E-03	1,37E+01	0,755	1,33E-03	3,73E-04	1,60	1,40	1,15	
Белок 1, связывающий	7,08E-03	9,34E-04	1,40E+01	0,755	3,37E-03	4,27E-04	0,37	0,40	0,94	
инсулиноподобный фактор роста (IGFBR-1)										
Гомолог Roundabout 3 (ROBO3)	6,83E-03	8,81E-04	1,41E+01	0,755	6,67E-02	1,54E-02	0,81	0,77	1,04	
Белок, связывающий жирные кислоты, сердце (FABP)	5,14E-03	6,21E-04	1,48E+01	0,754	1,78E-02	7,60E-03	1,47	1,58	0,93	
Пропердин	6,55E-03	8,40E-04	1,42E+01	0,754	1,25E-03	1,28E-04	1,18	1,25	0,95	
Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 3 (VEGF sR3)	7,08E-03	9,26E-04	1,40E+01	0,754	5,66E-03	2,36E-03	0,80	0,77	1,04	
Гистон H2B типа 2-E (H2B2E)	4,32E-03	5,04E-04	1,52E+01	0,752	2,11E-03	1,46E-03	1,58	1,36	1,17	
Сериновая протеаза HTRA2, митохондриальная (HTRA2)	2,73E-03	2,98E-04	1,62E+01	0,751	2,18E-03	1,83E-03	1,21	1,38	0,88	
Рецептор нетрина UNC5D (UNC5H4)	8,30E-03	1,14E-03	1,36E+01	0,751	1,18E-03	3,14E-04	0,79	0,76	1,04	
Гаптоглобин	9,47E-03	1,32E-03	1,33E+01	0,749	1,17E-03	3,40E-04	3,10	2,62	1,18	
Карбоангидраза 6	8,15E-03	1,11E-03	1,36E+01	0,746	1,97E-03	2,88E-05	0,54	0,49	1,09	
Белок C4b системы комплемента	4,58E-03	5,46E-04	1,50E+01	0,741	6,25E-03	3,06E-03	1,54	1,86	0,83	

Фактор некроза опухолей-индуцибельного гена белок 6 (TSG-6)	9,57E-03	1,34E-03	1,32E+01	0,740	1,01E-03	1,85E-04	0,80	0,72	1,10
Кальций/ кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, субъединица альфа (CAMK2A)	9,10E-03	1,26E-03	1,34E+01	0,728	1,44E-02	2,92E-02	1,13	1,29	0,88
PIK3CA/PIK3R1 (PIK3CA/PIK3R1)	9,13E-03	1,27E-03	1,33E+01	0,710	2,31E-02	2,42E-02	1,17	1,37	0,85
NudC домен-содержащий белок 3 (NUDC3)	7,45E-03	1,00E-03	1,38E+01	0,708	2,69E-02	2,03E-02	1,10	1,28	0,86

#### Применения белковых биомаркеров.

Один аспект настоящего изобретения относится к способам анализа образцов, полученных от субъектов (например, пациентов-людей), имеющих заболевание, с подозрением на наличие заболевания или с риском развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации, посредством измерения уровня панели биомаркеров, как здесь описано, в образце. Результаты, полученные с помощью таких способов анализа, будут пригодны для диагностических и/или прогностических целей, а также для других неклинических целей, таких как исследовательские цели.

##### (i) Анализ биологических образцов.

Способы, описанные здесь, включают обеспечение биологического образца, полученного от субъекта. Как здесь используется, термин "биологический образец" относится к композиции, которая включает ткань, например, кровь, плазму или белок, от субъекта. Образец включает как исходный необработанный образец, отобранный у субъекта, так и затем обработанный образец, например, частично очищенные или консервированные формы. Типичные образцы включают кровь, плазму, слезы или слюну. В некоторых вариантах осуществления образец представляет образец жидкости организма, такой как образец сыворотки или плазмы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта можно отобрать несколько (например, по меньшей мере, 2, 3, 4, 5 или более) биологических образцов в течение времени или на определенные интервалы времени, например, для оценки прогрессирования заболевания или оценки эффективности лечения.

Биологический образец можно получить от субъекта с использованием любых средств, известных в данной области. В некоторых вариантах осуществления образец получают от субъекта посредством отбора образца (например, образца крови) в вакуумную пробирку для забора крови (например, вакуумную пробирку для сбора крови). В некоторых вариантах осуществления вакуумная пробирка для забора крови содержит один или более ингибиторов протеаз, например, для снижения или предупреждения активации контактной системы *ex vivo* во время отбора образцов. Такие ингибиторы протеаз могут содержаться в жидкой формуляции. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы протеаз включают, по меньшей мере, один ингибитор сериновой протеазы и, по меньшей мере, один ингибитор цистеиновой протеазы. Такие вакуумные пробирки для забора крови известны в данной области. См., например, заявку на патент США РСТ № US2016/046681. Необязательно, вакуумная пробирка для забора крови может дополнительно содержать один или более антикоагулянтов.

Термины "пациент", "субъект" или "индивидуум" могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к субъекту, который нуждается в анализе, описанном здесь. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека или млекопитающее, отличное от человека. В некоторых вариантах осуществления у субъекта подозревается или имеется риск развития заболевания или расстройства, ассоциированного с контактной системой активации (например, НАЕ). У такого субъекта может проявляться один или более симптомов, связанных с заболеванием. Альтернативно или в дополнение, такой субъект может иметь один или более факторов риска для развития заболевания, например, генетический фактор, связанный с заболеванием (например, генетический дефект в C1-INH).

Альтернативно, субъект, который нуждается в анализе, описанном здесь, может представлять пациента, у которого имеется заболевание. Такой субъект может иметь приступ заболевания на данный момент или может страдать заболеванием в прошлом (например, данный момент имеет место ремиссия). В некоторых примерах субъектом является пациент-человек, который может проходить лечение заболевания, например, лечение, включающее ингибитор C1-эстеразы (C1-INH), ингибитор плазменного калликреина или ингибитор брадикинина. В других случаях у такого пациента-человека такое лечение может отсутствовать.

Примеры заболеваний, ассоциированных с контактной системой активации, включают, без ограничения, калликреин-опосредованные заболевания, например, брадикинин-опосредованное заболевание, такое как наследственный ангионевротический отек (НАЕ), гистамин-независимый идиопатический ангионевротический отек, ревматоидный артрит, болезнь Крона, красную волчанку, болезнь Альцгеймера,

септический шок, ожог, ишемическое/реперфузионное повреждение головного мозга, отек головного мозга, диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию, макулярный отек, васкулит, артериальный или венозный тромбоз, тромбоз, ассоциированный с желудочковыми вспомогательными устройствами или стенками, гепарин-индуцированную тромбоцитопению с тромбозом, тромбозомболическую болезнь и ишемическую болезнь сердца с нестабильной стенокардией, отеки, глазное заболевание, подагру, заболевания кишечника, оральные мукозиты, невропатическую боль, воспалительную боль, стеноз позвоночного канала-дегенеративное заболевание позвоночника, послеоперационный илеус, аневризму аорты, остеоартрит, наследственный ангионевротический отек, легочную эмболию, инсульт, травму головы или перипохолевые отеки в головном мозге, сепсис, острое ишемическое событие в средней мозговой артерии (МСА) (инсульт), рестеноз (например, после ангиопластики), волчаночный нефрит, аутоиммунное заболевание, воспалительное заболевание, сердечно-сосудистое заболевание, неврологическое заболевание, связанное с нарушением фолдинга белков, заболевание, ассоциированное с ангиогенезом, гипертензивную нефропатию и диабетическую нефропатию, аллергические и респираторные заболевания (например, анафилаксия, астма, хроническая обструктивная болезнь легких, острый респираторный дистресс-синдром, кистозный фиброз, персистирующий ринит) и повреждения тканей (например, ожог или химическое повреждение).

В некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние, которое ассоциировано с контактной системой активации, представляет наследственный ангионевротический отек (НАЕ). Наследственный ангионевротический отек (НАЕ) также известен как "отек Квинке", недостаточность ингибитора С1-эстеразы, недостаточность С1-ингибитора и врожденный ангионевротический отек (НАНЕ). НАЕ характеризуется рецидивирующими эпизодами сильных отеков (ангионевротических отеков), которые могут поражать, например, конечности, лицо, половые органы, желудочно-кишечный тракт и дыхательные пути. Симптомы НАЕ включают, например, отеки рук, ног, губ, глаз, языка и/или горла; блокаду дыхательных путей, которая может включать отек горла и внезапную охриплость; рецидивирующие эпизоды спастических болей в животе без явной причины; и/или отеки в кишечнике, которые могут быть тяжелыми и могут привести к спастическим болям в животе, рвоте, обезвоживанию, диарее, боли и/или шоку. Примерно у трети субъектов с НАЕ во время приступа появляются высыпания, не сопровождающиеся зудом, называемые кольцевидной эритемой.

Отек дыхательных путей может угрожать жизни и привести к фатальному исходу у некоторых пациентов. Смертность оценивается на уровне 15-33%. НАЕ приводит примерно к необходимости в 15000-30000 обращениях в год в отделения неотложной помощи.

Травма или стресс, например, стоматологические процедуры, заболевание (например, вирусные заболевания, такие как простуда и грипп), менструация и хирургическое вмешательство могут вызвать приступ ангионевротического отека. Для предупреждения острых приступов НАЕ, пациенты могут попытаться избежать воздействия определенных стимулов, которые ранее вызывали приступы. Однако во многих случаях приступ развивается без известного стимула. Как правило, симптомы НАЕ впервые появляются в детстве и усугубляются во время пубертатного периода. В среднем, в отсутствии лечения у субъектов приступ происходит каждые 1-2 недели, и большинство эпизодов продолжаются от 3 до 4 суток ([ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema](http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)). Частота и продолжительность приступов существенно варьирует среди субъектов с наследственным ангионевротическим отеком, даже у членов одной семьи.

Существует три типа НАЕ, известных как I, II и III типы. По оценкам, НАЕ поражает 1 из 50000 человек, на I тип приходится примерно 85% случаев, на II тип приходится примерно 15% случаев, и III тип встречается очень редко. III тип является наиболее вновь описанной формой, и первоначально предполагалось, что она встречается только у женщин, но были выявлены семьи с больными мужского пола.

НАЕ наследуется по аутосомно-доминантному типу, так что больной может наследовать мутацию от одного больного родителя. Также могут возникать новые мутации в гене, и, таким образом, НАЕ также может развиваться у людей, в семье которых не было подобного расстройства. По оценкам, 20-25% случаев возникают в результате новой спонтанной мутации.

Мутации в гене SERPING1 вызывают наследственный ангионевротический отек I типа и II типа. Ген SERPING1 обеспечивает регуляцию синтеза белка С1-ингибитора, который важен для контроля воспаления. С1-ингибитор блокирует активность некоторых белков, индуцирующих воспаление. Мутации, которые вызывают наследственный ангионевротический отек I типа, приводят к снижению уровня С1-ингибитора в крови. Напротив, мутации, которые вызывают II тип, приводят к выработке С1-ингибитора, который функционирует аномально. В отсутствие необходимых уровней функционального С1-ингибитора образуется избыточное количество брадикинина. Брадикинин способствует воспалению, усиливая вытекание жидкости через стенки кровеносных сосудов в ткани организма. Чрезмерное накопление жидкости в тканях организма вызывает эпизоды отеков, наблюдаемые у людей с наследственным ангионевротическим отеком I типа и II типа.

Мутации в гене F12 связаны с некоторыми случаями наследственного ангионевротического отека III типа. Ген F12 обеспечивает регуляцию продукции фактора свертывания крови XII. Помимо того, что он играет критическую роль в свертывании крови (коагуляции), фактор XII также является важным сти-

мулятором воспаления и участвует в продукции брадикинина. Некоторые мутации в гене F12 приводят к продукции фактора XII с повышенной активностью. В результате вырабатывается больше брадикинина, и стенки кровеносных сосудов становятся более "протекающими", что приводит к эпизодам отеков. Причина других случаев наследственного ангионевротического отека III типа остается неизвестной. Мутации в одном или более, пока еще не идентифицированных генах, могут быть ответственны за развитие заболевания в этих случаях.

НАЕ может проявляться аналогично другим формам ангионевротического отека, вызванным аллергией или другими заболеваниями, но он существенно отличается по причине и лечению. Когда НАЕ ошибочно диагностируется как аллергия, то его чаще всего лечат антигистаминными препаратами, стероидами и/или эпинефрином, которые обычно неэффективны при НАЕ, хотя эпинефрин можно использовать для купирования угрожающих жизни реакций. Ошибочные диагнозы также приводили к ненужному диагностическому хирургическому вмешательству у пациентов с отеками в абдоминальной области, а у некоторых пациентов с НАЕ боль в абдоминальной области была неправильно диагностирована как психосоматическая.

Терапия C1-ингибиторами, а также другие способы лечения НАЕ описаны в публикации Kaplan, A.P., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, 126 (5): 918-925.

Предусмотрено неотложное лечение приступов НАЕ, чтобы как можно быстрее купировать прогрессирование отеков. Концентрат C1-ингибитора, выделенный из донорской крови, который вводится внутривенно, является одним из неотложных методов лечения; однако во многих странах это лечение недоступно. В неотложных ситуациях, когда концентрат C1-ингибитора недоступен, то в качестве альтернативы можно использовать свежезамороженную плазму (FFP), так как она также содержит C1-ингибитор.

Очищенный C1-ингибитор, выделенный из крови человека, используется в Европе с 1979 г. В настоящее время в США доступно несколько видов лечения с использованием C1-ингибитора, а в Канаде теперь доступны два продукта на основе C1-ингибитора. Беринерт P (CSL Behring), представляющий пастеризованный продукт, был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в 2009 г. для купирования острых приступов. CINRYZE®, полученный нанофильтрицией, был одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов в 2008 году для профилактики. Руцин/Руконест (Pharming) представляет рекомбинантный C1-ингибитор, находящийся на стадии разработки, который не несет риска передачи инфекционных заболеваний за счет переносимых с кровью патогенов человека.

Лечение острого приступа НАЕ также может включать препараты для облегчения боли и/или внутривенное введение жидкости.

Другие способы лечения могут стимулировать синтез C1-ингибитора или снижать потребление C1-ингибитора. Андрогенные препараты, такие как даназол, могут снизить частоту и тяжесть приступов, стимулируя выработку C1-ингибитора.

*Helicobacter pylori* может вызвать абдоминальные приступы. Антибиотики для лечения *H. pylori* ослабляют абдоминальные приступы.

Новые способы лечения воздействуют на контактный каскад. Экаллантин (KALBITOR®) ингибирует плазманный калликреин, и он был одобрен для применения в США. Икатибант (FIRAZYR®, Shire) ингибирует рецептор брадикинина B2, и он был одобрен для применения в Европе и США.

Диагностика НАЕ может основываться, например, на семейном анамнезе и/или анализах крови. Лабораторные данные, связанные с НАЕ I, II и III типов, описаны, например, в публикации Kaplan, A.P., *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, 126 (5): 918-925. При НАЕ I типа уровень C1-ингибитора снижается, как и уровень C4, тогда как уровень C1q является нормальным. При НАЕ II типа уровень C1-ингибитора нормальный или повышенный; однако функция C1-ингибитора является аномальной. Уровень C4 снижается, и уровень C1q нормальный. При НАЕ III типа уровни C1-ингибитора, C4 и C1q могут быть нормальными. Настоящее изобретение основано, по меньшей мере, частично, на идентификации дополнительных белков, которые имеют дифференциальные уровни в образцах от пациентов с НАЕ по сравнению со здоровыми субъектами (табл. 1). Измерение уровней панелей биомаркеров этих белков можно использовать для определения того, есть ли у пациента заболевание, такое как НАЕ. В некоторых вариантах осуществления способы можно использовать для определения того, был или имеет место у пациента приступ НАЕ.

Симптомы НАЕ можно оценивать, например, с использованием вопросников, например, вопросников, заполняемых пациентами, практикующими врачами или членами семьи. Такие вопросники известны в данной области и включают, например, визуальные аналоговые шкалы. См., например, McMillan C.V. et al. *Patient*, 2012; 5 (2): 113-26.

Биологический образец, описанный здесь, может быть подвергнут анализу посредством измерения уровня панели биомаркеров, как здесь описано, в биологическом образце. Уровни (например, количество) биомаркера, раскрытого здесь, или изменения уровней биомаркера можно оценить с использованием анализов, описанных здесь, и/или анализов, известных в данной области. Один или более биомаркеров,



описанных здесь, можно анализировать с использованием обычных способов. В некоторых вариантах осуществления уровень биомаркера оценивают или измеряют посредством непосредственного детектирования белка в биологическом образце. Альтернативно или в дополнение, уровень белка в биологическом образце можно оценить или измерить опосредованно, например, определением уровня активности белка (например, ферментативным анализом).

В некоторых вариантах осуществления биомаркер измеряют с использованием иммуноанализа. Примеры иммуноанализа включают, без ограничения, анализ иммуноблоттингом (вестерн-блоттингом), твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) (например, ELISA сэндвич-типа), радиоиммуноанализы, методы анализа на основе электрохемилюминесценции, магнитный иммуноанализ, латеральный проточный иммуноанализ и аналогичные методы. Дополнительные подходящие иммуноанализы для детектирования биомаркера, представленные здесь, будут очевидны для специалистов в данной области. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что настоящее изобретение не ограничивается иммуноанализами, и что анализы детектирования, которые не основаны на антителе или антиген-связывающем фрагменте антитела, такие как масс-спектрометрия, также пригодны для детектирования и/или количественного определения биомаркеров контактной системы, раскрытых здесь. Анализы, которые основаны на хромогенном субстрате, также могут быть пригодными для детектирования и/или количественного определения биомаркеров контактной системы, раскрытых здесь.

Тип анализа детектирования, используемого для детектирования и/или количественного определения биомаркера контактной системы, такого как биомаркеры, раскрытые здесь, будет зависеть от конкретной ситуации, в которой должен использоваться анализ (например, клинические или исследовательские применения), и от вида и количества биомаркеров, которые должны детектироваться, а также типа и количества образцов пациентов, которые будут проводиться параллельно, если назвать только некоторые параметры.

ELISA известен в данной области (см., например, Crowther John R. (2009). "The ELISA Guidebook", 2nd ed. Humana Press and Lequin R. (2005). "Enzyme immunoassay (EIA) /enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". Clin. Chem., 51 (12): 2415-8) и примеры ELISA описаны здесь. Наборы для постановки ELISA также известны в данной области и коммерчески доступны (см., например, наборы для постановки ELISA от Life Technologies и BD Biosciences).

В некоторых вариантах осуществления иммуноанализ используется для измерения уровней белкового биомаркера(ов). Иммуноанализы, описанные здесь, могут быть в формате ELISA сэндвич-типа, где первый связывающий агент, который специфически связывается с белком из панели биомаркеров, иммобилизован на опорном элементе. Затем опорный элемент можно инкубировать с биологическим образцом, как здесь описано, в течение подходящего периода времени в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между связывающим агентом и белком в образце. Затем такой комплекс можно детектировать с использованием детектирующего агента, который связывается с белком, комплексом связывающий агент-белок или связывающим агентом. Детектирующий агент может быть конъюгирован с меткой, которая может генерировать сигнал прямо или опосредованно. Интенсивность сигнала отражает уровень белка в образце. В некоторых вариантах осуществления детектируется детектирующий агент, и его уровень отражает уровень белка в образце.

Любой связывающий агент, который специфически связывается с требуемым белком, можно использовать в способах и наборах, описанных здесь, для измерения уровня белка в биологическом образце. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет собой антитело, которое специфически связывается с требуемым белком. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент представляет аптамер антитела, который специфически связывается с требуемым белком. В некоторых вариантах осуществления образец может контактировать, одновременно или последовательно, с более чем одним связывающим агентом, который связывается с разными белками (например, мультиплексный анализ, например анализ SOMAScan™ (SOMALogic)). Биологический образец контактирует со связывающим агентом в соответствующих условиях. Как правило, термин "контактировать" относится к взаимодействию связывающего агента с биологическим образцом или агентом в течение подходящего периода, достаточного для образования комплексов между связывающим агентом и белком в образце, если таковой присутствует. В некоторых вариантах осуществления контактирование осуществляется за счет капиллярного эффекта, при котором биологический образец или агент перемещается по поверхности опорного элемента.

В некоторых вариантах осуществления иммуноанализы можно выполнять на низкопроизводительных платформах, в том числе в формате одного иммуноанализа. Например, низкопроизводительная платформа может использоваться для определения присутствия и количества белка в биологических образцах (например, биологических тканях, тканевых экстрактах) для диагностических способов, мониторинга заболевания и/или прогрессирования лечения, и/или прогнозирования того, насколько может быть полезным определенное лечение для заболевания или расстройства.

В некоторых вариантах осуществления может потребоваться иммобилизовать связывающий агент на опорном элементе. Способы иммобилизации связывающего агента будут зависеть от таких факторов, как природа связывающего агента и материал опорного элемента, и могут потребоваться определенные

буферы. Такие способы будут очевидны для специалистов в данной области. Например, панель биомаркеров в биологическом образце, как здесь описано, может быть измерена с использованием любого из наборов и/или детектирующих устройств, которые также здесь описаны.

Как здесь используется, термин "измерять" или "измерение" или, альтернативно, "детектировать" или "детектирование" означает определение присутствия, отсутствия, концентрации или количества (которое может быть эффективным количеством) вещества в образце, включая отклонение качественных или количественных уровней концентрации таких веществ, или иначе оценку значений или категоризацию субъекта.

Анализы, например, вестерн-блоттинг, могут дополнительно включать использование количественной системы визуализации, например, технологии LICOR визуализации, которая коммерчески доступна (см., например, инфракрасную систему визуализации Odyssey® CLx от LI-COR Biosciences). В некоторых вариантах осуществления используют анализ детектирования на основе электрохемилюминесценции или анализ, основанный на комбинации электрохемилюминесценции и технологии микрочипов (например, анализ технологией ECL или MULTI-ARRAY от Meso Scale Discovery (MSD)).

В любом из способов, описанных здесь, уровень белка в панели биомаркеров можно сравнить с уровнем белка в контрольном образце или эталонном образце.

Способы и наборы, описанные здесь, включающие любую панель белковых биомаркеров, также описанных здесь, могут применяться для оценки заболевания, ассоциированного с контактной системой активации, описанного здесь.

(ii) Диагностические и/или прогностические применения.

Уровни белков, представленные в табл. 1, детектированные в образцах от субъектов, можно использовать в качестве надежных биомаркеров для диагностики заболеваний, ассоциированных с контактной системой активации (например, НАЕ), мониторинга прогрессирования такого заболевания, оценки эффективности лечения заболевания, идентификации пациентов, подходящих для конкретного лечения, и/или прогнозирования развития приступа заболевания у субъекта.

Следовательно, в данном документе описаны диагностические и прогностические способы для заболевания, ассоциированного с контактной системой активации, основанные на уровне панели биомаркеров в биологическом образце, полученном от субъекта. В некоторых вариантах осуществления уровень биомаркера, измеренный с использованием любого из способов, описанных здесь, можно использовать для оценки того, насколько субъект (например, пациент-человек), от которого получен биологический образец, имеет заболевание или имеет риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации, такого как заболевание, ассоциированное с плазменным калликреином, например, НАЕ, или аутоиммунное заболевание, такое как RA, UC и болезнь Крона.

В некоторых вариантах осуществления уровень биомаркера затем можно сравнить с эталонным образцом или контрольным образцом, для того, чтобы определить значение, указывающее на количество белка в образце. В некоторых вариантах осуществления значение биомаркера получают сравнением уровня белка в образце с уровнем другого белка (например, внутреннего контроля или внутреннего стандарта) в образце. Такое значение биомаркера может представлять нормализованное значение к внутреннему контролю или внутреннему стандарту. Значение биомаркера можно сравнить с эталонным значением для того, чтобы определить, имеет ли субъект риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации. Эталонное значение может представлять уровень соответствующего биомаркера у субъектов (например, людей), не страдающих целевым заболеванием. В некоторых вариантах осуществления, если уровень или значение биомаркера выше, чем эталонный уровень или эталонное значение, то субъект может быть идентифицирован как имеющий заболевание или имеющий риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации. В некоторых вариантах осуществления, если уровень или значение биомаркера ниже, чем эталонный уровень или эталонное значение, то субъект может быть идентифицирован как имеющий заболевание или имеющий риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации.

В некоторых вариантах осуществления уровень биомаркера можно сравнить с заранее определенным пороговым значением для белка, отклонение от которого может указывать на то, что у субъекта имеется заболевание, ассоциированное с контактной системой. Заранее определенное пороговое значение может представлять значение биомаркера, которое отличает уровень биомаркера у пациентов, имеющих целевое заболевание, от уровня биомаркера у пациентов, не имеющих целевого заболевания.

В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров включает более одного белка, по меньшей мере, для одного из которых повышенный уровень указывает на то, что субъект имеет заболевание или имеет риск развития заболевания и, по меньшей мере, для одного из белков пониженный уровень указывает на то, что субъект имеет заболевание или имеет риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров включает более одного белка, для каждого из которых повышенный уровень указывает на то, что у субъекта имеется заболевание или имеется риск развития заболевания. В некоторых вариантах осуществления панель биомаркеров включает более одного белка, для каждого из которых пониженный уровень указывает на то, что у субъекта имеется заболевание или имеется риск развития заболевания.

В некоторых вариантах осуществления контрольный образец или эталонный образец представляет биологический образец, полученный от здорового человека. В некоторых вариантах осуществления контрольный образец или эталонный образец содержит известное количество белка, подлежащего оценке. В некоторых вариантах осуществления контрольный образец или эталонный образец представляют биологический образец, полученный от контрольного субъекта.

Как здесь используется, контрольный субъект может быть здоровым субъектом, т. е. субъектом, который, вероятно, не страдает целевым заболеванием (например, заболеванием, ассоциированным с контактной системой) на время измерения уровня белка(ов) или не имеет истории заболевания. Контрольный субъект также может представлять популяцию здоровых субъектов, которые предпочтительно должны иметь характеристики (например, возраст, пол, этническую группу) как и субъект, который подвергается анализу способом, описанным здесь.

Контрольный уровень может представлять заранее определенный уровень или пороговое значение. Такой заранее определенный уровень может представлять уровень белка в популяции субъектов, которые не имеют целевого заболевания или не имеют риск развития целевого заболевания (например, средний уровень в популяции здоровых субъектов). Он также может представлять уровень белка в популяции субъектов, которые страдают целевым заболеванием.

Заранее определенный уровень может принимать различные формы. Например, это может быть единичное пороговое значение, например, медиана или среднее значение. В некоторых вариантах осуществления такой заранее определенный уровень может быть установлен на основе сравнительных групп, например, когда известно, что одна определенная группа имеет целевое заболевание, а другая определенная группа не имеет целевого заболевания. Альтернативно, заранее определенный уровень может представлять диапазон, например, диапазон, представляющий уровни белка в контрольной популяции.

Контрольный уровень, как здесь описано, может быть определен с помощью обычной технологии. В некоторых примерах контрольный уровень можно получить выполнением обычного способа (например, того же анализа, который используется для получения уровня белка в тестируемом образце, как здесь описано) для контрольного образца, как также здесь описано. В других примерах уровни белка можно получить от членов контрольной популяции, и результаты можно анализировать, например, с помощью вычислительной программы, с получением контрольного уровня (заранее определенного уровня), который представляет уровень белка в контрольной популяции.

Сравнивая уровень биомаркера в образце, полученном от кандидата-субъекта, с эталонным значением, как здесь описано, можно определить, насколько у кандидата-субъекта имеется заболевание или имеется риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой (например, НАЕ). Например, если уровень биомаркера(ов) в образце кандидата-субъекта отклоняется от эталонного значения (например, повышен по сравнению с эталонным значением), то кандидат-субъект может быть идентифицирован как имеющий заболевание или имеющий риск развития заболевания. Когда эталонное значение представляет диапазон значений уровня биомаркера в популяции субъектов, у которых имеется целевое заболевание, то значение биомаркера в образце кандидата, попадающее в этот диапазон, указывает на то, что кандидат-субъект имеет заболевание или имеет риск развития целевого заболевания.

Как здесь используется, термин "повышенный уровень" или "уровень выше эталонного значения" означает, что уровень биомаркера выше эталонного значения, такого как заранее определенное пороговое значение уровня биомаркера в контрольном образце. Контрольные уровни подробно здесь описаны. Повышенный уровень биомаркера включает уровень биомаркера, который, например, на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% или более выше контрольного значения. В некоторых вариантах осуществления уровень биомаркера в тестируемом образце, по меньшей мере, в 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; 5,5; 6; 7; 8; 9; 10; 50; 100; 150; 200; 300; 400; 500; 1000; 10000 раз или более выше уровня биомаркера в эталонном образце.

Как здесь используется, термин "пониженный уровень" или "уровень ниже эталонного значения" означает, что уровень биомаркера ниже эталонного значения, такого как заранее определенное пороговое значение биомаркера в контрольном образце. Контрольные уровни подробно здесь описаны. Пониженный уровень биомаркера включает уровень биомаркера, который, например, на 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400%, 500% или более ниже эталонного значения. В некоторых вариантах осуществления уровень биомаркера в тестируемом образце, по меньшей мере, в 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 раз или более ниже уровня биомаркера в эталонном образце.

В некоторых вариантах осуществления изобретения кандидат-субъект является пациентом-человеком, имеющим симптом заболевания, ассоциированного с контактной системой активации, такого как rK<sub>al</sub>-опосредованное заболевание, например, НАЕ, или аутоиммунное заболевание, такое как РА, УС и болезнь Крона. Например, у субъекта наблюдаются отеки, отечность, где указанные отеки являются полностью или преимущественно периферическими; высыпания; покраснение, боль и отеки при отсутствии признаков инфекции; гистамин-независимый отек, рецидивирующие приступы отеков или их комбинация. В еще одних вариантах осуществления у субъекта отсутствует симптом rK<sub>al</sub>-опосредованного заболевания на время отбора образца, в анамнезе отсутствует симптом rK<sub>al</sub>-

опосредованного заболевания или анамнез рKа1-опосредованного заболевания, такого как НАЕ. В еще одних вариантах осуществления субъект не отвечает на антигистаминную терапию, терапию кортикостероидами или обе.

Субъект, идентифицированный в способах, описанных здесь, может быть подвергнут подходящему лечению, такому как лечение ингибитором рKа1, как здесь описано.

Способы анализа и наборы, описанные здесь, также можно применять для оценки эффективности лечения заболевания, ассоциированного с контактной системой, такого как описанные здесь, с учетом наличия корреляции между уровнем биомаркеров и такими заболеваниями. Например, можно отобрать несколько биологических образцов (например, образцов крови или плазмы) у субъекта, которому проводят лечение, до и после лечения, или во время курса лечения. Уровни биомаркера можно измерить любым из способов анализа, как здесь описано, и значения (например, количества) биомаркера могут быть определены соответствующим образом. Например, если повышенный уровень биомаркера указывает на то, что у субъекта имеется целевое заболевание, и уровень биомаркера снижается после лечения или во время курса лечения (уровень биомаркера в позднем отобранном образце по сравнению с ранее отобранным образцом), это указывает на то, что лечение является эффективным. В качестве другого примера, если пониженный уровень биомаркера указывает на то, что у субъекта имеется целевое заболевание, и уровень биомаркера повышается после лечения или во время курса лечения (уровень биомаркера в позднем отобранном образце по сравнению с ранее отобранным образцом), это указывает на то, что лечение является эффективным. В некоторых примерах лечение включает эффективное количество терапевтического агента, такого как ингибитор плазменного калликреина, антагонист рецептора брадикинина В2 или ингибитор С1-эстеразы (С1-INН). Примеры терапевтических агентов включают, не ограничиваясь этим, ланаделумаб, экаллангид, икатибант и С1-INН, выделенный из плазмы человека.

Если субъект идентифицирован как не отвечающий на лечение, то идентифицированному субъекту вводят более высокую дозу и/или увеличивают частоту введения терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, идентифицированного как отвечающего на лечение или не нуждающегося в дальнейшем лечении, то дозу или частоту введения терапевтического агента поддерживают, снижают или лечение останавливают. Альтернативно, для субъекта, который считается не реагирующим на первое лечение, может быть применено другое лечение.

В еще одних вариантах осуществления значения биомаркера или панели биомаркеров также могут основой для идентификации того, что расстройство связано с контактной системой или что расстройство можно лечить, например, ингибитором рKа1. Для применения на практике данного способа, уровень биомаркера в образце, отобранном у субъекта (например, образце крови или образце плазмы), имеющего целевое заболевание, может быть измерен подходящим способом, например, описанным здесь, таким как анализ вестерн-блоттингом или ELISA. Если уровень биомаркера отклоняется от эталонного значения (например, повышен или понижен), то это указывает на то, что ингибитор рKа1 может быть эффективным в лечении заболевания. Если заболевание идентифицировано как отвечающее (может лечиться) на ингибитор рKа1, то способ может дополнительно включать введение субъекту, страдающему этим заболеванием, эффективного количества ингибитора рKа1, такого как анти-рKа1-антитело или ингибиторный пептид (например, ланаделумаб, экаллангид); ингибитор рецептора брадикинина 2 (например, икатибант); и/или С1-INН (например, С1-INН, выделенный из плазмы человека).

Также в объеме настоящего изобретения находятся способы оценки тяжести заболевания, ассоциированного с контактной системой, или определения стадии заболевания. Например, как здесь описано, НАЕ может находиться в состоянии ремиссии (базальное состояние), во время которого субъект не испытывает симптомов заболевания. Приступы НАЕ, как правило, представляют собой рецидивирующие эпизоды, когда у субъекта может быть боль и отеки, например, на руках, ногах, лице, в желудочно-кишечном тракте, половых органах и гортани (горле), которые могут продолжаться от двух до пяти суток. В некоторых вариантах осуществления уровень одного или более биомаркеров указывает на то, будет ли субъект испытывать, испытывает или вскоре будет испытывать приступ НАЕ. В некоторых вариантах осуществления способы включают сравнение уровня биомаркера в образце, полученном от субъекта, страдающего НАЕ, с уровнем биомаркера в образце от того же субъекта, например, образце, полученном от того же субъекта в базальном состоянии, или образце, полученном от того же субъекта во время приступа НАЕ.

(iii) Неклинические применения.

Дополнительно уровни любого из панели биомаркеров, описанных здесь, можно использовать в исследовательских целях. Несмотря на то, что многие заболевания, ассоциированные с контактной системой активации, были идентифицированы, возможно, что и другие заболевания опосредуются аналогичными механизмами или включают сходные компоненты. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные здесь, можно использовать для идентификации заболевания, ассоциированного с контактной системой активации или с компонентами контактной системы активации. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные здесь, можно использовать для изучения механизмов (например, открытия новых биологических путей или процессов, вовлеченных в развитие заболевания) или прогрессирования заболевания.

В некоторых вариантах осуществления уровни панелей биомаркеров, как здесь описано, можно использовать в качестве основы при разработке новых терапевтических средств для заболевания, ассоциированного с контактной системой активации. Например, уровни панели биомаркеров могут быть измерены в образцах, полученных от субъекта, которому вводили новый терапевтический агент (например, находящийся на стадии клинических испытаний). В некоторых вариантах осуществления уровень панели биомаркеров может указывать на эффективность нового терапевтического агента или прогрессирование заболевания у субъекта до, во время или после применения нового терапевтического агента.

Наборы и детектирующие устройства для измерения панелей белковых биомаркеров.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы и детектирующие устройства для применения в измерении уровня панели биомаркеров, как здесь описано. Такой набор или детектирующее устройство может включать связывающие агенты, которые специфически связываются с белковыми биомаркерами, такими как приведены в табл. 1. Например, такой набор или детектирующее устройство может включать, по меньшей мере, два связывающих агента, которые специфичны для двух различных белковых биомаркеров, выбранных из табл. 1. В некоторых случаях набор или детектирующее устройство включает связывающие агенты, специфичные для всех членов панели белковых биомаркеров, описанных здесь.

В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих агентов представляют антитело, которое специфически связывается с белком из панели биомаркеров. В некоторых вариантах осуществления один или более связывающих агентов представляет аптамер, такой как пептидный аптамер или олигонуклеотидный аптамер, который специфически связывается с белком из панели биомаркеров.

В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно включают детектирующий агент (например, антитело, связывающееся со связывающим агентом) для детектирования связывания агента с белком(ами) панели биомаркеров. Детектирующий агент может быть конъюгирован с меткой. В некоторых вариантах осуществления детектирующий агент представляет антитело, которое специфически связывается, по меньшей мере, с одним из связывающих агентов. В некоторых вариантах осуществления связывающий агент содержит метку, которая может быть идентифицирована и, прямо или опосредованно, связана с детектирующим агентом.

В некоторых вариантах осуществления опорный элемент представляет мембрану, такую как нитроцеллюлозная мембрана, мембрана из поливинилиденфторида (PVDF) или целлюлозоацетатная мембрана. В некоторых примерах иммуноанализ может быть в формате вестерн-блоттинга или в формате латерального проточного иммуноанализа.

В некоторых вариантах осуществления опорный элемент представляет мультилуночный планшет, такой как планшет для постановки ELISA. В некоторых вариантах осуществления иммуноанализа, описанные здесь, могут проводиться на высокопроизводительных платформах. В некоторых вариантах осуществления мультилуночные планшеты, например 24-, 48-, 96-, 384-луночные или более планшеты, могут использоваться для высокопроизводительных иммуноанализов. Отдельные иммуноанализы можно проводить в каждой лунке параллельно. Следовательно, как правило, желательно использовать планшетный ридер для одновременного анализа многих лунок для увеличения производительности анализа. В некоторых вариантах осуществления планшетные ридеры, которые способны визуализировать много лунок (например, 4, 16, 24, 48, 96, 384 или более лунок) параллельно, могут использоваться для этой платформы. Например, можно использовать коммерчески доступный планшетный ридер (например, систему планшет::визуализация, доступную от Perkin Elmer, Waltham, MA). Такой планшетный ридер способен анализировать флуоресценцию на основе кинетики. Система планшет::визуализация имеет оптику с высокой эффективностью сбора и имеет специальную оптику, предназначенную для анализа 96 лунок параллельно. Дополнительные подходящие планшетные ридеры для параллельного анализа включают, не ограничиваясь этим, SAFIRE (Tecan, San Jose, CA), FLIPRTETRA® (Molecular Devices, Union City, CA), FDSS7000 (Hamamatsu, Bridgewater, NJ) и CellLux (Perkin Elmer, Waltham, MA).

В наборе или детектирующем устройстве, один или более связывающих веществ могут быть иммобилизованы на опорном элементе, например, мембране, шарике, предметном стекле или мультилуночном планшете. Выбор подходящего опорного элемента для иммуноанализа будет зависеть от различных факторов, таких как количество образцов и метод детектирования сигнала, высвобождаемого от метки, конъюгированной со вторым агентом.

Набор также может включать один или более буферов, как здесь описано, не ограничиваясь буфером для покрытия, блокирующим буфером, промывочным буфером и/или стоп-буфером.

В некоторых вариантах осуществления набор может содержать инструкции по применению в соответствии с любым из способов, описанных здесь. Включенные инструкции могут содержать описание того, как использовать компоненты, входящие в состав набора, для измерения уровня белков в панели биомаркеров в биологическом образце, отобранном у субъекта, такого как пациент-человек.

Инструкции, относящиеся к применению набора, обычно включают информацию о количестве каждого компонента и подходящих условиях для выполнения способов анализа, описанных здесь. Компоненты в наборах могут находиться в разовых дозах, объемных упаковках (например, в многодозовых упаковках) или в субразовых дозах. Инструкции, поставляемые в наборах по настоящему изобретению, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например,

лист бумаги, включенный в комплект), но также являются приемлемыми машиночитаемые инструкции (например, инструкции, хранящиеся на магнитном или оптическом диске для хранения).

На этикетке или вкладыше в упаковку указывается, что набор используется для оценки уровня белков в панели биомаркеров. Инструкции могут быть предоставлены для осуществления любого из способов, описанных здесь.

Наборы по настоящему изобретению находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, не ограничиваясь этим, флаконы, бутылки, баночки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и тому подобное. Также предусматриваются упаковки для применения в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или инфузионное устройство, такое как мини-насос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). Контейнер также может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой мешок для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций).

Наборы могут дополнительно содержать дополнительные компоненты, такие как пояснительная информация, такая как для контрольного и/или стандартного или эталонного образца. Как правило, набор содержит контейнер и этикетку или вкладыш(ы) в упаковку на контейнере или связанные с ним. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает изделия производства, включающие содержимое наборов, описанных выше.

Лечение заболеваний, ассоциированных с контактной системой активации.

Субъекта, подверженного риску развития или страдающего заболеванием, ассоциированным с контактной системой активации, идентифицированного с использованием способов, описанных здесь, можно лечить любым подходящим терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления обеспеченные способы включают выбор лечения для субъекта на основе результатов описанного способа, например, измерения уровня панели биомаркеров.

В некоторых вариантах осуществления способ включает одно или оба из выбора или введения терапевтического агента, например, ингибитора калликреина, ингибитора рецептора брадикинина В2 и/или ингибитора С1-эстеразы, для введения субъекту на основании результатов анализа, например, детектирования биомаркеров.

В некоторых вариантах осуществления терапевтический агент вводят субъекту один или более раз. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят ингибитор плазменного калликреина. В некоторых вариантах осуществления ингибитор калликреина представляет собой пептид, низкомолекулярный ингибитор, антитело против калликреина или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят антагонист рецептора брадикинина В2. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят С1-INH.

Терапевтический агент, например, ингибитор калликреина, ингибитор рецептора брадикинина В2 и/или С1-INH, можно вводить вместе с другим терапевтическим агентом как часть комбинированной терапии для лечения заболевания или патологического состояния, которое включает контактную систему активации. Комбинированная терапия, например, с одним или более из ингибитора калликреина, антагониста рецепторов брадикинина В2 или замещающего агента С1-INH, например, с одним или более из ингибитора калликреина, антагониста рецепторов брадикинина В2 или замещающего агента С1-INH и другой терапией, может быть обеспечена в нескольких различных конфигурациях. Первый агент можно вводить до или после введения другой терапии. В некоторых ситуациях первый агент и другую терапию (например, терапевтический агент) вводят одновременно или в непосредственной временной близости (например, короткий интервал времени между инъекциями, например, во время одного сеанса лечения). Первый агент и другую терапию также можно вводить с большими временными интервалами.

Терапевтические агенты.

Агенты, связывающие плазменный калликреин (например, связывающие белки, например, полипептиды, например, ингибиторные полипептиды, например, антитела, например, ингибиторные антитела, или другие связывающие агенты, например, небольшие молекулы), являются пригодными терапевтическими агентами для лечения различных заболеваний и патологических состояний, например, заболеваний и патологических состояний, которые связаны с активностью плазменного калликреина. Например, в некоторых вариантах осуществления заболевание или патологическое состояние, которое включает активность плазменного калликреина, представляет наследственный ангионевротический отек (НАЕ). В некоторых вариантах осуществления агент, связывающий плазменный калликреин, такой как ингибитор плазменного калликреина, вводят субъекту, имеющему риск развития или страдающему заболеванием, ассоциированным с контактной системой активации.

Ряд пригодных белковых ингибиторов калликреина, тканевого и/или плазменного калликреина, включает домен Кунитца. Как здесь используется, термин "домен Кунитца" представляет полипептидный домен, содержащий, по меньшей мере, 51 аминокислоту и содержащий, по меньшей мере, два и предпочтительно три дисульфида. Домен уложен таким образом, что первый и шестой цистеины, второй и четвертый цистеины, и третий и пятый цистеины образуют дисульфидные связи (например, в домене

Куница, содержащем 58 аминокислот, цистеины могут присутствовать в положениях, соответствующих аминокислотам 5, 14, 30, 38, 51 и 55, в соответствии с количеством гомологичных последовательностей ВРТИ, представленных ниже, и дисульфиды могут образовываться между цистеинами в положении 5 и 55, 14 и 38, и 30 и 51), или, если присутствует два дисульфида, то они могут образовываться между соответствующими подгруппами их цистеинов. Расстояние между соответствующими цистеинами может составлять 7, 5, 4, 3, 2, 1 или 0 аминокислот из следующих расстояний между положениями, соответствующими: от 5 до 55, от 14 до 38 и от 30 до 51, согласно нумерации последовательности ВРТИ, представленной ниже. Последовательность ВРТИ можно использовать в качестве референсной для определения конкретных положений в любом общем домене Куниц. Сравнение домена Кунитца, представляющего интерес, с ВРТИ, может быть выполнено посредством определения наилучшего выравнивания, при котором число выровненных цистеинов является максимальным.

Трехмерная структура (при высоком разрешении) домена Кунитца ВРТИ известна. Одна из рентгеновских структур хранится в Брукхейвенском банке данных белков как "6РТИ". Известна трехмерная структура некоторых гомологов ВРТИ (Eigenbrot et al., Protein Engineering (1990) 3 (7): 591-598; Hynes et al., Biochemistry (1990) 29: 10018-10022). Известны последовательности, по меньшей мере, восьмидесяти одного домена Куница. Известные человеческие гомологи включают три домена Кунитца LACI, также известного как ингибитор пути тканевого фактора (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), два домена Кунитца интер-альфа-трипсинового ингибитора, APP-I (Kido et al. J Biol. Chem. (1988) 263 (34): 18104-18107), домен Кунитца коллагена, три домена Кунитца TFPI-2 (Sprecher et al., PNAS USA (1994) 91: 3353-3357), домены Кунитца ингибитора активатора фактора роста гепатоцитов человека типа 1, домены Кунитца ингибитора активатора фактора роста гепатоцитов типа 2, домены Кунитца описаны в публикации патента США №: 2004-0152633. LACI представляет собой фосфогликопротеин сыворотки человека с молекулярной массой 39 кДа (аминокислотная последовательность в табл. 2), который содержит три домена Кунитца.

Таблица 2

Типичные природные домены Кунитца

LACI (SEQ ID NO: 1)	<p>1 <u>MIYTMKKVHA</u> <u>LWASVCLLLN</u> <u>LAPAPLN</u>Ads eedehtit dtelpplkIM 51 HSFCAFKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGCGEGN QNRFSLEEC 101 KKMCTRDnan riikttlqge <u>kpdfCFleed</u> <u>pgiCrgyitr</u> <u>yfyngqtkqC</u> 151 <u>erfkyggClg</u> <u>nmnrfetlee</u> CkniCedgpn gfqvdnygtq lnavnsltp 201 qstkvpslfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC 251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif 301 vknm</p> <p>Сигнальная последовательность (1-28) выделена заглавными буквами и подчеркнута LACI-K1 (50-107) выделен заглавными буквами LACI-K2 (121-178) подчеркнут LACI-K3 (211-270) выделен жирным шрифтом</p>
ВРТИ (SEQ ID NO: 2)	<p>1 2 3 4 5 1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678 RPDFCLEPPYTGPCAKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTC_GGA</p>

Приведенные выше домены Куниц относятся к LACI-K1 (остатки от 50 до 107), LACI-K2 (остатки от 121 до 178) и LACI-K3 (остатки от 213 до 270). Последовательность кДНК LACI приводится в публикации Wun et al. (J. Biol. Chem. (1988) 263 (13): 6001-6004). Girard et al. (Nature (1989) 338: 518-20) сообщает о результатах мутационных исследований, в которых были изменены остатки P1 в каждом из трех доменов Кунитца. LACI-K1 ингибирует фактор Vila (F.Vila), когда F.VIIa образует комплекс с тканевым фактором, и LACI-K2 ингибирует фактор Ха.

Белки, содержащие типичные домены Кунитца, включают следующие, с номерами доступа в SWISS-PROT в скобках:

A4\_HUMAN (P05067), A4\_MACFA (P53601), A4\_MACMU (P29216),  
 A4\_MOUSE (P12023), A4\_RAT (P08592), A4\_SAI SC (Q95241),  
 AMBP\_PLEPL (P36992), APP2\_HUMAN (Q06481), APP2\_RAT (P15943),  
 AXP1\_ANTAF (P81547), AXP2\_ANTAF (P81548), BPT1\_BOVIN (P00974),  
 BPT2\_BOVIN (P04815), CA17\_HUMAN (Q02388), CA36\_CHICK (P15989),  
 CA36\_HUMAN (P12111), CRPT\_BOOMI (P81162), ELAC\_MACEU (O62845),  
 ELAC\_TRIVU (Q29143), EPPI\_HUMAN (O95925), EPPI\_MOUSE (Q9DA01),  
 HTTB\_MANSE (P26227), IBP\_CARCR (P00993), IBPC\_BOVIN (P00976),  
 IBPI\_TACTR (P16044), IBPS\_BOVIN (P00975), ICS3\_BOMMO (P07481),  
 IMAP\_DROFU (P11424), IP52\_ANESU (P10280), ISCI\_BOMMO (P10831),  
 ISC2\_BOMMO (P10832), ISH1\_STONE (P31713), ISH2\_STONE (P81129),  
  
 ISIK\_HELPO (P00994), ISP2\_GALME (P81906), IVB1\_BUNFA (P25660),  
 IVB1\_BUNMU (P00987), IVB1\_VIPAA (P00991), IVB2\_BUNMU (P00989),  
 IVB2\_DABRU (P00990), IVB2\_HEMHA (P00985), IVB2\_NAJNI (P00986),  
 IVB3\_VIPAA (P00992), IVBB\_DENPO (P00983), IVBC\_NAJNA (P19859),  
 IVBC\_OPHNA (P82966), IVBE\_DENPO (P00984), IVBI\_DENAN (P00980),  
 IVBI\_DENPO (P00979), IVBK\_DENAN (P00982), IVBK\_DENPO (P00981),  
 IVBT\_ERIMA (P24541), IVBT\_NAJNA (P20229), MCP1\_MELCP (P82968),  
 SEPI\_SARBU (P26228), SPT3\_HUMAN (P49223), TKD1\_BOVIN (Q28201),  
 TKD1\_SHEEP (Q29428), TXCA\_DENAN (P81658), UPTI\_PIG (Q29100),  
 AMBP\_BOVIN (P00978), AMBP\_HUMAN (P02760), AMBP\_MERUN (Q62577),  
 AMBP\_MESAU (Q60559), AMBP\_MOUSE (Q07456), AMBP\_PIG (P04366),  
 AMBP\_RAT (Q64240), IATR\_HORSE (P04365), IATR\_SHEEP (P13371),  
 SPT1\_HUMAN (O43278), SPT1\_MOUSE (Q9R097), SPT2\_HUMAN (O43291),  
 SPT2\_MOUSE (Q9WU03), TFP2\_HUMAN (P48307), TFP2\_MOUSE (O35536),  
 TFP1\_HUMAN (P10646), TFP1\_MACMU (Q28864), TFP1\_MOUSE (O54819),  
 TFP1\_RABIT (P19761), TFP1\_RAT (Q02445), YN81\_CAEEL (Q03610)

Разнообразные способы можно использовать для идентификации домена Кунитца из базы данных последовательностей. Например, известную аминокислотную последовательность домена Кунитца, консенсусную последовательность или мотив (например, ProSite Motif) можно найти в базах данных последовательностей GenBank (Национальный центр биотехнологической информации, Национальные институты здравоохранения, Bethesda MD), например, с использованием алгоритма BLAST; в базе данных Pfam HMM (скрытые марковские модели) (например, с использованием параметров по умолчанию для поиска в Pfam; в базе данных SMART или базе данных ProDom. Например, инвентарный номер Pfam PF00014 в Pfam Release 9 предоставляет множество доменов Кунитца и HMM для идентификации доменов Кунитца. Описание базы данных Pfam можно найти в монографии Sonhammer et al. *Proteins* (1997) 28 (3): 405-420, и подробное описание HMM можно найти, например, в публикациях Gribskov et al., *Meth. Enzymol.* (1990) 183: 146-159; Gribskov et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84: 4355-4358; Krogh et al. *J. Mol. Biol.* (1994) 235: 1501-1531 и Stultz et al., *Protein Sci.* (1993) 2: 305-314. База данных SMART (база данных, используемая при идентификации и анализе белковых доменов в белковых последовательностях, EMBL, Heidelberg, DE) HMM, описана в публикациях Schultz et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95: 5857 и Schultz et al., *Nucl. Acids Res* (2000) 28: 231. База данных SMART содержит домены, идентифицированные посредством профилирования с использованием скрытых марковских моделей программы поиска HMMer2 (R. Durbin et al. (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). База данных также аннотируется и контролируется. База данных белковых доменов ProDom состоит из автоматической компиляции гомологичных доменов (Corpet et al. *Nucl. Acids Res.* (1999) 27: 263-267). Имеющиеся в настоящее время версии ProDom созданы с использованием рекурсивных поисковых программ PSI-BLAST (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25: 3389-3402; Gouzy et al. *Computers and Chemistry* (1999) 23: 333-340.) SWISS-PROT 38 и базы данных белков TREMBL. База данных автоматически генерирует консенсусную последовательность для каждого домена. Prosite приводит домен Кунитца в виде мотива и идентифицирует белки, которые включают домен Кунитца. Смотри, например, публикацию Falquet et al., *Nucleic Acids Res.* (2002) 30: 235-238.

Домены Кунитца взаимодействуют с протеазой-мишенью, в основном за счет аминокислот в двух петлевых областях ("связывающие петли"). Область первой петли находится примерно между остатками, соответствующими аминокислотам 13-20 ВРТИ. Область второй петли находится примерно между остатками, соответствующими аминокислотам 31-39 ВРТИ. В типичной библиотеке доменов Кунитца варьируется одно или более аминокислотных положений в областях первой и/или второй петли. Особенно пригодные положения для изменения при скрининге доменов Кунитца, которые взаимодействуют с калликреином или при выборе вариантов с повышенной аффинностью, включают: положения 13, 15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34 и 39 относительно последовательности ВРТИ. Полагается, что, по меньшей мере, некоторые из этих положений находятся в тесном контакте с протеазой-мишенью. Также можно изменять другие положения, например положения, которые являются смежными с вышеуказанными положениями в трехмерной структуре.

"Каркасная область" домена Кунитца определяется как такие остатки, которые являются частью домена Кунитца, но в частности, исключая остатки в областях первой и второй связывающих петель, т. е. около остатков, соответствующих аминокислотам 13-20 ВРТИ и 31-39 ВРТИ. И наоборот, остатки, которые не находятся в связывающей петле, могут "выдерживать" более широкий диапазон аминокислотных



замен (например, консервативные и/или неконсервативные замены).

В одном варианте осуществления эти домены Кунитца являются вариантными формами петлевой структуры, включая домен Кунитца 1 человеческого липопротеин-ассоциированного ингибитора коагуляции (LACI). LACI содержит три внутренние, четко определенные структуры пептидных петель, которые являются примерными доменами Куница (Girard T. et al., Nature (1989) 338: 518-520). Варианты домена Кунитца 1 LACI, описанные здесь, были подвергнуты скринингу, выделены и связываются с калликреином с повышенной аффинностью и специфичностью (см., например, патенты США № 5795865 и 6057287). Данные способы также могут быть применены к другим каркасам доменов Куница для получения других доменов Куница, которые взаимодействуют с калликреином, например, плазменным калликреином. Пригодные модуляторы функции калликреина обычно связывают и/или ингибируют калликреин, как определено с использованием анализов связывания и ингибирования калликреина.

В некоторых аспектах ингибитор плазменного калликреина связывается с активной формой плазменного калликреина. В некоторых вариантах осуществления ингибитор плазменного калликреина связывается и ингибирует плазменный калликреин, например, человеческий плазменный калликреин и/или мышинный калликреин. Типичные полипептидные агенты против плазменного калликреина раскрыты в патенте США № 5795865, патенте США № 5994125, патенте США № 6057287, патенте США № 6333402, патенте США № 7628983 и патенте США № 8283321, патенте США № 7064107, патенте США № 7276480, патенте США № 7851442, патенте США № 812 4 586, патенте США № 7811991 и публикации патента США № 20110086801, полное содержание каждого из которых включено в здесь посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления ингибитор плазменного калликреина представляет ингибиторный полипептид или пептид. В некоторых вариантах осуществления ингибиторный пептид представляет собой экалантин (также относящийся к DX-88 или KALBITOR®; SEQ ID NO: 3). В некоторых вариантах осуществления ингибитор калликреина содержит или состоит примерно из 58-аминокислотной последовательности аминокислот 3-60 в SEQ ID NO: 3 или полипептида DX-88, имеющего последовательность из 60 аминокислот последовательности SEQ 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 (SEQ ID NO: 3).

Ингибитор плазменного калликреина может представлять полноразмерные антитела (например, IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (например, IgA1, IgA2), IgD и IgE) или может включать только антигенсвязывающий фрагмент (например, фрагмент Fab, F(ab')<sub>2</sub> или scFv). Связывающий белок может включать две тяжелые цепи иммуноглобулина и две легкие цепи иммуноглобулина или может представлять собой одноцепочечное антитело. Ингибитор плазменного калликреина может представлять собой рекомбинантные белки, такие как гуманизированные, CDR-привитые, химерные, деиммунизированные или созданные *in vitro* антитела, и может необязательно включать константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. В одном варианте осуществления ингибитор плазменного калликреина представляет собой моноклональное антитело.

Типичные белки, связывающие плазменный калликреин, раскрыты в публикации патента США № 20120201756, полное содержание которой включено здесь посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий калликреин, представляет собой антитело (например, человеческое антитело), имеющее легкую и/или тяжелую цепи антител, выбранных из группы, состоящей из M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (также относится к 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 (также относится здесь к DX-2930 или ланаделумабу), X115-G04, M29-D09, M145-D11, M06-D09 и M35-G04. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий плазменный калликреин, конкурирует с или связывается с тем же эпитопом, что и M162-A04, M160-G12, M142-H08, X63-G06, X101-A01 (также относится здесь к 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 и M35-G04. В некоторых вариантах осуществления белок, связывающий плазменный калликреин, представляет собой ланаделумаб. См. публикацию патента США № 20110200611 и публикацию патента США № 20120201756, которые включены здесь посредством ссылки.

Примером ингибирующего антитела для плазменного калликреина является ланаделумаб. Аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи ланаделумаба представлены ниже с участками CDR, выделенными жирным шрифтом и подчеркнутыми.

Последовательность переменной области тяжелой цепи ланаделумаба (SEQ ID NO: 4)

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

Последовательность переменной области легкой цепи ланаделумаба (SEQ ID NO: 5)

DIQMTQSPS TLSASVGDRV TITCRASQSI SSWLAWYQQK PGKAPKLLIY  
KASTLESGVP SRFSGSGSGT EFTLTISSLQ PDDFATYYCQ QYNTYWTFGQ GTKVEI

В некоторых вариантах осуществления ингибитор плазменного калликреина может иметь идентичность последовательности на уровне примерно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше с ингибитором плазменного калликреина, описанным здесь. В некоторых вариантах осуществления ингибитор плазменного калликреина может иметь идентичность последовательности на уровне примерно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше в каркасных областях HC и/или LC (например, HC и/или LC FR 1, 2, 3 и/или 4) с ингибитором плазменного калликреина, описанным здесь. В некоторых вариантах осуществления ингибитор плазменного калликреина может иметь идентичность последовательности на уровне примерно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше с HC и/или LC CDR (например, HC и/или LC CDR1, 2 и/или 3) с ингибитором плазменного калликреина, описанным здесь. В некоторых вариантах осуществления ингибитор плазменного калликреина может иметь идентичность последовательности на уровне примерно 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или выше в константной области (например, CH1, CH2, CH3 и/или CL1) с ингибитором плазменного калликреина, описанным здесь.

В некоторых аспектах небольшая молекула связывает и ингибирует активную форму плазменного калликреина.

Ингибиторы рецептора брадикинина B2.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят ингибитор рецептора брадикинина B2 (например, антагонист). Типичные антагонисты рецепторов брадикинина B2 включают икатибант (Firazug®), который представляет собой пептидомиметическое лекарственное средство, содержащее 10 аминокислот, которое блокирует связывание нативного брадикинина с рецептором брадикинина B2.

Замещающие агенты C1-INH.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят ингибитор C1-эстеразы (C1-INH), такой как замещающий агент C1-INH. Типичные замещающие агенты C1-INH общедоступны и включают, например, выделенный из плазмы человека C1-INH, например, Berinert® и CINRYZE®.

Без дальнейшего уточнения, полагается, что специалист в данной области техники может, используя предшествующее описание, наиболее полно применять настоящее изобретение. Следовательно, следующие конкретные варианты осуществления, должны рассматриваться как просто иллюстративные, и никоим образом не ограничивающие остальную часть раскрытия. Все публикации, цитированные в данном документе, включены посредством ссылки для целей или предмета, на которые есть ссылки в настоящем документе.

### Примеры

Пример 1: идентификация белков, дифференциально присутствующих в образцах от пациентов с НАЕ, по сравнению со здоровыми субъектами

Образцы плазмы отбирали у здоровых субъектов (N=22, обозначенные как образцы с "нормальным уровнем") и у пациентов с НАЕ (I тип /II тип) во время стадии ремиссии заболевания (N=33, обозначенные "базальный уровень") и во время приступа (N=33, обозначенные "приступ"). Следовали строгому протоколу отбора образцов крови, где кровь отбирали проколом вены с использованием игл-бабочек, пластиковых катетеров и пластиковых пробирок для забора крови. Первая пробирка для забора крови представляла собой пробирку для отделения сыворотки, которую отбрасывали. Вторую пробирку для забора крови (пробирка P100), содержащую смесь ингибиторов протеаз и антикоагулянта, использовали для протеомного анализа. Кровь, собранную в пробирку P100, обрабатывали с получением плазмы в течение 1 ч после отбора крови, разделяли на несколько алиquotных порций и замораживали при температуре <-70°C.

Образцы плазмы анализировали с использованием мультиплексного анализа, с помощью которого можно детектировать относительное содержание 1310 различных белков человека (анализ SOMAScan™; SomaLogic; Boulder, CO). В этом анализе сравнивали уровни сигнала для каждого из 1310 белков для трех разных типов образцов (здоровые субъекты, пациенты, имеющие НАЕ в состоянии ремиссии, и пациенты, имеющие приступ НАЕ).

Статистический анализ выполняли на данных с использованием дисперсионного анализа Крускала-Уоллиса. Это непараметрический метод проверки нормальности распределения в более чем двух группах, которые могут иметь одинаковые или разные размеры выборки. Если допущение состоит в том, что масштабные распределения являются идентичными для всех групп, за исключением любой разницы в медианах, то нулевая гипотеза состоит в том, что медианы всех групп равны, и альтернативная гипотеза состоит в том, что медиана популяции одной группы отличается от медианы популяции, по меньшей мере, еще одной группы. Если статистика не показывает статистической значимости, то какие-либо доказательства стохастического доминирования между выборками отсутствуют. Однако если имеется статистическая значимость в значении медианы, то, по меньшей мере, один образец стохастически доминирует над другим образцом.

Уровни белков, которые различались у пациентов с НАЕ (базальный уровень или приступ) по срав-

нению со здоровыми субъектами с ложноположительным показателем (значение  $q$ )  $< 0,01$  и  $t$ -тестом (значение  $p < 0,05$ , средние значения объединенной дисперсии), приведены в табл. 1. Белки ранжировали в соответствии со значением  $C$ -статистики из анализа операционной характеристической кривой (ROC-кривая), где значения  $C$ -статистики, приближающиеся к 1,0, имеют самую высокую специфичность и чувствительность к положительному детектированию НАЕ (I/II типа). Пациенты с НАЕ I типа идентифицированы как имеющие, по меньшей мере, 50% (обычно ниже 3 0%) от нормального уровня общего белка C1-ингибитора (C1-INH) (David-Lorton M.J., *Drugs Dermatol.* (2015) 14: 151-157). У пациентов с НАЕ II типа имеется мутация в гене SERPING1, которая приводит к дисфункциональному белку C1-INH, и они идентифицируются как имеющие, по меньшей мере, 50% от нормального уровня функционального C1-INH. В настоящем исследовании пациентов с НАЕ не дифференцировали, как имеющих НАЕ I типа или II типа.

Как показано в табл. 1, было установлено, что 152 белка имели уровни, которые статистически различались ( $P < 0,05$ ) между образцами плазмы, полученными от пациентов с НАЕ (приступ или базальный уровень), и образцами плазмы, полученными от здоровых субъектов, представляющие биомаркеры, которые можно оценить для различения субъектов, имеющих НАЕ, от субъектов, не страдающих этим заболеванием. Протеомный анализ выявил 58 белков, уровни которых были  $>$  в 2 раза выше в образцах плазмы от пациентов с НАЕ ( $P < 0,050$ ), и 12 белков, уровни которых были  $>$  в 2 раза ниже в образцах плазмы пациентов с НАЕ ( $P < 0,05$ ) по сравнению с образцами от здоровых субъектов. Было идентифицировано десять белков, которые имели значения  $C$ -статистики  $> 0,93$ . Данные белки, например те, которые имеют высокие значения  $C$ -статистики (например,  $> 0,9$ ), можно использовать в качестве надежных биомаркеров для НАЕ и других заболеваний, связанных с контактной системой, самостоятельно или в комбинации.

Образцы плазмы от пациентов с НАЕ содержали достоверно более низкие количества белка 4 системы комплемента ("C4"), чем плазма здоровых субъектов (фиг. 1, панель А). Низкие уровни C4 используются в клинической диагностике НАЕ (I/II типа) (Davis-Lorton M.J., *Drugs Dermatol.* (2015) 14: 151-157). Кроме того, небольшое снижение уровня прекалликреина наблюдали в образцах пациентов с НАЕ по сравнению с образцами от здоровых субъектов (фиг. 1, панель В). Ранее также было показано, что уровень прекалликреина снижается у пациентов с НАЕ по сравнению с нормальными уровнями. Наблюдаемые изменения в содержании C4 и рКал у пациентов с НАЕ по сравнению с таковыми у здоровых субъектов с использованием способов, описанных здесь, указывают на то, что с помощью этих способов можно детектировать изменения в уровнях белка, относящиеся к началу развития заболевания.

Образцы плазмы от пациентов с НАЕ и здоровых субъектов также были оценены в отношении продукции плазменного калликреина. Вкратце, образцы цитратной плазмы активировали FXIIa с последующим "гашением" FXIIa с использованием кукурузного ингибитора трипсина. Наблюдали небольшое снижение уровня плазменного калликреина в образцах от пациентов с НАЕ по сравнению с нормальными уровнями (фиг. 2).

В данном исследовании 15 из 33 пациентов с НАЕ получали профилактическое лечение C1-INH, CINRYZE®, что должно было повышать количество детектированного плазменного C1-INH. Однако у пациентов с НАЕ, не получавших профилактического лечения C1-INH, общий уровень C1-INH, был снижен по сравнению с нормальными образцами плазмы (фиг. 3, панель А). Как показано на фиг. 3, панель А со стрелкой, образцы плазмы от одного субъекта содержали повышенные уровни C1-INH в базальных условиях и во время приступа. Когда данный выпадающий образец исключали, то результаты показывали четкое снижение уровня плазменного C1-IND у пациентов с НАЕ (фиг. 3, панель В).

Данные протеомного анализа также предоставили новое понимание патобиологии НАЕ. Например, субпанель белков, идентифицированных как повышенные в образцах плазмы от пациентов с НАЕ, связана с функцией митохондрий (фиг. 4, панели А-С). Субъединица O АТФ-синтазы (АТРО) является важным митохондриальным мембранным белком (также известным как  $F_1F_0$ -АТФ-синтаза или комплекс V), который продуцирует АТФ из АДФ в присутствии градиента протонов через мембрану митохондрий, который генерируется электрон-транспортными комплексами дыхательной цепи. Аналогично, циклофиллин F (также известный как циклофиллин D или пептидил-пролил-цис-транс-изомераза F, митохондриальная, EC:5.2.1.8) также является мембранным белком митохондрий. Было также обнаружено, что уровни митохондриального белка теплового шока 60 кДа (HSP60) повышены в образцах плазмы от пациентов с НАЕ.

Еще один белок, идентифицированный в протеомном анализе, который можно использовать в качестве биомаркера для НАЕ, представляет собой белок 14-3-3 зета/дельта (14-3-3ζ). Как показано на фиг. 5, уровень белка 14-3-3 зета/дельта был повышен в плазме у пациентов с НАЕ по сравнению со здоровыми субъектами. Белок 14-3-3 зета/дельта относится к семейству белков, состоящему из 7 членов, и было обнаружено, что уровень других членов также повышен в плазме у пациентов с НАЕ, включая белок 14-3-3 бета/альфа (табл. 1). Белки 14-3-3 экспрессируются повсеместно и являются высококонсервативными среди растений и млекопитающих и участвуют в регуляции путей передачи сигнала, участвующих в метаболизме, транскрипции, апоптозе, транспорте белка и регуляции клеточного цикла (Aghazadeh et al.,

Drug Discov. Today (2015). Измененные уровни этих белков в плазме или сыворотке ассоциированы с возникновением таких заболеваний, как ревматоидный артрит (Maksymowych et al., Clin. Exp. Rheumatol. (2014) 32: S35-S39), васкулиты крупных сосудов, включая артериит Такаэсу и гигантоклеточный артериит (Chakravarti et al., Arthritis Rheumatol. (2015) 67: 1913-1921), рак (Matta et al., Exper. Opin. Ther. Targets (2012) 16: 515-523), болезнь Паркинсона (Slone et al., Neurobiol. Dis. (2015) 79: 1-13) и болезнь Альцгеймера (Steinacker et al., Semin. Cell Dev. Biol. (2011) 22: 696-704). Результаты, описанные здесь, являются первым опытом идентификации повышенных уровней белка 14-3-3зета/дельта в плазме у пациентов с НАЕ по сравнению с плазмой у здоровых добровольцев.

Еще одни белки плазмы, идентифицированные как отклоняющиеся у пациентов, имеющих НАЕ, по сравнению со здоровыми субъектами, включают IL-1F6 (также известный как интерлейкин-36 альфа); протеинкиназы: тирозинпротеинкиназу YES, тирозинпротеинкиназу LYN и митоген-активируемую протеинкиназу 14 (MAPK14); киназу гликогенсинтазакиназы-3альфа/бета (GSK-3-альфа/бета); АТФ-зависимую РНК-геликазу DDX19B (белок DEAD-box 19B); и эукариотический фактор инициации трансляции 5A1 (eIF-5A-1) (табл. 1). Как показано на фиг. 6, уровни IL-1F6 были достоверно ниже в образцах плазмы от пациентов с НАЕ; в то время, как показано на фиг. 7-10, уровни тирозинпротеинкиназы YES, тирозинпротеинкиназы LYN, MAPK14, GSK-3-альфа/бета, белка DEAD-box 19B и eIF-5A-1 были достоверно повышены в образцах плазмы пациентов с НАЕ.

Протеомный анализ выявил более 150 белков, которые присутствовали на уровнях, которые различались между пациентами с НАЕ и здоровыми субъектами. Любой из белков, идентифицированных здесь, может использоваться в качестве биомаркера (самостоятельно или в комбинации (панель биомаркеров)) для заболеваний, ассоциированных с контактной системой активации, например, для идентификации пациентов, которые имеют риск развития заболевания, ассоциированного с контактной системой активации (например, НАЕ), отбора кандидата для лечения, мониторинга прогрессирования заболевания или стадии заболевания, оценки эффективности лечения заболевания, определения курса лечения, выявления того, насколько заболевание или расстройство ассоциировано с контактной системой активации, и/или для исследовательских целей, включая, например, изучение механизма заболевания, на который можно основываться при разработке новых методов лечения.

Другие варианты осуществления.

Все признаки, раскрытые в данной заявке, могут быть объединены в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в данном описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или аналогичной цели. Таким образом, если прямо не указано иное, то каждый раскрытый признак является лишь примером общей серии эквивалентных или сходных признаков.

Из вышеприведенного описания специалист в данной области техники может легко определить основные характеристики настоящего изобретения и, не отступая от его сущности и объема, может сделать различные изменения и модификации настоящего изобретения, чтобы адаптировать его к различным применениям и условиям. Таким образом, другие варианты осуществления также находятся в объеме формулы изобретения.

Эквиваленты и объем изобретения.

Специалисты в данной области техники поймут или смогут определить, используя не более чем обычное экспериментирование, много эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных здесь. Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения вышеприведенным описанием, а скорее, ограничивается прилагаемой формулой изобретения.

В формуле изобретения форма единственного числа может означать один или более чем один, если не указано иное или не следует из контекста. Формула изобретения или описание, которые включают "или" между одним или более членами группы, считаются выполненными, если один, более одного или все члены группы присутствуют, используются или иным образом относятся к данному продукту или способу, если не указано иное или не следует из контекста. Настоящее раскрытие включает варианты осуществления, в которых точно один член группы присутствует, используется или иным образом относится к данному продукту или способу. Настоящее раскрытие включает варианты осуществления, в которых более одного или все члены группы присутствуют, используются или иным образом относятся к данному продукту или способу.

Кроме того, настоящее раскрытие охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или более ограничений, элементов, положений и описательных терминов из одного или более перечисленных пунктов формулы изобретения вводят в другой пункт формулы изобретения. Например, любой пункт формулы изобретения, который зависит от другого пункта формулы изобретения, может быть изменен для включения одного или более ограничений, обнаруженных в любом другом пункте формулы изобретения, который зависит от того же основного пункта. Если элементы представлены в виде списков, например, в формате группы Маркуша, то также раскрывается каждая подгруппа элементов, и любой элемент(ы) может быть удален из группы. Следует понимать, что, в общем, если настоящее раскрытие или аспекты настоящего раскрытия упоминаются как содержащие конкретные элементы и/или признаки, то определенные варианты осуществления настоящего раскрытия или аспекты настоящего раскрытия состоят или состоят по существу из таких элементов и/или признаков. В целях упрощения эти

варианты осуществления не были конкретно изложены в настоящем документе. Также следует отметить, что термины "содержащий" и "включающий" являются открытыми терминами и допускают включение дополнительных элементов или стадий. Там, где указаны диапазоны, то включаются конечные точки. Кроме того, если не указано иное или не следует из контекста и понимания у специалиста в данной области техники, то значения, которые выражены в виде диапазонов, могут принимать любое конкретное значение или субдиапазон в пределах указанных диапазонов в различных вариантах осуществления настоящего раскрытия, десятая доля единицы нижнего предела диапазона, если контекст явно не указывает иное.

В данной заявке приводятся различные выданные патенты, опубликованные патентные заявки, журнальные статьи и другие публикации, которые все включены здесь посредством ссылки. Если возникает конфликт между любой из включенных ссылок и настоящим описанием, то за образец нужно брать описание. Кроме того, любой конкретный вариант осуществления настоящего раскрытия, который относится к предшествующему уровню техники, может быть просто исключен из любого одного или более пунктов формулы изобретения. Поскольку такие варианты осуществления считаются известными для специалиста средней квалификации в данной области техники, то они могут быть исключены, даже если это исключение явно не указывается в данном документе. Любой конкретный вариант осуществления настоящего раскрытия может быть исключен из любого пункта формулы изобретения по любой причине, независимо от того, связано это с его наличием на предшествующем уровне техники.

Специалисты в данной области техники поймут или смогут определить, используя не более чем обычное экспериментирование, много эквивалентов конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных здесь. Объем настоящего изобретения не предназначен для ограничения вышеприведенным описанием, а скорее, ограничивается прилагаемой формулой изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что могут быть сделаны различные изменения и модификации этого описания, не отступая от сущности или объема настоящего раскрытия, как определено в следующей формуле изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ анализа уровня набора биомаркеров в образце субъекта, имеющего наследственный ангионевротический отек (НАЕ), с подозрением на его наличие или с риском его развития, включающий:

(i) обеспечение биологического образца, полученного от субъекта, имеющего НАЕ, с подозрением на его наличие или с риском его развития; и

(ii) измерение уровня панели биомаркеров, которая включает, по меньшей мере, один белок, выбранный из группы, состоящей из следующих: Белок C4 системы комплемента, Интерлейкин-36 альфа (IL-1F6), Эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1 (eIF-5A-1), Митохондриальный белок теплового шока 60 кДа (HSP 60), Семейство белков 14-3-3, АТФ-зависимая РНК-геликаза DDX19B (белок DEAD-box 19B), Митоген-активируемая протеинкиназа 14 (MAPK14), Тирозинпротеинкиназа Lyn (LYN), Киназа гликогенсинтазы-3-альфа/бета (GSK-3 альфа/бета), Тирозинпротеинкиназа Yes (YES), Митоген-активируемая протеинкиназа 3 (ERK-1), Цитохром P450 3A4, Протеинкиназа C альфа-типа (PKC-A), Тирозинпротеинкиназа Lyn, изоформа B (LYNB), Белок C2 системы комплемента, Тирозинпротеинкиназа CSK (CSK), Сортирующий нексин 4, Малый убиквитин-подобный модификатор 3 (SUMO3), Протеиндисульфидизомераза A3, MAP киназа-активируемая протеинкиназа 2 (MAPK2), Тирозинпротеинкиназа BTK (BTK), EGF-содержащий фибулин-подобный белок 1 внеклеточного матрикса (FBLN3), Комплекс циклинзависимая киназа 8:циклин-C (CDK8/циклин C), Пируваткиназа PKM (M2-PK), Белок 14-3-3 тета, Тирозинпротеинкиназа Fer (FER), Тирозинпротеинкиназа Fyn (FYN), 71кДа-гомолог белка теплового шока (HSP70 белок 8), Пептидил-пролил-цис-изомераза D (PPID), RAC-альфа/бета/гамма серин/треониновая протеинкиназа (PKB a/b/g), Кальцинейрин, Гистон-лизин-N-метилтрансфераза EHMT2 (NG36), Хаа-Pro аминокептидаза 1 (XPNPEP1), 3-гидроксиацил-CoA-дегидрогеназа типа-2 (ERAB), Серин/треониновая протеинкиназа PAK 6 (PAK6), Белок 1 внутриклеточных хлоридных каналов (NCC27), Белок 2, связанный с рецептором фактора роста (адаптерный белок GRB2), Сфингозинкиназа 1, Метионинаминопептидаза 1 (METAP1), C1r-субкомпонент системы комплемента, Убиквитин-подобный модификатор-конъюгирующий фермент 1 (UFC1), Переносчик сигнала и активатор транскрипции 1-альфа/бета (STAT1), Альфа-энолаза, Переносчик сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3), Трансляционно контролируемый опухолевый белок (TCTP), Матери против декапентаплегического гомолога 3 (SMAD3), Киназа 1 бета-адренорецептора (BARK1), Митоген-активируемая протеинкиназа 1 (MK01), Матери против декапентаплегического гомолога 2 (SMAD2), cAMP-регулируемый фосфопроtein 19 (ARP19), Белок созревания рибосом SBDS (SBDS), Легкая цепь динеина roadblock-type 1 (DLRB1), Bcl-2-подобный белок 1, Белок 14-3-3 бета/альфа, Эукариотический фактор инициации трансляции 4 гамма 2 (IF4G2), Протеинфосфатаза 3 двойной специфичности (DUS3), Белок, содержащий суперспиральный домен 80 (URB), Белок теплового шока бета-1 (HSP 27), Кофилин-1, 3-фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа 1 (PDPK1), Интерлейкин-17B (IL-17B), Нуклеозидифосфат-киназа B (NDP-киназа B), Ras-зависимый C3 субстрат ботулинистического токсина 1 (RAC1), Плазм

менный прекалликреин, Тирозинпротеинкиназа Тес (ТЕС), Медиатор транскрипции субъединицы 1 РНК-полимеразы II (MED-1), Тромбоцитарный гликопротеин VI (GPVI), Белок теплового шока HSP 90-альфа/бета (HSP 90a/b), Протеинкиназа С бета-типа (сплайсинговый вариант бета-II) (PKC-B-II), Глицилпептид N-тетрадеканоилтрансфераза 1 (NMT1), Бета-Ala-His дипептидаза (CNDP1), Альдегидредуктаза афлатоксина В1 член 2, Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза А (циклофилин А), Тромбопоэтин (Тро), Белок amnionless (AMNLS), Дребрин-подобный белок (DBNL), Лактадгерин (MFGM), Альфа-2-макроглобулин, Член 2 семейства метилтрансфераз НемК (HEMK2), Ангиотензиноген, Трансгелин-2 (трансгелин-2), Тирозинпротеинфосфатаза нерцепторная типа 6 (PTP-1C), Протеинкиназа С тета-типа (KPCT), Кальпаин I, Рецептор эпидермального фактора роста (ERBB1), сАМР-зависимой протеинкиназы каталитическая субъединица альфа (PRKACA), Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH, печень), Комплекс интегрин альфа-I: бета-1 (интегрин  $\alpha 1 \beta 1$ ), Фактор роста фибробластов 17 (FGF-17), Белок теплового шока HSP 90-бета (HSP 90b), Белок-ингибитор роста 1 (ING1), Кошаперон Hsp90 Cdc37 (CDC37), Фактор системы комплемента D, Серотрансферрин (трансферрин), Белок вакуолярного сортирования-ассоциированный белок VTA1, гомолог (DRG-1), Адаптерная молекула crk (CRK), Метионинаминопептидаза 2 (AMPM2), Активатор плазминогена тканевого типа (tPA), Субъединица бета-1 импортина (IMB1), Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, субъединица дельта (CAMK2D), Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGF sR2), Гистондеацетилаза 8 (HDAC8), Карбоангидраза 13, Субъединица O АТФ-синтазы митохондриальной (АТРО), Митоген-активируемая протеинкиназа 3 двойной специфичности 3 (MP2K3), Гистон H2A.z, Тирозинпротеинкиназа протоонкогена Src (SRCN1), Бета-2-макроглобулин, Гемоглобин, Рецептор костного морфогенетического белка типа-1A (BMPRI1A), Нейрогенный локус, гомолог белка notch 1 (Notch 1), Тромбин, Каллистратин, Дизинтегрин А и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 13 (ATS13), Лактопероксидаза (PERL), Эукариотический фактор инициации трансляции 4Н (eIF-4H), Макрофагальный рецептор маннозы 1, E3 убиквитин-протеин-лигаза Mdm2 (MDM2), Супероксиддисмутаза [Mn] митохондриальная (Mn SOD), член В семейства с лектиновым доменом С-типа (CLC1B), Рецептор D интерлейкина-17 (IL-17 RD), E3 убиквитин-протеин-лигаза CHIP (CHIP), Рецептор фактора роста гепатоцитов (Met), Глобулин, связывающий половые гормоны (SHBG), Каспаза-3, Катепсин L2 (катепсин V), Молекула 1 адгезии нервных клеток, изоформа 120 кДа (NCAM-120), Белок 6, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-6), Интерлейкин-19 (IL-19), член К семейства 4 с лектиновым доменом С-типа (CLC4K), Цепь тропомиозина альфа-4 (тропомиозин 4), Фрагмент фибронектина 3 (FN1.3), Белок 14-3-3 зета/дельта, Дипептидилпептидаза 2 (DPP2), Фосфоглицератмутаза 1, Рецептор интерлейкина-1 типа 2 (IL-1 sRII), Склеростин (SOST), Белок 1, связывающий жирные кислоты, сердце (FABP), Пропердин, Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 3 (VEGF sR3), Гистон H2B типа 2-E (H2B2E), Сериновая протеаза HTRA2, митохондриальная (HTRA2), Рецептор нетрина UNC5D (UNC5H4), Гаптоглобин, Карбоангидраза 6, Белок C4b системы комплемента, Фактор некроза опухолей-индуцибельного гена белок 6 (TSG-6), Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, субъединица альфа (CAMK2A), PIK3CA/PIK3R1 (PIK3CA/PIK3R1) и NudC домен-содержащий белок 3 (NUDC3) или их комбинация, где, если панель биомаркеров состоит из одного белка, то указанный белок не является C4, плазменным прекалликреином, тромбином, активатором плазминогена тканевого типа (tPA) и белком теплового шока 90.

2. Способ по п.1, где панель биомаркеров состоит из 2-10 белков.
3. Способ по п.1 или 2, где биологический образец представляет образец сыворотки или образец плазмы.
4. Способ по любому из пп.1-3, где HAE представляет HAE I типа или HAE II типа.
5. Способ по любому из пп.1-4, где, по меньшей мере, один белок представляет митохондриальный белок, выбранный из группы, состоящей из субъединицы O АТФ-синтазы (АТРО), циклофилина F и митохондриального белка 60 теплового шока (HSP60).
6. Способ по любому из пп.1-4, где, по меньшей мере, один белок представляет белок 14-3-3 зета/дельта или 14-3-3 бета/альфа.
7. Способ по любому из пп.1-4, где, по меньшей мере, один белок представляет протеинкиназу, выбранную из группы, состоящей из протеинкиназы YES, протеинкиназы LYN и митоген-активируемой протеинкиназы 14 (MAPK14).
8. Способ по любому из пп.1-4, где, по меньшей мере, один белок выбран из группы, состоящей из киназы гликогенсинтазы-3-альфа/бета, АТФ-зависимой РНК-геликазы DDX19B и эукариотического фактора инициации трансляции 5A-1.
9. Способ по любому из пп.1-8, где стадия (i) включает отбор биологического образца в вакуумную пробирку для забора крови, которая содержит один или более ингибиторов протеаз.
10. Способ по любому из пп.1-9, где стадию (ii) проводят с использованием твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), анализа иммуноблоттингом или латерального проточного иммуноанализа.
11. Способ по любому из пп.1-10, где субъектом является пациент-человек.
12. Способ по любому из пп.1-11, дополнительно включающий идентификацию субъекта как име-

ющего НАЕ, если уровень панели биомаркеров субъекта отклоняется от уровня той же панели биомаркеров у контрольного субъекта.

13. Способ по п.12, дополнительно включающий введение субъекту эффективного количества терапевтического агента для лечения НАЕ, если субъект идентифицирован как имеющий НАЕ.

14. Способ по п.13, где терапевтический агент представляет ингибитор плазменного калликреина (pKal), ингибитор рецептора брадикинина-2 (B2R) и/или ингибитор С1-эстеразы.

15. Способ по п.14, где ингибитор pKal представляет анти-pKal-антитело или ингибиторный пептид.

16. Способ по п.15, где ингибитор pKal представляет ланаделумаб или экаллантид.

17. Способ по п.14, где ингибитор B2R представляет ингибиторный пептид.

18. Способ по п.17, где ингибиторный пептид представляет икатибант.

19. Способ по п.14, где терапевтический агент является ингибитором С1-эстеразы, который представляет выделенный из плазмы человека ингибитор С1-эстеразы.

20. Способ по любому из пп.1-11, где субъект представляет собой пациента-человека, который проходит лечение НАЕ, и где способ дополнительно включает оценку эффективности лечения на основе уровня панели биомаркеров, отклонения уровня панели биомаркеров у субъекта от такового у контрольного субъекта, указывающих на эффективность лечения.

21. Способ по любому из пп.1-11, дополнительно включающий идентификацию подходящего лечения для субъекта на основе уровня панели биомаркеров.

22. Способ по любому из пп.1-11, дополнительно включающий идентификацию субъекта в качестве кандидата для лечения НАЕ на основе уровня панели биомаркеров.

23. Набор для анализа уровня набора биомаркеров в образце субъекта, имеющего наследственный ангионевротический отек (НАЕ), с подозрением на его наличие или с риском его развития, где набор включает:

(i) первый связывающий агент, специфичный для первого белкового биомаркера, выбранного из группы, состоящей из следующих: Белок С4 системы комплемента, Интерлейкин-36 альфа (IL-1F6), Эукариотический фактор инициации трансляции 5A-1 (eIF-5A-1), Митохондриальный белок теплового шока 60 кДа (HSP 60), Семейство белков 14-3-3, АТФ-зависимая РНК-геликаза DDX19B (белок DEAD-box 19B), Митоген-активируемая протеинкиназа 14 (MAPK14), Тирозинпротеинкиназа Лун (LYN), Киназа гликогенсинтазы-3-альфа/бета (GSK-3 альфа/бета), Тирозинпротеинкиназа YES (YES), Митоген-активируемая протеинкиназа 3 (ERK-1), Цитохром P450 3A4, Протеинкиназа С альфа-типа (PKC-A), Тирозинпротеинкиназа Лун, изоформа В (LYNB), Белок С2 системы комплемента, Тирозинпротеинкиназа CSK (CSK), Сортирующий нексин 4, Малый убиквитин-подобный модификатор 3 (SUMO3), Протеиндисульфидизомераза А3, MAP киназа-активируемая протеинкиназа 2 (MAPK2), Тирозинпротеинкиназа ВТК (ВТК), EGF-содержащий фибулин-подобный белок 1 внеклеточного матрикса (FBLN3), Комплекс циклинзависимая киназа 8:циклин-С (СБК8/циклин С), Пируваткиназа PKM (M2-PK), Белок 14-3-3 тета, Тирозинпротеинкиназа Fer (FER), Тирозинпротеинкиназа Fyn (FYN), 71 кДа-гомолог белка теплового шока (HSP70 белок 8), Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза D (PPID), RAC-альфа/бета/гамма серин/треониновая протеинкиназа (PKB a/b/g), Кальцинейрин, Гистон-лизин-N-метилтрансфераза EHMT2 (NG36), Хаа-Pro аминоксипептидаза 1 (XPNPEP1), 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа типа-2 (ERAB), Серин/треониновая протеинкиназа PAK 6 (PAK6), Белок 1 внутриклеточных хлоридных каналов (NCC27), Белок 2, связанный с рецептором фактора роста (адаптерный белок GRB2), Сфингозинкиназа 1, Метионинаминопептидаза 1 (METAP1), С1г-субкомпонент системы комплемента, Убиквитин-подобный модификатор-конъюгирующий фермент 1 (UFC1), Переносчик сигнала и активатор транскрипции 1-альфа/бета (STAT1), Альфа-энолаза, Переносчик сигнала и активатор транскрипции 3 (STAT3), Трансляционно контролируемый опухолевый белок (TCTP), Матери против декапентаплегического гомолога 3 (SMAD3), Киназа 1 бета-адренорецептора (BARK1), Митоген-активируемая протеинкиназа 1 (MK01), Матери против декапентаплегического гомолога 2 (SMAD2), сАМР-регулируемый фосфопротеин 19 (ARP19), Белок созревания рибосом SBDS (SBDS), Легкая цепь динеина goadblock-type 1 (DLRB1), Bcl-2-подобный белок 1, Белок 14-3-3 бета/альфа, Эукариотический фактор инициации трансляции 4 гамма 2 (IF4G2), Протеинфосфатаза 3 двойной специфичности (DUS3), Белок, содержащий суперспиральный домен 80 (URB), Белок теплового шока бета-1 (HSP 27), Кофилин-1, 3-фосфоинозитид-зависимая протеинкиназа 1 (PDPK1), Интерлейкин-17В (IL-17B), Нуклеозиддифосфат-киназа В (NDP-киназа В), Ras-зависимый С3 субстрат ботулинистического токсина 1 (RAC1), Плазменный прекалликреин, Тирозин-протеинкиназа Тес (ТЕС), Медиатор транскрипции субъединицы 1 РНК-полимеразы II (MED-1), Тромбоцитарный гликопротеин VI (GPVI), Белок теплового шока HSP 90-альфа/бета (HSP 90a/b), Протеинкиназа С бета-типа (сплайсинговый вариант бета-II) (PKC-B-II), Глицилпептид N-тетрадеканойлтрансфераза 1 (NMT1), Бета-Ala-His дипептидаза (CNDP1), Альдегидредуктаза афлатоксина В1 член 2, Пептидил-пролил-цис/транс-изомераза А (циклофилин А), Тромбопоэтин (Тро), Белок amnionless (AMNLS), Дребрин-подобный белок (DBNL), Лактадгерин (MFGM), Альфа-2-макроглобулин, Член 2 семейства метилтрансфераз НемК (HEMK2), Ангиотензиноген, Трансгелин-2 (трансгелин-2), Тирозинпротеинфосфатаза нерцепторная типа 6 (PTP-1C), Протеинкиназа С тета-типа (KPCT), Кальпа-

ин I, Рецептор эпидермального фактора роста (ERBB1), сАМР-зависимой протеинкиназы каталитическая субъединица альфа (PRKACA), Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH, печень), Комплекс интегрин альфа-1: бета-1 (интегрин *alb1*), Фактор роста фибробластов 17 (FGF-17), Белок теплового шока HSP 90-бета (HSP 90b), Белок-ингибитор роста 1 (ING1), Кошаперон Hsp90 Cdc37 (CDC37), Фактор системы комплемента D, Серотрансферрин (трансферрин), Белок вакуолярного сортирования-ассоциированный белок VTA1, гомолог (DRG-1), Адаптерная молекула *crk* (CRK), Метионинаминопептидаза 2 (AMPM2), Активатор плазминогена тканевого типа (*tPA*), Субъединица бета-1 импортина (IMB1), Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, субъединица дельта (CAMK2D), Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 2 (VEGF sR2), Гистондеацетилаза 8 (HDAC8), Карбоангидраза 13, Субъединица O АТФ-синтазы митохондриальной (АТРО), Митоген-активируемая протеинкиназа 3 двойной специфичности 3 (MP2K3), Гистон H2A.z, Тирозинпротеинкиназа протоонкогенов Src (SRCN1), Бета-2-микроглобулин, Гемоглобин, Рецептор костного морфогенетического белка типа-1A (BMPR1A), Нейрогенный locus, гомолог белка notch 1 (Notch 1), Тромбин, Каллестатин, Дизинтегрин А и металлопротеиназа с мотивами тромбоспондина 13 (ATS13), Лактопероксидаза (PERL), Эукариотический фактор инициации трансляции 4Н (eIF-4H), Макрофагальный рецептор маннозы 1, E3 убиквитин-протеин-лигаза Mdm2 (MDM2), Супероксиддисмутаза [Mn] митохондриальная (Mn SOD), член В семейства с лектиновым доменом С-типа (CLC1B), Рецептор D интерлейкина-17 (IL-17 RD), E3 убиквитин-протеин-лигаза CHIP (CHIP), Рецептор фактора роста гепатоцитов (Met), Глобулин, связывающий половые гормоны (SHBG), Каспаза-3, Катепсин L2 (катепсин V), Молекула 1 адгезии нервных клеток, изоформа 120 кДа (NCAM-120), Белок 6, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-6), Интерлейкин-19 (IL-19), член К семейства 4 с лектиновым доменом С-типа (CLC4K), Цепь тропомиозина альфа-4 (тропомиозин 4), Фрагмент фибронектина 3 (FN1.3), Белок 14-3-3 зета/дельта, Дипептидилпептидаза 2 (DPP2), Фосфоглицератмутаза 1, Рецептор интерлейкина-1 типа 2 (IL-1 sRII), Склеростин (SOST), Белок 1, связывающий жирные кислоты, сердце (FABP), Пропердин, Рецептор фактора роста эндотелия сосудов 3 (VEGF sR3), Гистон H2B типа 2-E (H2B2E), Сериновая протеаза HTRA2, митохондриальная (HTRA2), Рецептор нетрина UNC5D (UNC5H4), Гаптоглобин, Карбоангидраза 6, Белок C4b системы комплемента, Фактор некроза опухолей-индуцибельного гена белок 6 (TSG-6), Кальций/кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа II, субъединица альфа (CAMK2A), PIK3CA/PIK3R1 (PIK3CA/PIK3R1) и NudC домен-содержащий белок 3 (NUDC3); и

(ii) второй связывающий агент, специфичный для второго белкового биомаркера, выбранного из той же группы белковых биомаркеров, из которой выбран первый биомаркер в (i);

где первый белковый биомаркер и второй белковый биомаркер являются различными.

24. Набор по п.23, дополнительно содержащий первый детектирующий агент, который связывается с первым связывающим агентом, и второй детектирующий агент, который связывается со вторым связывающим агентом.

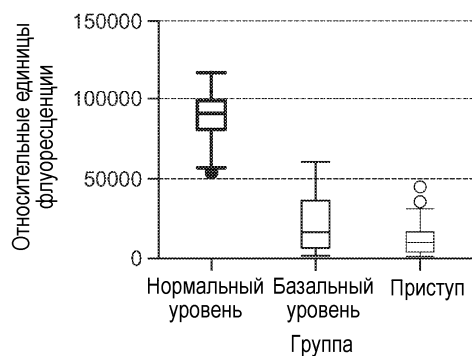
25. Набор по п.23 или 24, где первый связывающий агент представляет антитело, специфичное к первому белковому биомаркеру, и/или второй связывающий агент представляет антитело, специфичное ко второму белковому биомаркеру.

26. Набор по любому из пп.23-25, где первый связывающий агент и второй связывающий агент иммобилизованы на опорном элементе.



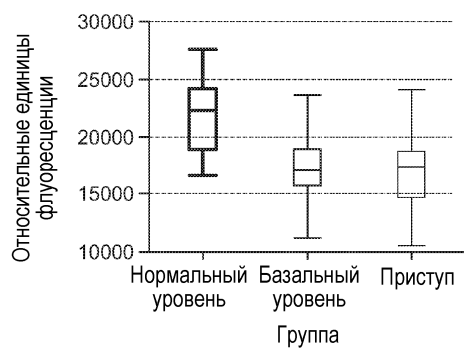
A

C4

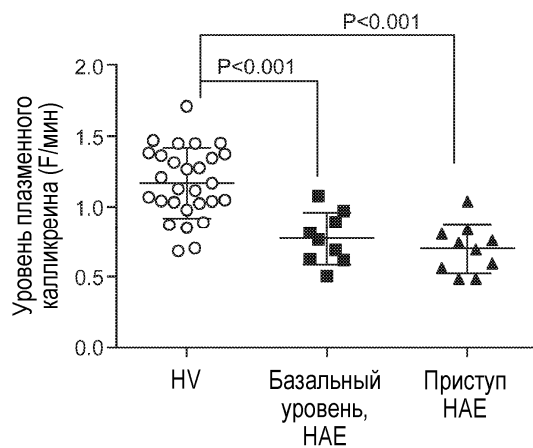


B

Прекалликреин

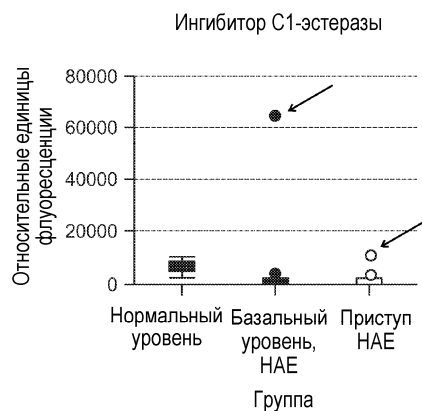


Фиг. 1

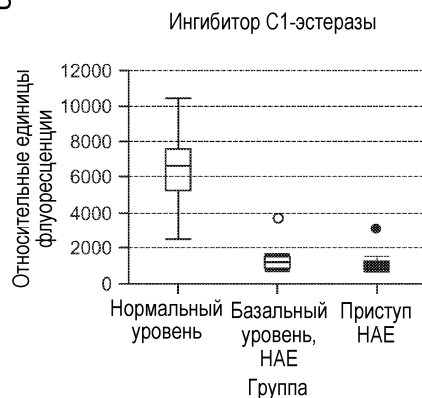


Фиг. 2

A

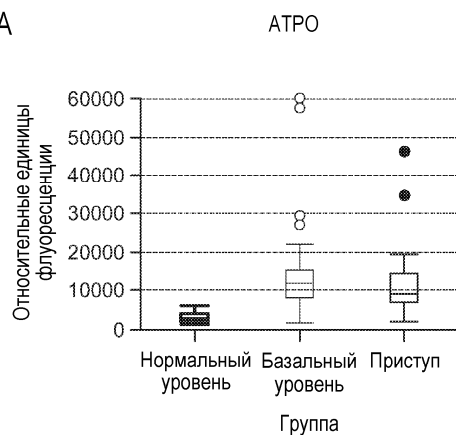


B

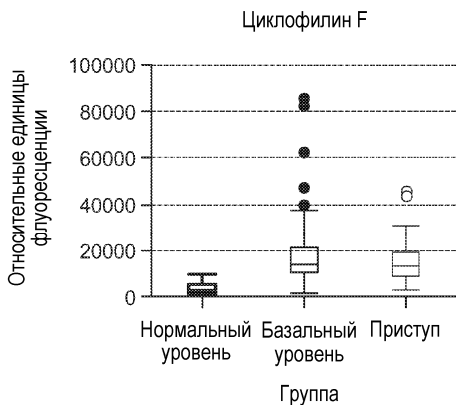


Фиг. 3

A

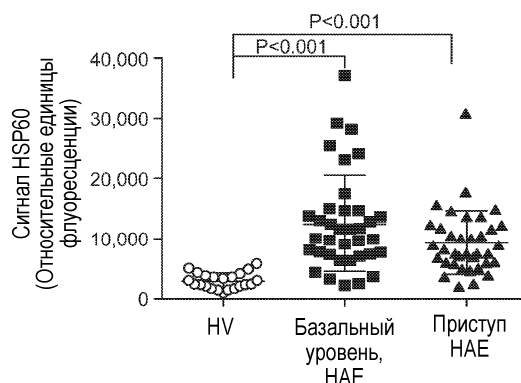


B



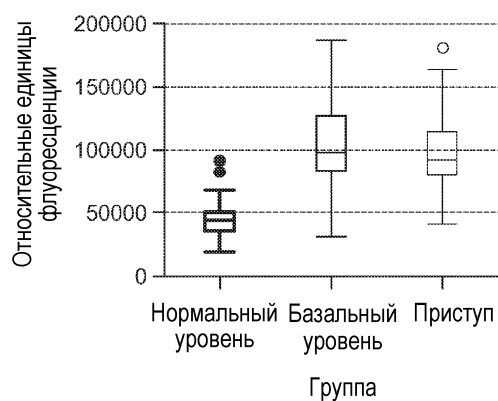
Фиг. 4

С



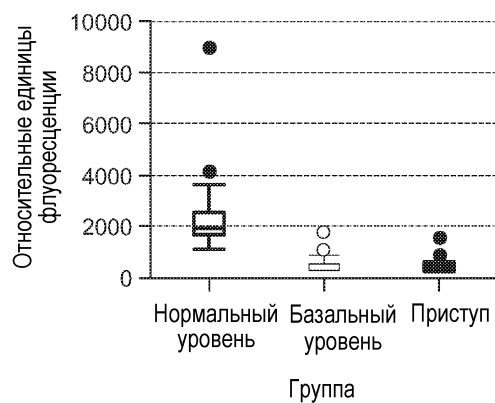
Фиг. 4

Белок 14-3-3 зета/дельта

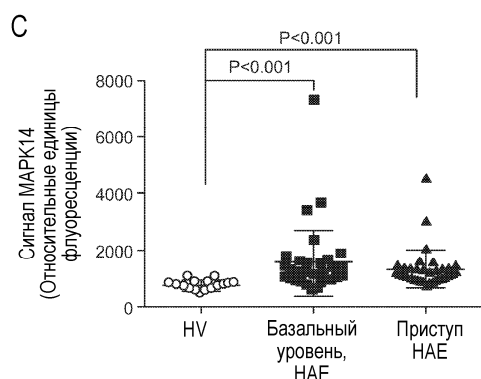
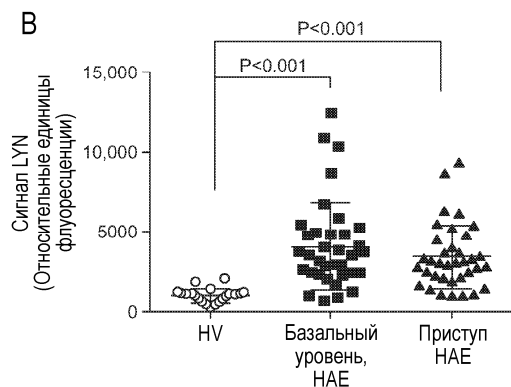
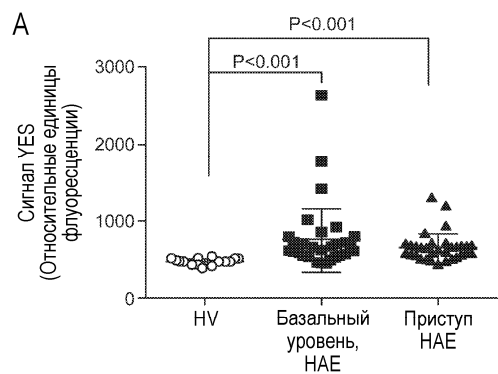


Фиг. 5

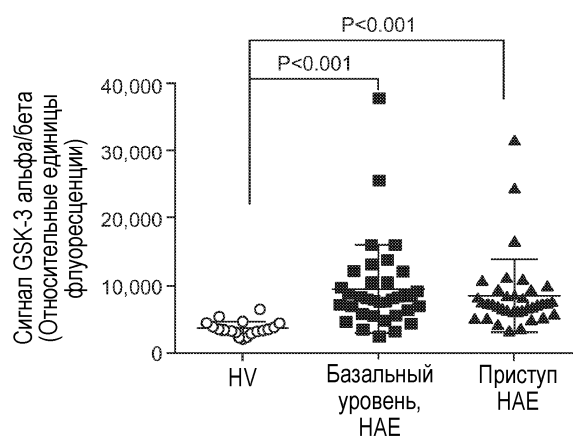
IL-1F6



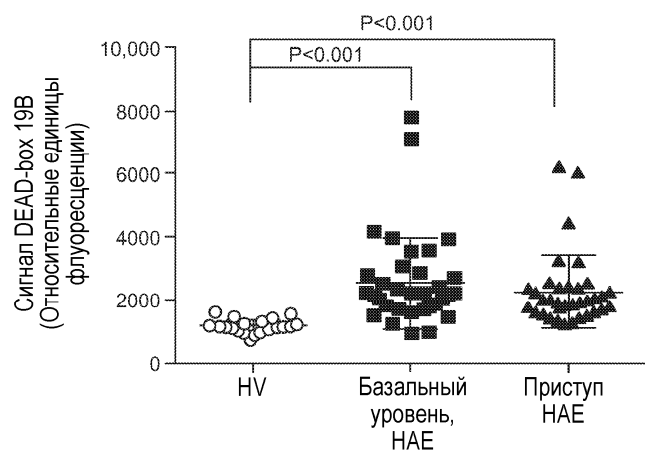
Фиг. 6



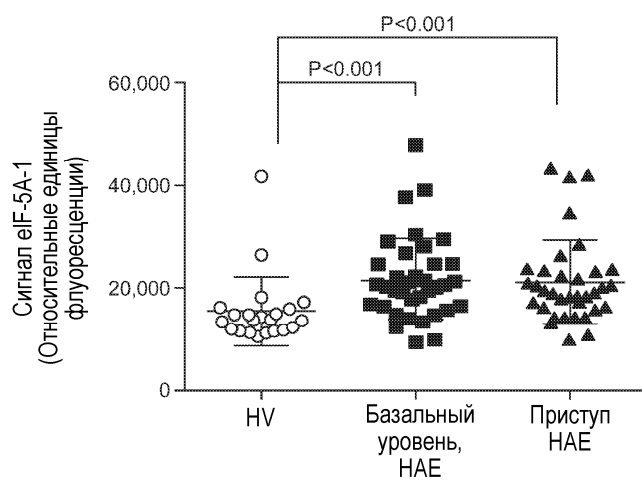
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

