

P-16848

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2019/0002608**Solicitud de patente a nombre de **DYAX CORP.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad DYAX CORP., domiciliada en Lexington, Massachusetts, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al Oficio No. **11398** notificado mediante notificación electrónica el 14 de septiembre de 2020, relacionado con el primer concepto técnico de fondo, y para el cual solicité oportunamente prórroga el 12 de febrero de 2020, atentamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificación al capítulo reivindicatorio

Con fundamento en la facultad que confiere el Artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consta de catorce (14) reivindicaciones y reemplaza completamente el capítulo presentado anteriormente.

Las reivindicaciones del nuevo capítulo reivindicatorio están dirigidas a un método *in vitro* para analizar el nivel de un conjunto de biomarcadores asociados con el angioedema hereditario (HAE). Dicho método se encuentra caracterizado en términos de una series pasos que comprenden (proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto que tenga, se sospeche de tener, o esté en riesgo de tener HAE; medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN seleccionado del grupo de biomarcadores de ARN que consiste en: Citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3), Subunidad 3 con Núcleo de NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa Codificada mitocondrialmente (MT-ND3), Hsa-miR-28-5p, Hsa-miR-423-3p, Hsa-miR-1307-3p, Hsa-miR-885-5p, Hsa-miR-335-3p, Hsa-miR-485-5p, y Hsa-miR-889-3p, o una

combinación de los mismos; y comparar el nivel del biomarcador de ARN establecido en la muestra biológica con el nivel del mismo conjunto de biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un sujeto de control.

En cuanto a estas modificaciones, me permito decir que las mismas no amplían de ninguna manera la materia objeto de la solicitud original, sino que la limiten a un número menor de biomarcadores por lo que es posible afirmar que el nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00.

2. Pago de tasas

En relación con el número de reivindicaciones, atentamente nos permitimos decir que no se adjunta pago por reivindicaciones adicionales, toda vez que el nuevo capítulo reivindicatorio tiene un número de cláusulas menor que el presentado anteriormente.

Asimismo, considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se anexa el comprobante de pago correspondiente a la tasa de modificación a las reivindicaciones, según lo establecido en la Resolución No. 59669 de 2020. En caso de considerar que es necesario realizar un nuevo examen de patentabilidad, solicitamos respetuosamente notificarnos al respecto para proceder a realizar el pago correspondiente.

3. Modificación al título

Con el propósito de adecuar el título de la solicitud de patente al nuevo pliego reivindicatorio, y teniendo en cuenta la amable sugerencia del examinador, se modifica el título de la solicitud como se lee a continuación:

“MÉTODO IN VITRO PARA DETERMINAR ANGIOEDEMA HEREDITARIO POR MEDIO DE BIOMARCADORES DE ARN”

4. El objeto de la solicitud no está exceptuado de patentabilidad

El solicitante manifiesta que, el nuevo capítulo reivindicatorio, la reivindicación 8, que corresponde a la nueva reivindicación 9, ha sido modificada para indicar que la muestra biológica es de un paciente humano. Por consiguiente, la reivindicaciones modificadas definen la fuente de la muestra biológica y no están dirigida al tratamiento de un sujeto humano. Así mismo, el nuevo pliego no contiene la antigua reivindicación 11 objetada por el examinador por considerar que reclama materia exceptuada de patentabilidad,

por lo cual es posible manifestar que el nuevo capítulo reivindicatorio no busca protección para métodos de tratamiento terapéutico aplicados a los seres humanos o a animales, de manera que la invención reivindicada no se encuentra excluida de patentabilidad por el Artículo 20 literal (d) de la Decisión 486/00 y puede ser objeto de patente.

5. Claridad, concisión y sustento de las nuevas reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones, de modo tal que las nuevas reivindicaciones proporcionan claridad y concisión a la invención descrita, a la vez que cuentan con el debido sustento en la descripción de la solicitud.

No obstante lo anterior, a continuación se desea presentar algunas aclaraciones en cuanto a las observaciones realizadas por el examinador en su concepto técnico:

5.1 La reivindicación 1 es clara

El examinador objetó la antigua reivindicación 1 por considerar que carece de claridad y que no incluye el propósito del método en el preámbulo. El examinador además objeta que es necesario incluir un parámetro de referencia para el análisis de los niveles de biomarcadores y que el término "*al menos*" es impreciso e impide establecer el número de biomarcadores a medir.

Al respecto, se hace notar que, si bien no concordamos con el examinador, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud, la reivindicación 1 ha sido modificada, como se muestra en el pliego reivindicatorio adjunto, para reclamar "*un método in vitro para para analizar el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN asociados con el angioedema hereditario (HAE)*" e incluir el paso (iii), que especifica comparar el nivel de biomarcador de ARN en la muestra biológica con el nivel del mismo biomarcador establecido en la muestra de un sujeto de control. Además, la reivindicación 1 ha sido modificada para eliminar el término "*al menos*" y mencionar que el conjunto de biomarcadores comprende una biomarcador de ARN seleccionada de la lista allí enunciada o una combinación de las mismas.

Por lo tanto, en vista de las modificaciones realizadas al pliego reivindicatorio, se solicita respetuosamente la retirada de este rechazo.

5.2 La reivindicación 1 no es concisa

Con respecto a la objeción del examinador en cuanto a la antigua reivindicación 1 no es concisa porque se refiere al biomarcador "Hsa-miR-485-5p" dos veces, se hace notar que la reivindicación 1 se ha modificado eliminando dicho término repetido, con lo cual el nuevo pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción.

5.3 La reivindicación 1 se encuentran sustentadas en la descripción

El examinador objetó que la antigua reivindicación 1 carece de sustento en la descripción. En particular, el examinador argumenta que la solicitud no ha explorado métodos que comprendan el análisis de muestras de pacientes sospechosos con cualquier enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto, excepto el angioedema hereditario (HAE). Así mismo, en la sección 4.3 del oficio de la providencia, el examinador sostiene que la descripción solo admite como biomarcadores a:

"MT-ND3, MT-CO3, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-1307-3p, hsamiR-355-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsamiR-17-5p y hsamiR-885-5p"

Al respecto, no concordamos con esta objeción dado que, como se describe en el Ejemplo 1 y la figura 2, los inventores de la presente solicitud encontraron un número de biomarcadores de RNA que tenían niveles que eran diferentes entre muestras de pacientes con HAE (ataque o basal) y muestras obtenidas de sujetos sanos. Sin embargo, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud, la reivindicación 1 se ha modificado para especificar los biomarcadores indicados por el examinador, junto con Hsa-miRNA-28-5p, y Hsa-miR-889-3p que son detectados diferencialmente en la Figura 2, con lo cual el nuevo pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción.

5.4 Las reivindicaciones 4, 5 y 12 son claras

El examinador objetó la claridad de las reivindicaciones 4, 5 y 13 por considerar que los términos "opcionalmente" o "y/o", impiden establecer el alcance de la modalidad del método reivindicado

Al respecto, se hace notar que, si bien no concordamos con el examinador, solo con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud, las reivindicaciones han sido modificadas eliminando los términos objetados, con lo cual el nuevo pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción.

5.5 La reivindicación 4 es clara

El examinador objetó la claridad de la antigua reivindicación 4 por considerar que abarca más opciones de biomarcadores que las enumeradas en la reivindicación 1.

Al respecto, se hace notar que, si bien no concordamos con el examinador, la reivindicación 4 modificada, que corresponde a la nueva reivindicación 5, implica medir el nivel del conjunto de biomarcadores que comprende un ARN mensajero que codifica para una proteína mitocondrial abarcada por la reivindicación 1 (es decir, la citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3) o la subunidad 3 con núcleo de NADH:ubiquinona oxidorreductasa codificada mitocondrialmente (MT-ND3) o un microARN seleccionado del grupo que consiste de hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-889-3p, hsa-miR-941, RPL23, hsa-miR-328-3p, y hsa-miR-484. Por consiguiente, la nueva reivindicación 5 no amplía el alcance de las reivindicaciones, con lo cual el nuevo pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción.

5.6 Las reivindicaciones 12 y 13 se encuentran sustentadas en la descripción

El examinador objetó que las reivindicaciones 12 y 13 carecen de sustento en la descripción porque se refieren a un kit que comprende dos agentes aglutinantes, los cuales considera no se han descrito adecuadamente. El examinador argumenta que los agentes aglutinantes no se caracterizan estructuralmente ni se puede establecer a qué tipo de molécula corresponden.

Al respecto, respetuosamente disentimos de la opinión del examinador dado que la descripción de la presente solicitud describe varios tipos de aglutinantes que pueden usarse en los kits reivindicados (véase, por ejemplo, las secciones tituladas "Utilidades de los biomarcadores de ARN" (pgs. 8 a 11) y "Kits y dispositivos de detección para medir conjuntos de biomarcadores de ARN" (pgs 28 a 30). Por lo tanto, para el momento en que se presentó la solicitud, una persona del oficio normalmente versada en la materia habría podido reconocer agentes de unión que son capaces de unirse específicamente a los biomarcadores de proteínas enumerados.

Por lo tanto, en vista de estas aclaraciones, se solicita respetuosamente la retirada de este rechazo.

6. Suficiencia de la descripción

El examinador objeta que la descripción no es clara ya que no hay una correspondencia entre lo divulgado en el ejemplo 1 y el análisis de expresión presentado en la Figura 2, porque se menciona que, el marcador hsa-miR-355-3p estuvo elevado en muestras provenientes de pacientes con HAE (Pág. 40, líneas 8 y 9), pero dicha Figura 2 no hace referencia a este marcador y en su lugar señala al marcador hsa-miR-335-3p. EN respuesta a la amble observación del examinador, aclaramos que la referencia a "Hsa-miR-355-3p" en la descripción es errónea y que corresponde a "Hsa-miR-335-3p", como se muestra en la Figura 2. Para corregir esto, se presenta una descripción modificada junto con el presente memorial.

Igualmente, el examinador objeta que la descripción no divulga la invención de manera suficientemente completa para que la persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla (o reproducirla), ya que reclama un método para analizar una muestra biológica que comprende medir el nivel de un conjunto de biomarcadores, dicho conjunto comprende al menos un biomarcador de ARN único seleccionado de doce nombres de moléculas; sin embargo, la solicitud únicamente presenta un desarrollo concreto y explícito mediante pruebas técnicas para un método in vitro para identificar moléculas de ARN presentes diferencialmente en muestras provenientes de pacientes con HAE en comparación con individuos sanos que comprende.

Al respecto, se hace notar que, si bien el solicitante disiente de la opinión del examinador, con el propósito de darle continuidad al trámite de la solicitud, el actual pliego reivindicatorio hace referencia solo al subconjunto de biomarcadores indicados por el examinador, junto con Hsa-miRNA-28-5p, y Hsa-miR-889-3p que son detectados diferencialmente en la Figura 2, y que su medición en muestras de pacientes que tienen o se sospecha que tienen HAE están suficientemente respaldada en la descripción de la solicitud, con lo cual el actual pliego reivindicatorio no da lugar a la objeción. El solicitante se reserva el derecho de solicitar protección para los demás marcadores mediante las solicitudes divisionales a las que dé lugar la solicitud.

Por lo tanto, es posible afirmar que la descripción divulga la invención del actual pliego reivindicatorio de manera suficientemente completa para que la persona normalmente versada en la materia técnica correspondiente pueda ejecutarla (o reproducirla), cumpliendo así con el requerimiento de acuerdo con el artículo 29 de la Decisión 486/00.

7. Nivel inventivo

El examinador establece en su concepto técnico la falta de nivel inventivo del método de las antiguas reivindicaciones 1 a 7, 12 y 13, a la luz de las enseñanzas descritas en los documentos **López-Lera, A., Orphanet Journal of Rare Diseases** (D1) y **WO2016139092** (D2), siendo el documento D1 considerado como el estado de la técnica anterior más cercana al objeto de dichas reivindicaciones.

En particular, el examinador considera que *"La diferencia entre la invención definida en la reivindicación 1 y el método divulgado en el documento D1 consiste en el conjunto específico de biomarcadores de ARN empleados que comprende al menos un biomarcador único seleccionado del grupo que consiste en: Citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3), Subunidad 3 con Núcleo de NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa Codificada mitocondrialmente (MT-ND3), HsamiR- 423-3p, Hsa-miR-1307-3p, Hsa-miR-485-5p, Hsa-miR-16-5p, Hsa-miR-19a-3p, Hsa- miR-20a-5p, Hsa-miR-17-5p, Hsa-miR-885-5p y Hsa-miR-335-3p, en donde si el conjunto de biomarcadores de ARN consiste de un biomarcador de ARN único, el biomarcador no es hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, y hsa-miR-20a-5p."*

Sin embargo, el examinador considera que no se evidencia un efecto asociado al emplear uno o varios de los biomarcadores específicos señalados en la reivindicación 1, en razón a que: (i) la reivindicación no incluye el propósito del método reivindicado, (ii) no señala de manera precisa la cantidad de biomarcadores empleados en el análisis, (iii) no menciona que nivel de cada biomarcador se relaciona con el diagnóstico del angioedema hereditario. Además, considera que de acuerdo con las pruebas técnicas los biomarcadores: has-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, y hsa-miR-485-5p, están incrementados en su expresión en pacientes con HAE pero, al mismo tiempo, se reportan como disminuidos en pacientes con HAE durante un ataque en comparación con un estado basal, por lo que no podrían ser biomarcadores conclusivos para el diagnóstico de dichas enfermedades.

En este sentido, se desea llamar la atención sobre el particular que el artículo 18 de la Decisión 486/00 determina que *"una invención tiene nivel inventivo, si para una **persona del oficio normalmente versada en la materia técnica** correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".* (El subrayado es nuestro).

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. El análisis de nivel inventivo **debe**

demostrar la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Considerando la definición anterior, a continuación, se proceden a destacar las diferencias entre la materia del actual pliego reivindicatorio y lo divulgado en los documentos D1 y D2, mostrando cómo dichas diferencias proporcionan un efecto técnico inesperado que no podría haber sido derivado de manera obvia a partir de las enseñanzas del arte previo citado por el examinador, para así evidenciar la no obviedad de la invención reclamada por el solicitante.

Como primera medida, se hace notar que las reivindicaciones del nuevo capítulo reivindicatorio están dirigidas a un método *in vitro* para analizar el nivel de un conjunto de biomarcadores asociados con el angioedema hereditario (HAE). Dicho método se encuentra caracterizado en términos de una serie de pasos que comprenden (proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto que tenga, se sospeche de tener, o esté en riesgo de tener HAE; medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN seleccionado del grupo de biomarcadores de ARN que consiste en: Citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3), Subunidad 3 con Núcleo de NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa Codificada mitocondrialmente (MT-ND3), Hsa-miR-28-5p, Hsa-miR-423-3p, Hsa-miR-1307-3p, Hsa-miR-885-5p, Hsa-miR-335-3p, Hsa-miR-485-5p, y Hsa-miR-889-3p, o una combinación de los mismos; y comparar el nivel del biomarcador de ARN establecido en la muestra biológica con el nivel del mismo conjunto de biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un sujeto de control.

Por su parte, el documento D1 describe el análisis de perfiles de expresión de ARN de muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con HAE, mientras que el documento D2 informa del análisis de perfiles de expresión de miARN seleccionados, incluidos hsa-miR-413 y hsa-miR-20a, como indicadores de enfermedades, como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, autoinmunes e inflamatorias. Si bien el documento D2 informa cambios de expresión de varios microARN con estados patológicos (junto con otros 24 miARN no relacionados con la presente solicitud), dicho documento no enseña explícitamente qué enfermedades están asociadas con estos cambios de expresión, si no que presenta los cambios en la expresión de miARN para estas enfermedades como un agregado de todas las enfermedades (ver, D2 Figura 1). El examinador afirma que una persona del oficio normalmente versada en la materia se habría sentido motivado para incluir los

biomarcadores de miARN proporcionados por D2 (es decir, hsa-miR-413 y hsa-miR-20a) en el análisis de expresión de pacientes con AEH, informado por D1.

Al respecto, respetuosamente disentimos de la opinión del examinador dado que ni el documento D1 ni el documento D2 divulgan los biomarcadores de ARN reclamado en la nueva reivindicación 1, y mucho menos proporcionan alguna enseñanza o sugerencia de que los biomarcadores de ARN enumerados estarían asociados con el angioedema hereditario (HAE). Como se describe en la descripción de la presente solicitud, se encontró que los niveles de los biomarcadores de ARN reclamados varían (aumentan o disminuyen) en las muestras de los pacientes que tienen angioedema hereditario en comparación con los niveles en sujetos sanos. La presente solicitud describe la identificación de los biomarcadores de ARN reivindicados como asociados con HAE. Además, los inventores descubrieron que varios de los biomarcadores de ARN se expresan diferencialmente durante un ataque de HAE en comparación con el estado inactivo. En consecuencia, los biomarcadores de ARN reclamados y el método in vitro de los mismos permite distinguir entre sujetos que tienen o están en riesgo de tener HAE, y/o analizar si un sujeto tiene riesgo de tener un ataque de HAE. Basándose en las enseñanzas de los documentos D1 y D2, una persona del oficio normalmente versada en la materia no habría tenido ninguna razón para seleccionar los biomarcadores de ARN específicos reivindicados por la presente solicitud.

Así, en vista de las modificaciones realizadas al pliego reivindicación y las aclaraciones aquí presentadas, consideramos que la materia objeto de las nuevas reivindicaciones implica un nivel inventivo con respecto al estado del arte, cumpliendo así con el requerimiento del Artículo 18 de la Decisión 486/00.

8. Conclusiones

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

- i) Las modificaciones aquí presentadas cumplen con las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486;
- ii) La materia del nuevo pliego reivindicatorio no se encuentra excluida de patentabilidad por el Artículo 20 literal (d) de la Decisión 486.
- iii) La materia objeto de las actuales reivindicaciones es clara, concisa y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, el cual también es claro para

una persona normalmente versada en la materia, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 28 y 30 de la Decisión 486;

- iv) El objeto de las nuevas reivindicaciones no se encuentra anticipado por el estado de la técnica, cumpliendo con el requerimiento del Artículo 16 de la Decisión 486;
- v) La invención de la presente solicitud no hubiese resultado obvia para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica, ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con el requerimiento del Artículo 18 de la Decisión 486.

Así, respetuosamente se solicita examinar la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial para la invención titulada "MÉTODO IN VITRO PARA DETERMINAR ANGIOEDEMA HEREDITARIO POR MEDIO DE BIOMARCADORES DE ARN" a nombre de DYAX CORP. y, por lo tanto, a la Superintendencia de Industria y Comercio conceder el privilegio de patente, si los cumplierse; o si el examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos comunicarnos los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación del Artículo 42 del Código de Procedimiento Administrativo y de lo Contencioso Administrativo que señala que: *"Habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión, que será motivada. La decisión resolverá todas las peticiones que hayan sido oportunamente planteadas dentro de la actuación por el peticionario y por los terceros reconocidos"*, (el subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el Artículo 29 de la Constitución Nacional.

9. Anexos

- 9.1** Nuevo capítulo reivindicatorio que incluye catorce (**14**) reivindicaciones.
- 9.2** Descripción modificada.
- 9.3** Recibo de pago por concepto de modificación al pliego reivindicatorio.

Señora Directora,



CAROLINA DAZA MONTALVO

C.C. 66.783.790 de Palmira Valle

TP-141563 CSJ

notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para analizar el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN asociados con el angioedema hereditario (HAE), caracterizado porque comprende:

(i) proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto que tenga, se sospeche de tener, o esté en riesgo de tener HAE;

(ii) medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN seleccionado del grupo de biomarcadores de ARN que consiste en: Citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3), Subunidad 3 con Núcleo de NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa Codificada mitocondrialmente (MT-ND3), Hsa-miR-28-5p, Hsa-miR-423-3p, Hsa-miR-1307-3p, Hsa-miR-885-5p, Hsa-miR-335-3p, Hsa-miR-485-5p, y Hsa-miR-889-3p, o una combinación de los mismos; y

(iii) comparar el nivel del biomarcador de ARN establecido en la muestra biológica con el nivel del mismo conjunto de biomarcadores en una muestra biológica obtenida de un sujeto de control.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el conjunto de biomarcadores consiste de 2-10 biomarcadores de ARN.

3. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el conjunto de biomarcadores comprende Hsa-miR-16-5p, Hsa-miR-17-5p, Hsa-miR-19a-3p, Hsa-miR-20a-5p, o un combinación de los mismos.

4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque el HAE es HAE tipo I o HAE tipo II.

5. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, caracterizado porque el conjunto de biomarcadores de ARN comprende:

(i) un ARN mensajero que codifica para una proteína mitocondrial, que es la citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3) o la subunidad 3 con núcleo de NADH:ubiquinona oxidoreductasa codificada mitocondrialmente (MT-ND3); o

(ii) un microARN seleccionado del grupo que consiste de hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-889-3p, hsa-miR-941, RPL23, hsa-miR-328-3p, y hsa-miR-484.

6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el paso (ii) implica una reacción en cadena de polimerasa o hibridación de ácido nucleico.

7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el sujeto es un paciente humano y la muestra biológica es una muestra de suero o una muestra de plasma.

8. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado además porque comprende identificar al sujeto que tenga HAE si el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN del sujeto se desvía del nivel del mismo conjunto de biomarcadores de ARN del sujeto control.

9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la muestra biológica es de un paciente humano que está en un tratamiento para HAE, y en donde el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN medidos en la muestra, en donde una desviación del nivel del conjunto de biomarcadores de ARN de la muestra biológica del paciente con respecto al nivel del sujeto control es indicativo de la eficacia del tratamiento.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque la muestra biológica es de un paciente humano que tiene un historial de HAE y el conjunto de biomarcadores de ARN comprende uno o más biomarcadores de ARN seleccionados del grupo que consiste de hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, y hsa-miR-485-5p.

11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque comprende identificar al paciente humano como un paciente con riesgo de tener un ataque por HAE con base en el nivel diferencial del conjunto de biomarcadores de ARN en la muestra biológica, en donde una desviación del nivel del conjunto de biomarcadores de ARN del paciente con respecto al del sujeto control será indicativo del riesgo de un ataque por HAE.

12. Un kit para el análisis *in vitro* de una muestra de un sujeto que tenga, se sospeche de tener, o esté en riesgo de tener HAE, caracterizado porque el kit comprende:

(i) un primer agente de unión específico para un primer biomarcador de ARN seleccionado del grupo que consiste en: Citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3), Subunidad 3 con Núcleo de NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa Codificada mitocondrialmente (MT-ND3), Hsa-miR-28-5p, Hsa-miR-423-3p, Hsa-miR-1307-3p, Hsa-miR-885-5p, Hsa-miR-335-3p, Hsa-miR-485-5p y Hsa-miR-889-3p; y

(ii) un segundo agente de unión específico para un segundo biomarcador de ARN seleccionado del mismo grupo que el primer biomarcador de ARN en (i);

en donde el primer biomarcador de ARN y el segundo biomarcador de ARN son diferentes.

13. El kit de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el primer agente de unión es un oligonucleótido complementario para el primer biomarcador de ARN o un fragmento del mismo, y el segundo agente de unión

es un oligonucleótido complementario para el segundo biomarcador de ARN o un fragmento del mismo.

14. El kit de la reivindicación 12 o 13, en el que el primer agente aglutinante, el segundo agente aglutinante o ambos se conjugan con un marcador o el primer agente aglutinante y el segundo agente aglutinante están inmovilizados en un miembro de soporte.

BIOMARCADORES DE ARN PARA ANGIOEDEMA HEREDITARIO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de conformidad con el 35 USC § 119 (e) para las
solicitud provisional de los Estados Unidos número 62/395,811, presentada el 16 de
septiembre de 2016. Los contenidos totales de las solicitudes a las que se hace referencia se
incorporan en la presente como referencia.

CAMPO DE LA INVENCION

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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

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

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

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

Por consiguiente, un aspecto de la presente descripción proporciona los métodos para analizar una muestra que comprende (i) proporcionar una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de suero o una muestras de plasma) obtenida de un sujeto, tal como un sujeto
10 humano, que tenga, se sospeche de tener, o que esté en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto; y (ii) medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN, que comprende al menos un biomarcador de ARN seleccionada de la Tabla 1, en donde si el conjunto de biomarcadores consiste en un biomarcador de ARN, el biomarcador de ARN no son hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, o hsa-miR-20a-5p. En algunas
15 modalidades, la enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto es angioedema hereditario (HAE), tal como el HAE tipo 1 o el HAE tipo II.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores consiste de 2-10 proteínas seleccionadas de la Tabla 1. En algunas modalidades, el biomarcador de ARN es un ARN mensajero que codifica para una proteína mitocondrial, que puede ser la citocromo C oxidasa
20 III codificada mitocondrialmente (MT-CO3) o la subunidad con núcleo de oxidorreductasa codificada mitocondrialmente (MT-ND3). En algunas modalidades, el biomarcador de ARN es un microARN (*por ejemplo*, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-355-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-485-5p).

25 En algunas modalidades, el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN se puede medir mediante un proceso que implica una reacción en cadena de polimerasa y/o hibridación de ácido nucleico.

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

bradiquinina 2 es un péptido inhibidor (por ejemplo, icatibant). En algunos ejemplos, el inhibidor de la esterasa C1 es un inhibidor de la esterasa C1 derivado de plasma humano.

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

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores de ARN comprende uno o más biomarcadores de ARN seleccionados del grupo que consiste de hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, and hsa-miR-485-5p. En algunas modalidades, el método comprende además evaluar el riesgo de un ataque por la enfermedad en el sujeto con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN, una desviación del nivel del conjunto de biomarcadores de ARN del sujeto de aquel de un sujeto control que será indicativo del riesgo de un ataque por la enfermedad.

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

En otro aspecto, se proporciona un kit para analizar una muestra de un sujeto que tenga, se sospeche que tenga, o esté en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema por contacto, el kit comprende un primer agente de unión específico para un primer biomarcador de ARN seleccionado de la Tabla 1; y un segundo agente de unión específico para un segundo biomarcador de ARN seleccionada de la Tabla 1; en donde el primer biomarcador de ARN y el segundo biomarcador de ARN son diferentes. En algunos ejemplos, el primer agente de unión es un oligonucleótido complementario (completa o parcialmente) al primer biomarcador de ARN y/o el segundo agente de unión es un oligonucleótido complementario (completa o parcialmente) específicos para el segundo biomarcador de ARN. El primer agente de unión y el segundo agente de unión pueden estar inmovilizados sobre un miembro de soporte. En algunos casos, el primer agente de unión y/o el segundo agente de unión están conjugados con una marca (por ejemplo, una marca fluorescente).

Los detalles de una o más modalidades de la presente descripción se establecen en la siguiente descripción. Otras características y ventajas de la presente descripción serán

evidentes a partir de los siguientes dibujos y la descripción detallada de las diversas modalidades, y también a partir de las reivindicaciones anexas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La Figura 1 representa una gráfica que muestra niveles aumentados de transcripción para una citocromo oxidasa mitocondrial (MT-CO3) y una NADH deshidrogenasa mitocondrial (MT-ND3) durante tanto el HAE en calma (HAE durante el estado basal) y el HAE durante un ataque. El cambio de plegado de cada transcripción se muestra según se mide mediante secuenciación y mediante RT-qPCR.

La Figura 2 representa gráficas que muestran niveles de los niveles de microARN seleccionados de niveles en muestras de plasma obtenidas de individuos sanos y pacientes con HAE. A: cambio de plegado de la transcripción de ARN en calma (HAE en estado basal) en comparación con un individuo sano ("HV"). B: cambio de plegado de la transcripción de ARN en el HAE durante un ataque en comparación con un individuo sano ("HV"). C: cambio de plegado de la transcripción de ARN en el HAE durante un ataque en comparación con calma (HAE en estado basal).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

El sistema de activación por contacto inicia la vía intrínseca de coagulación y estimula la inflamación a través de la liberación de péptido proinflamatorio bradiquinina. El Factor XII (FXII), también conocido como factor de Hageman, es una serina proteasa que desempeña una función en la activación de las vías intrínsecas de coagulación, así como el sistema de calicreína-quinina. FXII se activa mediante superficies cargadas negativamente (por ejemplo, superficies polianiónicas, vidrio, polifosfato, ácido elálgico) para producir la forma activa FXIIa. El FXIIa activado tiene la capacidad para segmentar la pre-calicreína, generando pKal activa. Posteriormente, la pKal activada es capaz de segmentar el FXII en FXIIa, dando por resultado en un asa de retroalimentación positiva en la cual el FXIIa genera incluso más pKal, que activa además el FXII adicional en FXIIa. La pKal activada también tiene la capacidad para segmentar el quinínogeno de alto peso molecular (HMWK) para liberar la bradiquinina. En las enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto, tal como el HAE, los niveles aumentados de bradiquinina pueden inducir la vasodilatación e inflamación que da por resultado en ataques de HAE edematoso. Se desea identificar los biomarcadores novedosos que se puedan utilizar, por ejemplo, para identificar las enfermedades según se median por el sistema de activación por contacto, identificar sujetos que tengan o que estén en riesgo de

tener una esta enfermedad.

La presente descripción se basa, al menos en parte, en la identificación de ácido nucleicos (ARNs, *por ejemplo*, microARNs y transcripciones de ARN que codifican para proteínas) que estén presentes diferencialmente en muestras biológicas obtenidas
 5 provenientes de sujetos que tengan enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, basal o ataque) en comparación con individuos sanos vía un análisis transcriptómico. Además, se identificaron diversos ARN (por ejemplo, biomarcadores de microARN) según se presenten diferencialmente en muestras biológicas obtenidas de sujetos durante un ataque de una enfermedad del sistema de activación por contacto en comparación
 10 con sujetos que tengan la enfermedad en estado de calma (basal).

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

Biomarcadores de ARN del sistema de activación por contacto

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

aplicaciones no clínicas, por ejemplo, para fines de investigación.

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

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

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

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

Tabla 1: Biomarcadores para la Activación del Sistema por Contacto

Agrupamiento de ARN	Biomarcador de ARN
Función Mitocondrial	Citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-CO3) Subunidad 3 con Núcleo de NADH-Ubiquinona Oxidorreductasa Codificada mitocondrialmente (MT-ND3)
MicroARN	Hsa-miR-423-3p Hsa-miR-1307-3p* Hsa-miR-485-5p Hsa-miR-16-5p Hsa-miR-19a-3p Hsa-miR-20a-5p Hsa-miR-17-5p Hsa-miR-885-5p Hsa-miR-335-3p* Hsa-miR-485-5p*

* Indica los ARN que se identificaron estarán presentes diferencialmente en muestras provenientes de pacientes con HAE durante un ataque en comparación con pacientes con HAE durante calma.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores que se medirá y analizará en cualquiera de los métodos descritos en la presente incluye al menos una (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) ARNs seleccionados de la Tabla 1. Cuando el conjunto de biomarcadores incluya un solo biomarcador de ARN, ese biomarcador de ARN puede no ser hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, o hsa-miR-20a-5p. En algunos ejemplos, el conjunto de biomarcadores de ARN que se medirá y analizará en un método descrito en la presente no incluye una combinación de ninguna de hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, y hsa-miR-20a-5p.

Como se describe en el Ejemplo 1, se encontró sorprendentemente que los diversos ARN que codifican para proteínas implicadas en los procesos y vías celulares similares estuvieron presentes diferencialmente en muestras provenientes de sujetos que tengan HAE en comparación con sujetos sanos. Estos datos indican que los ARN mostrados en la Tabla 1 pueden desempeñar una función en las enfermedades o estar afectados por las mismas asociados con el sistema por contacto.

Los biomarcadores de ARN descritos en la presente pueden estar caracterizados por estar “implicados en” o “asociados con” una vía o actividad particular. En el sentido en que se

utiliza en la presente, los términos “implicados en” o “asociados con” hacen referencia a un ARN que contribuye a la vía. Por ejemplo, un ARN, tal como un ARN que codifica para una proteína o un microARN, que esté implicado o asociado con una vía puede realizar una función dentro de la vía (*por ejemplo*, regular la expresión de otro ácido nucleico o la actividad de una proteína) o codificar una molécula (*por ejemplo*, una proteína) que realiza una función dentro de la vía o el proceso celular.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores de ARN incluye una o más ARN que codifican proteínas mitocondriales según se lista en la Tabla 1.

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores de ARN incluye uno o más microARNs, *por ejemplo*, uno o más microARNs seleccionados de la Tabla 1.

También como se describe en el Ejemplo 1, también se encontró que diversos ARN estuvieron presentes diferencialmente en muestras provenientes de sujetos que tienen HAE durante un ataque por HAE en comparación con sujetos que tengan HAE durante calma (basal). En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye uno o más microARNs, *por ejemplo*, uno o más microARNs seleccionados de la Tabla 1.

Utilidades de los biomarcadores de ARN

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

(i) Análisis de muestras biológicas

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

Una muestra biológica se puede obtener a partir de un sujeto utilizando cualesquiera

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

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

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

Los ejemplos de enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto incluyen, sin limitación, trastornos mediados por calicreína, por ejemplo, un trastorno mediado por bradiquinina, tal como angioedema hereditario (HAE), angioedema idiopático no dependiente de histamina, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, lupus, enfermedad de Alzheimer, choque séptico, lesión por quemaduras, lesión por isquemia cerebral/reperfusión, edema cerebral, retinopatía diabética, nefropatía diabética, edema macular, vasculitis, trombosis arterial o venosa, trombosis asociada con dispositivos o endoprotésis de ayuda ventricular, trombocitopenia inducida por heparina con trombosis, enfermedad tromboembólica, y cardiopatía coronaria con angina de pecho inestable, edema, enfermedad

ocular, gota, enfermedad intestinal, mucositis oral, dolor neuropático, dolor inflamatorio, enfermedad por estenosis espinal-espinal degenerativa, íleo pos-operatorio, aneurisma aórtico, osteoartritis, angioedema hereditario, embolismo pulmonar, accidente cerebrovascular, trauma en la cabeza o edema cerebral peri-tumoral, sepsis, caso isquémico

5 (accidente cerebrovascular) agudo de la arteria cerebral media (MCA), restenosis (por ejemplo, después de la angioplastia), nefritis por lupus sistémico eritematoso, una enfermedad autoinmune, una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiovascular, una enfermedad neurológica, una enfermedad asociada con el mal plegado de proteínas, una enfermedad asociada con la angiogénesis, nefropatía hipertensiva y nefropatía diabética, enfermedades

10 alérgicas y respiratorias (por ejemplo, anafilaxis, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de distrés respiratorio agudo, fibrosis quística, persistente, rinitis), y lesiones en tejidos (por ejemplo, lesión por quemadura o química).

En algunas modalidades, la enfermedad o condición que está asociada con el sistema de activación por contacto es angioedema hereditario (HAE). El angioedema hereditario (HAE)

15 también se conoce como “edema de Quincke”, deficiencia del inhibidor de la esterasa C1, deficiencia de inhibidor C1, y edema angioneurótico hereditario (HANE). El HAE está caracterizado por episodios recurrentes de hinchazón grave (angioedema), que puede afectar, por ejemplo, las extremidades, cara, genitales, tracto gastrointestinal, y vías respiratorias. Los síntomas del HAE incluyen, por ejemplo, hinchazón en los brazos, piernas, labios, ojos,

20 lengua, y/o garganta; bloqueo de las vías respiratorias que puede implicar hinchazón de la garganta y ronquera súbita; episodios repetidos de espasmos abdominales sin causa evidente; y/o hinchazón de los intestinos, que pueden ser grave y pueden conducir a espasmos abdominales, vómitos, deshidratación, diarrea, dolor y/o choque. Aproximadamente un tercio de individuos con HAE desarrollan una escisión sin picazón denominada eritema

25 marginado durante un ataque.

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

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

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

35 Típicamente, los síntomas del HAE primero aparecen en la niñez y empeoran durante la pubertad. En promedio, los individuos no tratados tienen un ataque cada 1 a 2 semanas, y

la mayoría de los episodios duran aproximadamente de 3 a 4 días (ghr.nlm.nih.gov/condition/hereditary-angioedema)). La frecuencia y duración de los ataques varían en gran medida entre las personas con angioedema hereditario, incluso entre las personas de la misma familia.

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

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

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

 Las mutaciones en el gen F12 están asociadas con algunos casos de angioedema hereditario tipo III. El gen F12 proporciona las instrucciones para producir el factor de coagulación XII. Además de desempeñar una función decisiva en el coagulante sanguíneo
30 (coagulación), el factor XII también es un estimulador importante de inflamación y está implicado en la producción de bradiquinina. Ciertas mutaciones en el gen F12 da por resultado en la producción del factor XII con actividad aumentada. Como resultado, se genera más bradiquinina y las paredes de los vasos sanguíneos se hacen más débiles, lo cual conduce a episodios de hinchazón. Sigue siendo desconocida la causa de otros casos de angioedema hereditario tipo III. Las mutaciones en uno o más genes hasta ahora no identificados pueden
35 ser responsables del trastorno en estos casos.

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

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

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

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

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

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

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

Los tratamientos más recientes atacan la cascada por contacto. Escalatida (KALBITOR®) inhibe la calicreína en plasma y se ha aprobado en los Estados Unidos Icatibant (FIRAZYR®, Shire) inhibe el receptor de bradiquinina B2, y se ha aprobado en Europa y los Estados Unidos.

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

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

La muestra biológica descrita en la presente se puede someter a análisis al medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN como se describe en la presente en la muestra biológica. Los niveles (por ejemplo, la cantidad) de un biomarcador descrito en la presente, o los cambios en los niveles de biomarcadores, se pueden evaluar utilizando los ensayos descritos en la presente y/o los ensayos conocidos en la técnica. Uno o más de los biomarcadores descritos en la presente se pueden analizar utilizando métodos convenciones por ejemplo, PCR, hibridación de ácido nucleico, o microensayo. En algunas modalidades, el nivel de un biomarcador se evalúa o se mide al detectar directamente el biomarcador de ARN en una muestra biológica. En algunas modalidades, el biomarcador de ARN se puede amplificar mediante por ejemplo, PCR, antes de la detección.

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

En algunas modalidades, el biomarcador se mide directamente en la muestra biológica, por ejemplo al poner en contacto la muestra con un agente de unión que une selectivamente a uno o más de los biomarcadores de ARN (*por ejemplo*, cualesquiera de los

biomarcadores proporcionados en la Tabla 1). En algunas modalidades, el biomarcador (el ARN o ADNc correspondiente al biomarcador de ARN) se detecta utilizando un método de hibridación, tal como poner en contacto la muestra con una solución de ensayo de ácido nucleico que se una específicamente al biomarcador, métodos de transferencia Southern, o de transferencia Northern.

En algunas modalidades, el agente de unión es un oligonucleótido que sea complementario para un biomarcador de ARN. Los oligonucleótidos para utilizarse en los métodos descritos en la presente son oligonucleótidos (moléculas de ADN o ARN de una sola cadena) que sean complementarios (parcial o completamente) para una región del biomarcador de ARN (o un ADNc correspondiente al biomarcador de ARN).

“Complementario,” en el sentido en que se utiliza en la presente, se refiere a la complementariedad de nucleobases comúnmente conocida en la técnica. Por ejemplo, adenina es complementaria con timina (en el ADN) o uracilo en el ARN; y la guanina es complementaria con citosina. “Complementariedad de secuencias”, o “secuencias de ácido nucleico serán complementarias entre sí”, en el sentido en que se utiliza en la presente, significa cuando las dos moléculas de ácido nucleico están alineadas antiparalelas entre sí, las bases nucleotídicas en cada posición, o como máximo las posiciones en las secuencias son complementarias, y que las dos moléculas de ácido nucleico se pueden hibridar y formar un dúplex bajo condiciones adecuadas, *por ejemplo*, la temperatura de hibridación. Como se sabe en la técnica, no será necesario que una complementariedad de secuencias sea del 100% para que las dos moléculas de ácido nucleico se hibriden y formen un dúplex. La complementariedad de secuencias entre el oligonucleótido y el biomarcador de ARN (o un ADNc correspondiente al biomarcador de ARN) puede ser al menos del 80% complementario con la región correspondiente en el biomarcador de ARN. En algunas modalidades, el oligonucleótido contiene un fragmento que sea de al menos el 80% (*por ejemplo*, 85%, 90%, 95%, 98%, o 100%) complementario con una porción del biomarcador de ARN (o ADNc correspondiente al biomarcador de ARN). En algunos casos, el oligonucleótido contiene un fragmento que sea completamente complementario (100% complementario) con una porción del biomarcador de ARN (o ADNc correspondiente al biomarcador de ARN). Este oligonucleótido se puede utilizar para diferenciar el biomarcador de ARN de ácidos nucleicos sustancialmente similares, por ejemplo, ácidos nucleicos que tengan 1, 2, o 3 diferencias de bases con relación al ácido nucleico blanco.

El oligonucleótido puede contener hasta 100 nucleótidos (*por ejemplo*, hasta 80 nt, 60 nt, 50 nt, o 30 nt). En algunas modalidades, el oligonucleótido puede tener 8-50 nucleótidos de longitud, *por ejemplo*, 8-40, 8-30, 10-30, 15-30, o 15-20 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, el oligonucleótido puede tener 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23,

24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud. En algunos ejemplos, la molécula entera del oligonucleótido es complementaria con una porción de un biomarcador de ARN. En otros ejemplos, un fragmento de oligonucleótido es complementario con una porción de un biomarcador de ARN. Por ejemplo, un oligonucleótido puede contener un ligador (*por ejemplo*,
 5 un ligador poli A o poli T) para unirse a un miembro de soporte. Alternativamente o además, una solución de ensayo para detección puede contener este ligador para conjugación a una marca. El fragmento de un oligonucleótido que sea complementario para una porción de un biomarcador de ARN se puede ubicar en el extremo 5' del oligonucleótido, el extremo 3' del oligonucleótido, o a la mitad del oligonucleótido. En algunas modalidades, el fragmento del
 10 oligonucleótido que es complementario para el biomarcador de ARN puede ser de al menos 10-nucleótido de largo (*por ejemplo*, al menos 12, 15, 18, 20, o 25-nucleótido de largo).

En algunas modalidades, el oligonucleótido comprende uno o más nucleótidos modificados, por ejemplo, que contengan los nucleótidos modificados por un grupo 2'-O-metoxilo, un grupo 2'-O-metoxietilo, y/o un grupo fosforotioato. En algunos ejemplos el
 15 oligonucleótido comprende uno o más ácidos nucleicos bloqueados (LNAs). Un LNA, con frecuencia denominado como ARN inaccesible, es un nucleótido de ARN modificado, en el cual la porción de ribosa está modificada con un puente extra que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. Este puente "bloquea" la ribosa en el endo 3' (Norte) conformación, que con frecuencia se encuentra en los dúplex de forma A. Los nucleótidos de LNA se pueden utilizar
 20 en soluciones de ensayo tanto de ADN como de ARN. En algunos ejemplos, hasta el 50% (*por ejemplo*, 40%, 30%, 20%, o 10%) de los nucleótidos en la solución de ensayo son LNAs. En algunos ejemplos, un oligonucleótido puede comprender 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 LNA.

El oligonucleótido puede estar diseñado con base en la secuencia del biomarcador de ARN para el cual se desea la detección y ser preparado vía métodos convencionales, por
 25 ejemplo, síntesis química o transcripción *in vitro*.

El oligonucleótido, según se describe en la presente, puede estar inmovilizado sobre un miembro de soporte vía un método convencional. En el sentido en que se utiliza en la presente, "inmovilizado" significa sujeto, unido, o fijado, covalentemente o no covalentemente, para evitar la disociación o pérdida del oligonucleótido, aunque no requiere inmovilidad
 30 absoluta con respecto a ya sea el oligonucleótido o el miembro de soporte. Un miembro de soporte puede ser un miembro sólido o semisólido con una superficie que se puede utilizar para sujetar, unir o de otra manera capturar específicamente una solución de ensayo de nucleótidos (*por ejemplo*, el oligonucleótido de la presente descripción), de tal forma que la solución de ensayo de nucleótidos se inmovilice con respecto al miembro de soporte.

35 El miembro de soporte de la presente descripción se puede fabricar a partir de uno o más materiales adecuados, por ejemplo, plásticos o polímeros sintéticos (*por ejemplo*,

polietileno, polipropileno, polistireno, poliamida, poliuretano, polímeros fenólicos, o nitrocelulosa), polímeros derivados naturalmente (*por ejemplo*, goma de látex, polisacáridos, polipéptidos), materiales compuestos, cerámicas, sílice o materiales a base de sílice, carbón, metales o compuestos metálicos (*por ejemplo*, que comprendan oro, plata, acero, aluminio, o cobre), cristales inorgánicos, sílice, y una variedad de otros materiales adecuados. Los ejemplos no limitante de configuraciones potencialmente adecuadas incluyen perlas (*por ejemplo*, perlas magnéticas), tubos (*por ejemplo*, nanotubos), placas, discos, varillas, chips, microchips, cubreobjetos, o lo semejante.

La superficie del miembro de soporte de la presente descripción puede comprender cualquier molécula, otra entidad química/biológica, o una modificación del soporte sólido colocada sobre el soporte sólido que se puede utilizar para sujetar, unir o de otra manera capturar específicamente una molécula de ácido nucleico (*por ejemplo*, un oligonucleótido complementario para un biomarcador de ARN). Las composiciones superficiales que se pueden utilizar para inmovilizar una molécula de ácido nucleico se pueden encontrar fácilmente en la técnica. Por ejemplo, la superficie puede comprender un ácido nucleico complementario o una proteína de unión a ácido nucleico, que puede estar sujeta a la superficie vía métodos convencionales. De esta forma, el ligamiento entre el ácido nucleico que será inmovilizado (*por ejemplo*, el oligonucleótido de la presente descripción) y la superficie puede comprender uno o más químico o físico (*por ejemplo*, sujeción no específica vía fuerzas van der Waals), unión a hidrógeno, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas/hidrofílicas; *etc.*) enlaces y/o ligadores químicos que proporcionan estos enlaces. Alternativamente, la superficie del miembro de soporte puede comprender grupos funcionales reactivos que sean capaces de formar enlaces covalentes con las moléculas de ácido nucleico que serán inmovilizadas. En algunas modalidades, los grupos funcionales son funcionalidades químicas. Es decir, la superficie de unión se puede derivar de tal forma que se presente una funcionalidad química en la superficie de unión, que puede reaccionar con una funcionalidad química sobre el ácido nucleico que será capturado, dando por resultado en la sujeción. Los ejemplos de grupos funcionales para sujeción que pueden ser útiles incluyen, de manera enunciativa, grupos amino, grupos carboxilo, grupos epóxido, grupos maleimida, grupos oxo, y grupos tiol. Los grupos funcionales pueden estar sujetos, ya sea directamente o a través del uso de un ligador, la combinación de los mismos algunas veces se denomina en la presente como un "reticulante." Los reticulantes para unir moléculas de ácido nucleico a un miembro de soporte se conocen en la técnica; por ejemplo, reticulantes homo o hetero-bifuncionales como son bien conocidos (*por ejemplo*, véase 1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on crosslinkers, páginas 155-200, o "Bioconjugate Techniques" de Greg T. Hermanson, Academic Press, 1996). Un ejemplo no limitante de reticulantes incluye grupos

alquilo (entre los que se incluyen grupos alquilo sustituidos y grupos alquilo que contengan porciones heteroatómicas), ésteres, grupos amida, amina, epoxi y etilenglicol y derivados. Un ligador también puede ser un grupo sulfona, que forma una sulfonamida. En algunas modalidades, el grupo funcional es un grupo funcional activado por luz. Es decir, el grupo

5 funcional se puede activar mediante la luz para sujetar el componente de captura a la superficie del objeto de captura. Un ejemplo es la tecnología FotoLink^{MR} disponible de SurModics, Inc. en Eden Prairie, MN.

Se debe entender que los ejemplos proporcionados en la presente sobre el miembro de soporte y la composición superficial no significa que serán limitantes. Cualesquiera

10 miembros de soporte que se conozcan en la técnica que sean adecuados para inmovilización de las moléculas de ácido nucleico se pueden utilizar de acuerdo con los métodos y kits descritos en la presente.

En algunas modalidades, el agente de unión (*por ejemplo*, el oligonucleótido complementario para un biomarcador de ARN) puede estar conjugado con una marca.

15 “Conjugado”, en el sentido en que se utiliza en la presente, significa que la marca está sujeta al agente de unión, covalente o no covalentemente. El agente de marcado puede ser cualquier molécula, partícula, o lo semejante, que facilite la detección, directa o indirectamente, utilizando una técnica para detección adecuada. En el caso de la detección directa, el agente de marcado puede ser una molécula o porción con capacidad para liberar una señal que se

20 pueda consultar y/o detectar directamente (*por ejemplo*, una marca o un tinte fluorescente). En un ejemplo no limitante de detección indirecta, la marca puede ser una molécula o porción con capacidad para convertir un sustrato (*por ejemplo*, una enzima) un producto que tenga la capacidad para liberar una señal detectable. Por ejemplo, la marca puede ser una luciferasa, que convierte la luciferina a oxiluciferina para emitir luces detectables. En otro ejemplo no

25 limitante de detección indirecta, la marca es un ligando de unión a una molécula o porción con capacidad para convertir un sustrato (*por ejemplo*, una enzima), en donde el sustrato convertido libera señales detectables.

En algunas modalidades, la marca es una marca fluorescente. Los ejemplos incluyen, de manera enunciativa, fluoresceína, isotiocianato, rodamina, ficoeritrina, ficocianina,

30 alofocianina, o-ftaldehído, fluorescamina y metales fluorescentes tales como ¹⁵²Eu u otros metales provenientes de la serie de lantánidos, tintes CYE, y proteínas fluorescentes tales como eGFP, eYFP, eCFP, mKate2, mCherry, mPlum, mGrape2, mRaspberry, mGrape1, mStrawberry, mTangerine, mBanana, y mHoneydew.

Otras marcas ilustrativas incluyen, de manera enunciativa, biotina, marcas

35 fosforescentes, marcas quimioluminiscentes o marcas bioluminiscentes (tales como luminal, isoluminol, éster de acridinio teromático, imidazol, sales de acridinio, oxalato éster, y

dioxetano), radio-isótopo (tales como ^3H , ^{125}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{36}Cl , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , y ^{75}Se), metales, quelatos metálicos o cationes metálicos (por ejemplo cationes metálicos tales como $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , ^{111}In , ^{131}I , ^{97}Ru , ^{67}Cu , ^{67}Ga , y ^{68}Ga . Otros ejemplos incluyen cromóforos y enzimas (*por ejemplo*, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, isomerasa delta-V-esteroidea, alcohol con levadura deshidrogenasa, alfa-glicerofosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-VI-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolina esterasa).

En algunas modalidades, el biomarcador se mide utilizando una reacción en cadena de polimerasa. En algunas modalidades, el ARN extraído de la muestra biológica está sujeto a una reacción en cadena de polimerasa. En algunas modalidades, el ADNc correspondiente al ARN de la muestra biológica se utiliza en la reacción en cadena de polimerasa. El ácido nucleico puede ser de doble cadena o de una sola cadena. Se conocen en la técnica diversos métodos que utilizan la reacción en cadena de polimerasa, entre los que se incluyen ARN de transcripción inversa, PCR cuantitativa, y PCR múltiplex.

En general, la reacción en cadena de polimerasa depende del ciclado a través de una serie de pasos entre los que se incluyen fijado y extensión/alargamiento. Un par de oligonucleótidos (*por ejemplo*, cebadores) tiene que ser suficientemente complementario con un ácido nucleico deseado (*por ejemplo*, un biomarcador) si está presente en la muestra de tal forma que el cebador se fije (se hibride) al ácido nucleico deseado, bajo condiciones de fijado adecuadas (*por ejemplo*, la temperatura de fijado). La reacción procede a un paso de extensión/alargamiento en el cual una polimerasa sintetiza una cadena complementaria de ácido nucleico. El producto de ácido nucleico de doble cadena se desnaturaliza y se inicia otro ciclo de reacción.

En algunas modalidades, la reacción en cadena de polimerasa implica diferentes ajustes de temperatura para cada uno de los pasos del ciclo. En algunas modalidades, la reacción en cadena de polimerasa se realiza a una temperatura única (*por ejemplo*, una reacción isotérmica).

Las reacciones en cadena de polimerasa, como se describió anteriormente, permiten la amplificación selectiva de ácidos nucleicos con base en la selección de los cebadores de oligonucleótidos. En algunas modalidades, los ácidos nucleicos correspondientes al conjunto de biomarcadores de ARN se amplifican selectivamente y posteriormente se detectan utilizando cualquier método conocido en la técnica. En algunas modalidades, el producto amplificado se puede detectar utilizando métodos de hibridación. Alternativamente o además, el producto amplificado se puede detectar mediante una o más modificaciones presentadas durante la reacción en cadena de polimerasa. En algunas modalidades, un tinte, fluoróforo u

otro agente indicador se intercala dentro del ácido nucleico durante la reacción en cadena de polimerasa. En algunas modalidades, uno o más de los cebadores de ácido nucleico pueden comprender una marca (*por ejemplo*, una marca de ácido nucleico) que se pueda detectar.

5 En algunas modalidades, un biomarcador de ARN se mide utilizando métodos que implican hibridación, por ejemplo con un oligonucleótido que sea complementario (parcial o completamente) para el biomarcador de ARN. En algunas modalidades, el método de hibridación se realiza sobre la muestra biológica para detectar el biomarcador de ARN o sobre una composición (*por ejemplo*, una reacción PCR) que comprenda un producto amplificado (*por ejemplo*, el biomarcador de ARN amplificado o ADNc correspondiente al biomarcador de ARN).
10 En algunas modalidades, la hibridación implica poner en contacto la muestra con un oligonucleótido (*por ejemplo*, una solución de ensayo) que se una específicamente al biomarcador. Los ejemplos de métodos de hibridación incluyen, sin limitación, transferencia Southern, transferencia Northern, y métodos de micromatrices. Como se describe en la presente, en algunas modalidades, el oligonucleótido puede estar conjugado con una marca
15 para detección y/o inmovilizado sobre un miembro de soporte.

La selección de tampones adecuados, polimerasas, condiciones de hibridación será evidente para alguien con experiencia normal en la técnica y la optimización puede implicar experimentación de rutina.

20 En algunas modalidades, el biomarcador se mide utilizando secuenciación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la abundancia de una secuencia de ácido nucleico particular (*por ejemplo de un biomarcador*) en una muestra se puede comparar con la abundancia de la misma secuencia de ácido nucleico en otra secuencia (*por ejemplo*, una secuenciación completa de transcriptomas, la sec. de ARN). Esta comparación se puede realizar, por ejemplo, al comparar el número de lecturas de una secuencia particular entre las muestras.

25 En general, la secuenciación de ácidos nucleicos se puede realizar utilizando cualquier método conocido en la técnica y la selección de un método adecuado será evidente para alguien con experiencia normal en la técnica. Por ejemplo, el ácido nucleico se puede secuenciar utilizando métodos de secuenciación de Sanger o de secuenciación de alto rendimiento.

30 En algunas modalidades, la muestra biológica está sujeta a un proceso para extracción de ARN para aislar el ARN presente en la muestra (*por ejemplo*, antes de medir el biomarcador). Estos procesos para extracción de ARN son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de procesos para extracción de ARN incluyen kits disponibles comercialmente y extracción con fenol-cloroformo. En algunas modalidades, el ARN extraído de la muestra
35 biológica está sujeto a traducción *in vitro*, produciendo con esto proteínas codificadas por el ARN, incluyendo las proteínas codificadas por un biomarcador de ARN, en su caso. En

algunas modalidades, la muestra biológica o el ARN extraído de la muestra biológica está sujeto a transcripción inversa, produciendo con esto un ADNc correspondiente al ARN, incluyendo los biomarcadores de ARN, en su caso.

5 En algunas modalidades, el biomarcador se mide utilizando inmunoensayo. En algunas modalidades, una muestra biológica se pone en contacto con un agente de unión, tal como una proteína de unión a ácido nucleico, que se une a un biomarcador de ARN. Luego se puede realizar un inmunoensayo para detectar el agente de unión, como una medición indirecta de la cantidad del biomarcador en la muestra. Los ejemplos de inmunoensayos incluyen, sin limitación ensayos de inmunotransferencia (transferencia Western), ensayos 10 inmunoenzimáticos (ELISA) (por ejemplo, ELISA de emparedados), radioinmunoensayos, ensayos de detección basados en electroquimioluminiscencia, inmunoensayos magnéticos, ensayos de flujo lateral, y técnicas relacionadas. Los inmunoensayos adecuados adicionales para detectar un biomarcador proporcionados en la presente, por ejemplo al detectar un agente de unión que se une al biomarcador, serán evidentes para aquellos expertos en la 15 técnica. Será evidente para aquellos expertos en la técnica que esta descripción no se limita a inmunoensayos, sin embargo, y esos ensayos de detección que dependen de un sustrato cromogénico también pueden ser útiles para la detección y/o cuantificación de los biomarcadores del sistema por contacto como se proporciona en la presente.

Los ELISA se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Crowther, John R (2009). 20 "The ELISA Guidebook." 2ª ed. Humana Press and Lequin R (2005). "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clin. Chem.* 51 (12): 2415–8) y los ELISA ilustrativos se describen en la presente. Los kits para realizar los ELISA también se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, kits para ELISA de Life Technologies and BD Biosciences).

25 Los inmunoensayos descritos en la presente pueden estar en el formato de un ELISA de emparedado, en el cual un primer agente de unión que se une específicamente a un agente de unión (*por ejemplo*, una proteína de unión a ácido nucleico que se une al biomarcador de ARN) se inmoviliza en un miembro de soporte. El miembro de soporte entonces, se puede incubar con una muestra biológica, como se describe en la presente 30 durante un periodo de tiempo adecuado bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el agente de unión y el biomarcador en la muestra. Este complejo entonces se puede detectar utilizando un agente para detección que se une al biomarcador, el complejo de agentes de unión-biomarcadores, o el agente de unión. El agente para detección puede estar conjugado a una marca, como se describe en la presente, que puede liberar una señal directa 35 o indirectamente. La intensidad de la señal representa el nivel del biomarcador de ARN en la muestra. En algunas modalidades, se detecta el agente para detección y su nivel representa el

nivel del biomarcador de ARN en la muestra.

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

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

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

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

Los ensayos, por ejemplo, los ensayos de transferencia Southern o Western, pueden implicar además el uso de un sistema cuantitativo para formación de imágenes, por ejemplo,
 35 la tecnología para formación de imágenes LICOR, que está disponible comercialmente (véase, por ejemplo, el sistema para formación de imágenes infrarrojas Odyssey® CLx de LI-COR

Biosciences). En algunas modalidades, se utiliza un ensayo para detección por electroquimioluminiscencia o un ensayo que depende de una combinación de tecnología de arreglo de electroquimioluminiscencia y por patrones (por ejemplo, un ensayo de tecnología ECL o MULTI-ARRAY de Meso Scale Discovery (MSD)).

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

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

(ii) Aplicaciones para el diagnóstico y/o pronóstico

Los niveles de ARN presentados en la Tabla 1 detectados en las muestras provenientes de sujetos se pueden utilizar como biomarcadores confiables para diagnosticar
15 enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, el HAE), monitorear el progreso de esta enfermedad, evaluar la eficacia de un tratamiento para la enfermedad, identificar los pacientes adecuados para un tratamiento particular, y/o predecir un ataque de la enfermedad en un sujeto.

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

En algunas modalidades, el nivel del biomarcador luego se puede comparar con una muestra de referencia o una muestra control para determinar un valor que indica la cantidad
30 del ARN en la muestra. En algunas modalidades, un valor para un biomarcador se obtiene al comparar el nivel del ARN en una muestra con el nivel de otro ARN (por ejemplo, un control interno o un estándar interno) en la muestra. Este valor del biomarcador puede ser un valor normalizado con respecto al control interno o el estándar interno. El valor del biomarcador se puede comparar con un valor de referencia para determinar si el sujeto tiene o está en riesgo
35 de una enfermedad asociada con el sistema por contacto. El valor de referencia puede representar el nivel del biomarcador correspondiente en los sujetos (por ejemplo, sujetos

humanos) libres de la enfermedad blanco. En algunas modalidades, si el nivel o valor del biomarcador es mayor que un nivel o valor de referencia, se puede identificar que el sujeto tiene o está en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto. En algunas modalidades, si el nivel o valor del biomarcador es menor que un nivel o valor de referencia, se puede identificar que el sujeto tiene o está en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto.

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

En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye más de uno de los biomarcadores de ARN que están presentes diferencialmente (elevados y/o reducidos) en un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener la enfermedad con relación a sujetos sanos. En algunos ejemplos, el conjunto de biomarcadores incluye al menos un biomarcador de ARN único que tiene un nivel elevado en un sujeto que tenga o esté en riesgo de tener la enfermedad y al menos un biomarcador de ARN único que tenga un nivel reducido en el sujeto que tenga o esté en riesgo de tener la enfermedad. En la Tabla 1 se listan los ejemplos de biomarcadores de ARN “elevados” y “reducidos”. En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye más de un ARN, para cada uno de los cuales un nivel elevado indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener la enfermedad. En algunas modalidades, el conjunto de biomarcadores incluye más de un ARN, para cada uno de los cuales un nivel reducido indica que el sujeto tiene o está en riesgo de tener la enfermedad.

En algunas modalidades, la muestra control o la muestra de referencia es una muestra biológica obtenida de un individuo sano. En algunas modalidades, la muestra control o la muestra de referencia contiene una cantidad conocida del ARN que se evaluará. En algunas modalidades, la muestra control o la muestra de referencia es una muestra biológica obtenida de un sujeto control.

En el sentido como se utiliza en la presente, un sujeto control puede ser un sujeto sano o individuo sano, es decir, un individuo que aparentemente esté libre de la enfermedad blanco (por ejemplo, una enfermedad asociada con el sistema por contacto) en el momento en el que se mide el nivel de los ARN o que no tenga historial de la enfermedad. El término “sujeto control” abarca un sujeto individual o grupo de sujetos que tengan características similares, por ejemplo, un grupo de sujetos sanos que tengan ciertas características que coincidan con aquellas del sujeto candidato, *por ejemplo*, edad, género, grupo étnico, etc. En algunas

modalidades, el nivel de un biomarcador en un sujeto control se utiliza para establecer un valor de referencia (*por ejemplo*, el nivel promedio del biomarcador en un sujeto control, que incluye un grupo de sujetos) que se puede comparar con el nivel del biomarcador en un sujeto candidato o de prueba.

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

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

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

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

En el sentido como se utiliza en la presente, “un nivel elevado” o “un nivel por encima

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

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

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

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

Los métodos de ensayo y kits descritos en la presente también se pueden aplicar para la evaluación de la eficacia de un tratamiento para una enfermedad asociada con el sistema por contacto, tal como aquellos descritos en la presente, dada la correlación entre el nivel de

los biomarcadores y estas enfermedades. Por ejemplo, se pueden recolectar múltiples muestras biológicas (por ejemplo, muestras de sangre o plasma) provenientes de un sujeto a quien se le realice un tratamiento ya sea antes y después del tratamiento o durante el curso del tratamiento. Los niveles del biomarcador se pueden medir mediante cualquiera de los métodos de ensayo como se describe en la presente y los valores (por ejemplo, cantidades) del biomarcador se pueden determinar por consiguiente. Por ejemplo, si un nivel elevado de un biomarcador indica que un sujeto tiene una enfermedad blanco y el nivel del biomarcador disminuye después del tratamiento o durante el curso del tratamiento (el nivel del biomarcador en una muestra recolectada posterior en comparación con el de una muestra recolectada anterior), indica que el tratamiento es efectivo. Como otro ejemplo, si un nivel reducido de un biomarcador indica que un sujeto tiene una enfermedad blanco y el nivel de biomarcadores aumenta después del tratamiento o durante el curso del tratamiento (el nivel del biomarcador en una muestra recolectada posterior en comparación con el de una muestra recolectada anterior), indica que el tratamiento es efectivo. En algunos ejemplos, el tratamiento implica una cantidad efectiva de un agente terapéutico, tal como un inhibidor de calicreína en plasma, un antagonista del receptor de bradiquinina B2, o un inhibidor de la esterasa C1 (C1-INH). Los ejemplos de los agentes terapéuticos incluyen, de manera enunciativa, lanadelumab, escalatida, icatibant, y C1-INH derivado de plasma humano.

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

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

un péptido inhibidor (por ejemplo, lanadelumab, escalatida, etc.), un inhibidor del receptor de bradiquinina 2 (por ejemplo, icatibant); y/o un C1-INH (por ejemplo, el C1-INH derivado de plasma humano).

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

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

En algunas modalidades, los métodos implican comparar el nivel de un
30 biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tenga HAE al nivel del biomarcador en una muestra de control o de referencia. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador en la muestra de control o de referencia representa el nivel del biomarcador que indica un estado de ataque por HAE. Por ejemplo, un nivel del biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tenga HAE que es similar al nivel del biomarcador en una referencia que representa
35 un estado de ataque por HAE, puede indicar que el sujeto está en riesgo de tener un ataque por HAE. En algunas modalidades, el nivel del biomarcador en la muestra de control o de

referencia representa el nivel del biomarcador que indica el HAE en el estado basal. Por ejemplo, un nivel del biomarcador en una muestra obtenida de un sujeto que tenga HAE que se desvía (es elevado o reducido) al nivel del biomarcador en una referencia que representa un HAE en el estado basal, puede indicar que el sujeto está en riesgo de tener un ataque por HAE.

(iii) Aplicaciones no clínicas

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

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

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

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

En algunas modalidades, el agente de unión es un oligonucleótido, como se describe

en la presente, que es complementario para un biomarcador de ARN. En algunas modalidades, el agente de unión comprende un par de oligonucleótidos (*por ejemplo*, un par cebador) cada uno de los mismos se une (se hibrida) a una secuencia de nucleótidos específica en el biomarcador de ARN. En algunas modalidades, el par de oligonucleótidos se hibrida al biomarcador de ARN y permiten la amplificación del biomarcador de ARN, cuando se somete a métodos tales como reacción en cadena de polimerasa. En algunas modalidades, el producto amplificado se puede detectar directamente, por ejemplo mediante la detección de un tinte, fluoróforo u otro agente indicador que se intercale dentro del ácido nucleico durante la reacción en cadena de polimerasa. En algunas modalidades, al menos uno de los oligonucleótidos se conjuga con una marca, que se pueda detectar.

En algunas modalidades, el biomarcador de ARN se mide utilizando un método para hibridación de ácidos nucleicos. En algunas modalidades, el agente de unión es un oligonucleótido que sea complementario para un biomarcador de ARN y se hibrida al biomarcador de ARN, en su caso en una muestra (*por ejemplo*, una muestra biológica o una muestra proveniente de la reacción en cadena de polimerasa). En algunas modalidades, el oligonucleótido está conjugado con una marca, tal como cualesquiera de las marcas descritas en la presente, que se puedan detectar. Los ejemplos no limitantes de los métodos de hibridación, como se describe en la presente, incluyen transferencia Northern, transferencia Southern, y microensayos.

En algunas modalidades, uno o más de los agentes de unión es una proteína de unión a ácido nucleico que se une específicamente a un ARN del conjunto de biomarcadores. En algunas modalidades, el agente de unión está detectado directamente o puede estar conjugado a una marca que se puede identificar y, directa o indirectamente. En algunas modalidades, el kit o dispositivo incluye además un miembro de soporte, como se describe en la presente. En el kit o el dispositivo para detección, uno o más de los agentes de unión se pueden inmovilizar sobre un miembro de soporte, por ejemplo, una membrana, una perla, un portaobjetos, o una placa de múltiples pocillos. La selección de un miembro de soporte adecuado para el inmunoensayo dependerá de diversos factores tales como el número de muestras y método para detectar la señal liberada de la marca conjugada con el segundo agente.

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

En algunas modalidades, el kit puede comprender las instrucciones para utilizarse de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en la presente. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de la forma en que se deben utilizar los componentes

contenidos en el kit para medir el nivel de ARNs de un conjunto de biomarcadores de ARN en una muestra biológica recolectada de un sujeto, tal como un paciente humano.

Las instrucciones relacionadas con el uso del kit en general incluyen la información sobre la cantidad de cada componente y las condiciones adecuadas para realizar los métodos de ensayo descritos en la presente. Los componentes en el kit pueden estar en dosis unitarias, empaques a granel (por ejemplo, empaquetes de dosis múltiples), o dosis sub-unitarias. Las instrucciones suministradas en los kits de la presente descripción típicamente son instrucciones escritas en una etiqueta o un inserto del empaque (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), aunque también son aceptables instrucciones legibles en máquina (por ejemplo, las instrucciones portadas en un disco de almacenamiento magnético u óptico).

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

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

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

Tratamiento de enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto

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

resultado del método descrito, por ejemplo, medir el nivel de un conjunto de biomarcadores.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente proporcionan métodos para identificar a un sujeto como un candidato para un tratamiento preventivo (profiláctico). En el sentido en que se utiliza en la presente, un tratamiento “preventivo” incluye cualquier terapia o régimen de tratamiento que se dirija a evitar o reducir la incidencia de una enfermedad (*por ejemplo*, un ataque por HAE). En algunas modalidades, los métodos además comprenden administrar un tratamiento preventivo al sujeto. Cualesquiera de los agentes terapéuticos descritos en la presente (*por ejemplo*, inhibidores de pKal, tales como lanadelumab). En algunas modalidades, el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN en una muestra obtenida de un sujeto indica que el paciente tiene o está en riesgo de tener HAE (*por ejemplo*, al comparar el nivel del biomarcador de ARN con el nivel en una muestra de referencia o de control). A cualquier sujeto que tenga o en riesgo de tener HAE se le puede administrar un tratamiento profiláctico. La selección de un agente terapéutico adecuado y el régimen de administración para un tratamiento preventivo serán evidente para alguien con experiencia normal en la técnica.

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

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

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

corto de tiempo entre las inyecciones, tal como durante la misma sesión de tratamiento). El primer agente y la otra terapia también se pueden administrar a intervalos temporales mayores.

Agentes terapéuticos

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

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

Se conoce la estructura 3D (a alta resolución) del dominio de Kunitz de BPTI. Una de las estructuras por rayos X se deposita en el Brookhaven Protein Data Bank como “6PTI”. Se
35 conoce la estructura 3D de algunos homólogos de BPTI (Eigenbrot et al., *Protein Engineering* (1990) 3(7):591-598; Hynes et al., *Biochemistry* (1990) 29:10018-10022). Se conocen al

menos ochenta y una secuencias de dominio de Kunitz. Los homólogos humanos conocidos incluyen tres dominios de Kunitz de LACI también conocido como el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (Wun et al., *J. Biol. Chem.* (1988) 263(13):6001-6004; Girard et al., *Nature* (1989) 338:518-20; Novotny et al., *J. Biol. Chem.* (1989) 264(31):18832-18837) dos dominios de Kunitz del inhibidor de inter- α -tripsina, APP-I (Kido et al. *J. Biol. Chem.* (1988) 263(34):18104-18107), un dominio de Kunitz proveniente de colágeno, tres dominios de Kunitz de TFPI-2 (Sprecher et al., *PNAS USA* (1994) 91:3353-3357), los dominios de Kunitz del tipo 1 del inhibidor activador del factor de crecimiento de hepatocitos, los dominios de Kunitz del tipo 2 del inhibidor activador del factor de crecimiento de hepatocitos, los dominios de Kunitz descritos en la publicación de Patente de los Estados Unidos No.: 2004-0152633. LACI es una fosfoglucoproteína sérica humana con un peso molecular de 39 kDa (secuencia de aminoácidos en la Tabla 2) que contiene tres dominios de Kunitz.

Tabla 2: Dominios de Kunitz naturales ilustrativos

15	LACI	1 MIYTMKKVHA LWASVCLLLN LAPAPLN
	(SEC ID	51 HSFCFAKADD GPCKAIMKRF FFNIFTRQCE EFIYGGCEGN QNRFESLEEC
	NO: 1)	101 KKMCTRDnan riikttlqge <u>kpdfCfled</u> <u>pgiCrgyitr yfynnqtkaC</u>
		151 <u>erfkyggClg nmnnfetlee CkniCedgpn gfqvdnygtq Inavnnsltp</u>
		201 qstkvpstlfe fhgpswCltp adrglCrane nrfyynsvig kCrpfkysgC
20		251 ggnennftsk qeClraCkkg fiqriskggl iktkrkrkkq rvkiayeeif
		301 vknm
		La secuencia de señal (1-28) está en mayúsculas y subrayadas
		LACI-K1 (50-107) está en mayúsculas
25		LACI-K2 (121-178) están subrayadas
		LACI-K3 (211-270) están en negrillas
	BPTI	1 2 3 4 5
	(SEC ID	1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678
	NO:2)	<u>RPDFC</u><u>LEPPYTGP</u><u>C</u>KARIIRYFYNAKAGL<u>C</u>QTFVYGG<u>C</u>RAKRNNFKSAED<u>C</u>M
30		<u>RT</u><u>C</u>GGA

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

uno de los tres dominios de Kunitz se alteraron. LACI-K1 inhibe el factor VIIa (F.VIIa) cuando F.VIIa se compleja con el factor tisular y LACI-K2 inhibe el factor Xa.

Las proteínas que contienen dominios de Kunitz ilustrativas incluyen las siguientes, con los números de acceso SWISS-PROT entre paréntesis:

5 **A4_HUMAN (P05067), A4_MACFA (P53601), A4_MACMU (P29216),**
 A4_MOUSE (P12023), A4_RAT (P08592), A4_SAISC (Q95241),
 AMBP_PLEPL (P36992), APP2_HUMAN (Q06481), APP2_RAT (P15943),
 AXP1_ANTAF (P81547), AXP2_ANTAF (P81548), BPT1_BOVIN (P00974),
 BPT2_BOVIN (P04815), CA17_HUMAN (Q02388), CA36_CHICK (P15989),
 10 **CA36_HUMAN (P12111), CRPT_BOOMI (P81162), ELAC_MACEU (O62845),**
 ELAC_TRIVU (Q29143), EPPI_HUMAN (O95925), EPPI_MOUSE (Q9DA01),
 HTIB_MANSE (P26227), IBP_CARCR (P00993), IBPC_BOVIN (P00976),
 IBPI_TACTR (P16044), IBPS_BOVIN (P00975), ICS3_BOMMO (P07481),
 IMAP_DROFU (P11424), IP52_ANESU (P10280), ISC1_BOMMO (P10831),
 15 **ISC2_BOMMO (P10832), ISH1_STOHE (P31713), ISH2_STOHE (P81129),**
 ISIK_HELPO (P00994), ISP2_GALME (P81906), IVB1_BUNFA (P25660),
 IVB1_BUNMU (P00987), IVB1_VIPAA (P00991), IVB2_BUNMU (P00989),
 IVB2_DABRU (P00990), IVB2_HEMHA (P00985), IVB2_NAJNI (P00986),
 IVB3_VIPAA (P00992), IVBB_DENPO (P00983), IVBC_NAJNA (P19859),
 20 **IVBC_OPHHA (P82966), IVBE_DENPO (P00984), IVBI_DENAN (P00980),**
 IVBI_DENPO (P00979), IVBK_DENAN (P00982), IVBK_DENPO (P00981),
 IVBT_ERIMA (P24541), IVBT_NAJNA (P20229), MCPI_MELCP (P82968),
 SBPI_SARBU (P26228), SPT3_HUMAN (P49223), TKD1_BOVIN (Q28201),
 TKD1_SHEEP (Q29428), TXCA_DENAN (P81658), UPTI_PIG (Q29100),
 25 **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),
 30 **TFPI_HUMAN (P10646), TFPI_MACMU (Q28864), TFPI_MOUSE (O54819),**
 TFPI_RABIT (P19761), TFPI_RAT (Q02445), YN81_CAEEL (Q03610)

Se pueden utilizar una variedad de métodos para identificar un dominio de Kunitz a partir de una base de datos de secuencia. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos conocida de un dominio de Kunitz, una secuencia consensual, o un motivo (por ejemplo, el Motivo ProSite) se puede investigar contra las bases de datos de las secuencias GenBank

(National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda MD) , por ejemplo, utilizando BLAST; contra la base de datos Pfam de HMM (Hidden Markov Models) (por ejemplo, utilizando los parámetros por predeterminados para una búsqueda Pfam; contra la base de datos SMART;. o en contra la base de datos ProDom. Por ejemplo, el

5 Número de acceso de Pfam PF00014 de Pfam Liberada 9 proporciona muchos dominios de Kunitz y un HMM para identificar los dominios de Kunitz. Una descripción de la base de datos Pfam se puede encontrar en Sonhammer et al. *Proteins* (1997) 28(3):405-420 y una descripción detallada de los HMM se puede encontrar, por ejemplo, en Gribskov et al. *Meth. Enzymol.* (1990) 183:146-159; Gribskov et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84:4355-4358;

10 Krogh et al. *J. Mol. Biol.* (1994) 235:1501-1531; and Stultz et al. *Protein Sci.* (1993) 2:305-314. La base de datos SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, EMBL, Heidelberg, DE) de los HMM como se describe en Schultz et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) 95:5857 y Schultz et al. *Nucl. Acids Res* (2000) 28:231. La base de datos SMART contiene los dominios identificados mediante la perfilación con los modelos Markov escondidos del

15 programa de búsqueda HMMer2 (R. Durbin et al. (1998) *Biological sequence analysis: probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press). La base de datos también se anota y monitorea. La base de datos de dominios proteicos ProDom consiste de una compilación automática de dominios homólogos (Corpet et al. *Nucl. Acids Res.* (1999) 27:263-267). Las versiones actuales de ProDom se integran utilizando investigaciones PSI-

20 BLAST recursivas (Altschul et al. *Nucleic Acids Res.* (1997) 25:3389-3402; Gouzy et al. *Computers and Chemistry* (1999) 23:333-340.) de las bases de datos de proteínas SWISS-PROT 38 y TREMBL. La base de datos genera automáticamente una secuencia consensual para cada dominio. PROSITE lista el dominio de Kunitz como un motivo e identifica las proteínas que incluyen un dominio de Kunitz. Véase, por ejemplo, Falquet et al. *Nucleic Acids*

25 *Res.* (2002) 30:235-238.

Los dominios de Kunitz interactúan con una proteasa blanco utilizada, principalmente, aminoácidos de dos regiones de asa ("asas de unión"). La primera región de asa está entre aproximadamente los residuos correspondientes a los aminoácidos 13-20 de BPTI. La segunda región de asa es de aproximadamente los residuos correspondientes a los

30 aminoácidos 31-39 de BPTI. Una biblioteca ilustrativa de los dominios de Kunitz varían de una o más posiciones de aminoácidos en la primera y/o la segunda regiones de asa. Las posiciones particularmente útiles pueden variar, cuando se seleccionan para los dominios de Kunitz con el que interactúan con calicreína o cuando se seleccionan para variantes mejoradas de afinidad, incluyen: las posiciones 13, 15, 16, 17, 18, 19, 31, 32, 34, y 39 con

35 respecto a la secuencia de BPTI. Se espera que al menos algunas de estas posiciones estén en contacto cercano con la proteasa blanco. También es útil variar otras posiciones, por

ejemplo, las posiciones que estén adyacentes a las posiciones mencionadas anteriormente en la estructura tridimensional.

La “región de cadena principal” de un dominio de Kunitz se define como aquellos residuos que forman parte de un dominio de Kunitz, aunque excluyendo específicamente los
 5 residuos en la primera y segunda regiones de asas de unión, es decir, aproximadamente los residuos correspondiente a los aminoácidos 13-20 de BPTI y 31-39 de BPTI. Inversamente, los residuos que no están en el asa de unión pueden tolerar una gama más amplia de sustitución de aminoácidos (por ejemplo, sustituciones, conservadoras y/o no conservadoras).

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

En algunos aspectos, el inhibidor de calicreína en plasma se une a la forma activa de
 20 la calicreína en plasma. En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína en plasma, se une e inhibe la calicreína en plasma, por ejemplo, la calicreína en plasma humana y/o la calicreína murina. Los agentes de calicreína en plasma polipeptídica ilustrativos se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5,795,865, la patente de Estados Unidos No. 5,994, 125, la
 25 patente de Estados Unidos No. 6,057,287, la patente de Estados Unidos No. 6.333.402, la patente de Estados Unidos No. 7,628,983, y la patente de Estados Unidos No. 8,283,321, la patente de Estados Unidos No. 7,064, 107, la patente de Estados Unidos No. 7,276,480, la patente de Estados Unidos No. 7,851,442, la patente de Estados Unidos No. 8,124,586, la patente de Estados Unidos No. 7,811,991, y la Publicación de los Estados Unidos No.
 30 20110086801, los contenidos totales de las mismas se incorporan en la presente como referencia. En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína en plasma es un polipéptido o péptido inhibidor. En algunas modalidades, el péptido inhibidor es escalatida (también denominada como DX-88 o KALBITOR®; SEC ID NO: 3). En algunas modalidades, el inhibidor de calicreína comprende o consiste de una secuencia de aproximadamente 58 aminoácido de
 35 los aminoácidos 3-60 de la SEC ID NO: 3 o el polipéptido DX-88 que tiene la secuencia de 60 aminoácido de la SEC ID NO: 3.

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

El inhibidor de calicreína en plasma puede ser los anticuerpos de longitud total (por
ejemplo, un IgG (por ejemplo, un IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA (por ejemplo, IgA1, IgA2),
IgD, e IgE) o pueden incluir sólo un fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, un fragmento
Fab, F(ab')₂ o scFv). La proteína de unión puede incluir dos inmunoglobulinas de cadena
pesada y dos inmunoglobulinas de cadena ligera, o puede ser un anticuerpo de una sola
cadena. El inhibidor de calicreína en plasma puede ser proteínas recombinantes, tales como
los anticuerpos humanizados, CDR injertados, quiméricos, desimmunizados, o generados *in*
vitro, y puede incluir opcionalmente las regiones constantes derivadas de las secuencias de
inmunoglobulina de línea germinal humana. En una modalidad, el inhibidor de calicreína en
plasma es un anticuerpo monoclonal.

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

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

Secuencia de la región variable de cadena pesada Lanadelumab (SEC ID NO: 4)
EVQLLES GGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS HYIMMWVRQA PGKGLEWVSG

IYSSGGITVY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAYRR IGVPRRDEFD
IWGQGTMVTV SS

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

5 DIQMTQSPS TLSASVGDRV TITCRASQSI SSWLAWYQQK PGKAPKLLIY
KASTLESGVP SRFSGSGSGT EFTLTSSLQ PDDFATYYCQ QYNTYWTFGQ GTKVEI

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

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

Inhibidores del receptor de bradiquinina B2

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

Agentes para reemplazo de C1-INH

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

35 Sin elaboración adicional, se cree que un experto en la técnica puede, con base en la descripción anterior, utilizar la presente descripción a su grado total. Las siguientes

modalidades específicas por lo tanto se deben interpretar simplemente como ilustrativas, y no limitativas del resto de la descripción de ninguna forma. Todas las publicaciones citadas en la presente se incorporan como referencia para los fines de la materia expuesta a la que se hace referencia en la presente.

5

EJEMPLOS

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

Para investigar los biomarcadores de ARN novedosos del angioedema hereditario, se realizó un análisis al comparar los ARN pequeños en circulación presentes en muestras de plasma obtenidas de pacientes con el HAE con muestras obtenidas de individuos sanos. Se recolectó plasma tratado con citrato en circulación proveniente de individuos sanos (n=3) y pacientes que tengan HAE durante la enfermedad en calma ("basal," N=19) y durante un ataque edematoso ("ataque," N=20). El ARN se extrajo de las muestras de plasma. Los fragmentos de biblioteca de 128-158 nucleótidos fueron las secuencias que utilizan un sistema de secuenciación hiSeq 2500 (Illumina). Las lecturas se desmultiplexaron, las secuencias adaptadoras se retiraron y se crearon secuencias únicas con >5 lecturas. Utilizando Bowtie2, una herramienta para alineación de secuencias (bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/manual.shtml), se alinearon secuencias no redundantes con un genoma de referencia (hg19), y las secuencias con apareamiento perfecto y las alineaciones mal apareadas de 1 nucleótido se alinearon adicionalmente con las bases de datos de ADNc, ARN no codificante, miARN y piARN. Los datos de las sec. de ARN identificaron 1,811 transcripciones detectables de ARN humano y 457 microARNs humanos (≥ 10 lecturas en el $\geq 25\%$ de las muestras). Las abundancias de cada uno de los ARN detectados se compararon entre las muestras provenientes de individuos sanos y pacientes que tengan HAE. Se encontró que las transcripciones de ARN que codifican para ciertas proteínas mitocondriales estarán significativamente elevadas en muestras provenientes de pacientes con HAE en comparación con muestras provenientes de individuos sanos (Figura 1). Adicionalmente, los análisis de la sec. de ARN identificaron 24 microARNs que se expresaron diferencialmente en muestras provenientes de pacientes con HAE en comparación con muestras provenientes de individuos sanos. Las transcripciones de ARN y microARNs identificadas se validaron utilizando RT-qPCR sobre muestras independientes obtenidas de individuos sanos (N=20), pacientes que tengan HAE durante la enfermedad en calma (N=34) y durante un ataque edematoso (N=18).

Como se muestra en la Figura 1, las transcripciones de ARN de transcripciones mitocondria-codificadas para la Subunidad 3 con Núcleo de NADH:Ubiquinona Oxidorreductasa Codificada Mitocondrial (MT-ND3) y una Citocromo C Oxidasa III Codificada

35

Mitocondrial fueron mayores en muestras provenientes de pacientes que tengan HAE (durante un ataque o en calma) en comparación con muestras provenientes de individuos sanos en la sec. de ARN inicial así como mediante análisis de RT-qPCR. Estos resultados indican que estos ARN se pueden utilizar como biomarcadores para distinguir entre las muestras
5 provenientes de pacientes con HAE provenientes de individuos sanos.

Como se muestra en la Figura 2, paneles A y B, se encontró que diversos microARN estarán presentes diferencialmente en muestras obtenidas de pacientes con HAE e individuos sanos. Por ejemplo, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, y hsa-miR-485-5p estuvieron elevados en muestras provenientes de pacientes con HAE. También se
10 encontraron diversos microARN a niveles reducidos en muestras provenientes de pacientes con HAE, incluyendo hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-17-5p, y hsa-miR-885-5p. Por último, el análisis también identificó diversos microARN que estuvieron reducidos en muestras provenientes de pacientes con HAE durante un ataque en comparación con un estado basal, por ejemplo, has-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, y hsa-miR-485-5p
15 (Figura 2, panel C).

Cualesquiera de los ARN identificados en la presente (*por ejemplo*, los ARN que tengan un cambio de plegado significativo entre pacientes con HAE e individuos sanos), se puede utilizar como un biomarcador (individualmente o en combinación (conjunto de biomarcadores)) para enfermedades asociadas con el sistema de activación por contacto, por
20 ejemplo en los métodos para identificar a pacientes que estén en riesgo de una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto (por ejemplo, HAE), seleccionar un candidato para tratamiento, monitorear el progreso de la enfermedad o el estado de la enfermedad, evaluar la eficacia de un tratamiento contra la enfermedad, determinar un curso de tratamiento, identificar si una enfermedad o trastorno está asociado con el sistema de
25 activación por contacto, y/o para fines de investigación, incluyendo, por ejemplo, estudiar el mecanismo de una enfermedad, que puede depender del desarrollo de terapias novedosas.

OTRAS MODALIDADES

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

A partir de la descripción anterior, un experto en la técnica puede determinar
35 fácilmente las características esenciales de la presente descripción, y sin apartarse del espíritu y alcance de la misma, puede realizar diversos cambios y modificaciones de la presente

descripción para adaptarla a diversos usos y condiciones. De esta forma, también quedan dentro de las reivindicaciones otras modalidades.

EQUIVALENTES Y ALCANCE

5 Aquellos expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar utilizando no más de una experimentación de rutina, muchos equivalentes a las modalidades específicas de la presente descripción descrita en la presente. El alcance de la presente descripción no pretende estar limitado a la descripción anterior, sino que en su lugar es como se establece en las reivindicaciones anexas.

10 En las reivindicaciones los artículos tales como “uno”, “un” y “el” pueden significar uno o más de uno a menos que se indique lo contrario o de otra manera sea evidente a partir del contexto. Las reivindicaciones o descripciones que incluyan “o” entre uno o más miembros de un grupo se considerará que se satisfacen si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otra manera son relevantes para un producto o proceso determinado a menos que se indique lo contrario o sea evidente de otra manera a
15 partir del contexto. La presente descripción incluye modalidades en las cuales exactamente un miembro del grupo está presente en, se emplea en, o de otra manera es relevante para un producto o proceso determinado. La presente descripción incluye modalidades en las cuales más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes en, se emplean en, o de otra manera son relevantes para un producto o proceso determinado.

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

experiencia normal en la técnica, los valores que se expresen como variaciones pueden asumir cualquier valor específico o sub-variación dentro de las variaciones establecidas en las diferentes modalidades de la presente descripción, al décimo de la unidad del límite inferior de la variación, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

5 La solicitud se refiere a diversas patentes expedidas, solicitudes de patente publicadas, artículos periodísticos, y otras publicaciones, todas se incorporan en la presente como referencia. Si existiera un conflicto en cualquiera de las referencias incorporadas y la especificación actual, prevalecerá la especificación. Además, cualquier modalidad particular de la presente descripción que quede dentro de la técnica anterior se puede excluir
10 explícitamente de cualquiera de una o más de las reivindicaciones.

Debido a que se considera que estas modalidades serán conocidas por alguien con experiencia normal en la técnica, las mismas se pueden excluir incluso si la exclusión no se estableciera explícitamente en la presente. Cualquier modalidad particular de la presente descripción se puede excluir de cualquier reivindicación, por cualquier razón, ya sea que esté
15 o no relacionada con la existencia de la técnica anterior.

Aquellos expertos en la técnica reconocerán o serán capaces de determinar utilizando no más de una experimentación de rutina cualesquiera equivalentes a las modalidades específicas descritas en la presente. El alcance de las modalidades de la presente descritas en la presente no pretende ser limitado por la descripción anterior, aunque en su lugar es
20 como se establece en las reivindicaciones anexas. Aquellos con experiencia normal en la técnica apreciarán que se pueden realizar diversos cambios y modificaciones a esta descripción sin apartarse del espíritu o alcance de la presente descripción, como se define en las siguientes reivindicaciones.

25

NOVEDAD DE LA INVENCION

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

REIVINDICACIONES:

- 5 1. Un método para analizar una muestra, caracterizado porque comprende:
 - (i) proporcionar una muestra biológica obtenida de un sujeto que tenga, se sospeche de tener, o esté en riesgo de tener una enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto; y
 - (ii) medir el nivel de un conjunto de biomarcadores de ARN, que comprende al menos
10 un biomarcador de ARN único seleccionado de la Tabla 1, en donde si el conjunto de biomarcadores de ARN consiste de un biomarcador de ARN único, el biomarcador no es hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, o hsa-miR-20a-5p.
2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el conjunto de biomarcadores consiste de 2-10 biomarcadores de ARN.
- 15 3. El método de conformidad con la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la muestra biológica es una muestra de suero o una muestras de plasma.
4. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado porque la enfermedad asociada con el sistema de activación por contacto es angioedema hereditario (HAE).
- 20 5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado porque el HAE es HAE tipo I o HAE tipo II.
6. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el biomarcador de ARN es un ARN mensajero que codifica para una proteína mitocondrial, que es la citocromo C oxidasa III codificada mitocondrialmente (MT-
25 CO3) o la subunidad 3 con núcleo de NADH:ubiquinona oxidorreductasa codificada mitocondrialmente (MT-ND3).
7. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque el biomarcador de ARN es un microARN.
8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque el
30 microARN se selecciona del grupo que consiste de hsa-miR-16-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-26a-5p, hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-26b-5p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-889-3p, hsa-miR-941, RPL23, hsa-miR-328-3p, y hsa-miR-484 .
- 35 9. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el paso (ii) implica una reacción en cadena de polimerasa y/o hibridación

de ácido nucleico.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque el sujeto es un paciente humano.

5 11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado además porque comprende identificar al sujeto que tenga la enfermedad asociada con el sistema por contacto, si el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN del sujeto se desvía del nivel del mismo conjunto de biomarcadores de ARN de un sujeto control.

10 12. El método de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un agente terapéutico para tratar la enfermedad, si se identifica que el sujeto tiene la enfermedad.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el agente terapéutico es un inhibidor de calicreína en plasma (pKal), un inhibidor del receptor de bradiquinina 2 (B2R), y/o un inhibidor de C1 esterasa.

15 14. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el inhibidor de pKal es un anticuerpo anti-pKal o un péptido inhibidor.

15. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque el agente terapéutico es lanadelumab, ecalantida, icatibant, o un inhibidor de C1 esterasa derivado de plasma humano.

20 16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado porque el sujeto es un paciente humano quien esté en un tratamiento para la enfermedad, y en donde el método comprende además evaluar la eficacia del tratamiento con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN, una desviación del nivel del conjunto de biomarcadores de ARN del sujeto de aquel de un sujeto control que será indicativo de la eficacia del tratamiento.

25 17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado además porque comprende identificar un tratamiento adecuado para el sujeto con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN.

30 18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado además porque comprende identificar al sujeto como un candidato para un tratamiento de la enfermedad con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque el paciente humano tiene un historial de la enfermedad.

20. El método de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque la enfermedad es HAE.

35 21. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque el conjunto de biomarcadores de ARN comprende uno o más biomarcadores de ARN

seleccionados del grupo que consiste de hsa-miR-1307-3p, hsa-miR-335-3p, y hsa-miR-485-5p.

5 22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 19-21, caracterizado además porque comprende evaluar el riesgo de un ataque por la enfermedad en el sujeto con base en el nivel del conjunto de biomarcadores de ARN, una desviación del nivel del conjunto de biomarcadores de ARN del sujeto de aquel de un sujeto control que será indicativo del riesgo de un ataque por la enfermedad.

10 23. El método de conformidad con la reivindicación 22, caracterizado además porque comprende administrar un agente terapéutico al sujeto, si se identifica que el sujeto está en riesgo de un ataque por la enfermedad.

24. El método de conformidad con la reivindicación 23, caracterizado porque el agente terapéutico es para un tratamiento profiláctico.

15 25. Un kit para analizar una muestra de un sujeto que tenga, se sospeche de tener, o esté en riesgo de tener una enfermedad asociada con el sistema por contacto, el kit caracterizado porque comprende:

(i) un primer agente de unión específico para un primer biomarcador de ARN seleccionado de la Tabla 1; y

(ii) un segundo agente de unión específico para un segundo biomarcador de ARN seleccionado de la Tabla 1;

20 en donde el primer biomarcador de ARN y el segundo biomarcador de ARN son diferentes.

25 26. El kit de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque el primer agente de unión es un oligonucleótido complementario para el primer biomarcador de ARN o un fragmento del mismo, y/o el segundo agente de unión es un oligonucleótido complementario para el segundo biomarcador de ARN o un fragmento del mismo.

27. El kit de conformidad con la reivindicación 25 ó 26, caracterizado porque el primer agente de unión, el segundo agente de unión, o ambos están conjugados a una marca.

30 28. El kit de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 25-27, caracterizado porque el primer agente de unión y el segundo agente de unión están inmovilizados sobre un miembro de soporte.

RESUMEN DE LA INVENCION

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



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2019/0002608
Recibo: 21-7309
Fecha: 28/01/2021

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 489895
CUS: 874569187

Patente PCT
MÉTODO IN VITRO PARA DETERMINAR ANGIOEDEMA HEREDITARIO POR MEDIO DE BIOMARCADORES DE ARN

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 171,500	\$ 171,500
TOTAL					\$ 171,500