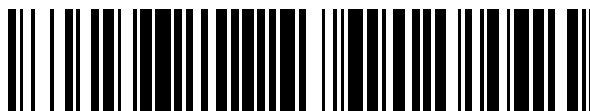


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 751**

51 Int. Cl.:
G01N 33/573 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08842581 .4**
96 Fecha de presentación: **15.10.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2201376**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2010**

54 Título: **Un nuevo biomarcador para monitorizar el desarrollo de enfermedades y evaluar la eficacia de terapias**

30 Prioridad:
24.10.2007 FI 20070795

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
FARON PHARMACEUTICALS OY (100.0%)
TYKISTÖKATU 6 B
20520 TURKU, FI

72 Inventor/es:
JALKANEN, SIRPA;
SALMI, MARKO y
JALKANEN, MARKKU

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 389 751 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un nuevo biomarcador para monitorizar el desarrollo de enfermedades y evaluar la eficacia de terapias.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Esta invención se refiere al uso de la proteína CD73 en líquidos tisulares como un biomarcador para evaluar el desarrollo de enfermedades. También se describen métodos para determinar la proteína CD73 en un líquido tisular.

FUNDAMENTO DE LA INVENCIÓN

Las publicaciones y otros materiales usados en la presente memoria para ilustrar el fundamento de la invención, y en particular, los casos para proporcionar detalles adicionales respecto a la práctica de la invención se incorporan como referencia.

10 CD73 es una enzima de la superficie celular que tiene actividad de 5'-ectonucleotidasa. Por tanto media la conversión de nucleótidos de purina monofosforilados en los nucleósidos correspondientes. Por ejemplo, la desfosforilación de AMP a adenosina es catalizada por CD73. La CD73 está presente también en una forma soluble en el plasma y la enzima soluble tiene la misma actividad enzimática que la forma unida a membranas.

15 La adenosina es uno de los reguladores fisiológicos de la permeabilidad celular endotelial [1, 2], y por tanto puede estar implicada en la patogénesis de muchos trastornos como lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), síndrome de dificultad respiratoria (SDR) y la enfermedad mal de altura. En la inflamación, en traumatismos y en el cáncer también tienen lugar cambios en la permeabilidad endotelial. La CD73 controla la permeabilidad endotelial vía un mecanismo mediado por adenosina en condiciones normales, en hipoxia y en lesión pulmonar inducida por un aparato respirador [3-7].

20 La CD73 es inducida por ciertas citoquinas. Del modo más importante se ha descrito que los interferones alfa y beta aumentan la expresión y la actividad de CD73 en seres humanos (8, WO 2004/084933, 11). Estas citoquinas se usan también en clínica para tratar diferentes enfermedades. El interferón alfa, por ejemplo, se usa para tratar ciertas infecciones y enfermedades malignas, tales como hepatitis y leucemia de células pilosas. El interferón beta, por otro lado, se usa ampliamente para tratar la inflamación en la esclerosis múltiple. Sin embargo, en muchos casos la respuesta beneficiosa al tratamiento con interferón sólo se aprecia en una subpoblación de pacientes, y también los
25 pacientes que responden inicialmente pueden más tarde ser refractarios al tratamiento. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar biomarcadores fácilmente medibles que reflejen la capacidad de respuesta biológica del cuerpo al tratamiento.

30 La solicitud de patente publicada WO 2004/084933 describe el uso de citoquinas para inducir la expresión endotelial de CD73 y elevar subsiguientemente el nivel de adenosina en un individuo. Está descrito el uso de interferón beta en combinación con monofosfato de adenosina (AMP) en el tratamiento de insuficiencia multiorgánica (IMO) en ratas.

La solicitud de patente publicada WO 2007/042602 describe el uso de interferón beta puro para el tratamiento o prevención de la lesión por isquemia-reperusión (LIR) o insuficiencia multiorgánica (IMO).

35 Se sabe que las estatinas, agentes hipolipidémicos usados para disminuir el nivel de colesterol inducen la expresión de CD73 en los pacientes.

También es conocido el uso de CD73 como un marcador tanto de la inflamación general como de la local en la artritis reumatoide [12].

40 Sin embargo, en la técnica anterior no hay descripciones referentes a la medida de la proteína CD73 en suero o cualquier otro líquido tisular para uso como un biomarcador para monitorizar el desarrollo de enfermedades o para evaluar la eficacia de las terapias.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

45 Los autores de la presente invención hemos demostrado que la actividad de la CD73 soluble se puede usar para monitorizar la gravedad y la capacidad de respuesta de una enfermedad a la terapia. Por lo tanto, creemos que el análisis del nivel de expresión o actividad de la CD73 por cualquier técnica puede proporcionar una valiosa información del curso de la una enfermedad o de la respuesta al tratamiento.

La presente invención se refiere a un método para monitorizar el desarrollo de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en:

- a) traumatismo de tejidos
- 50 b) una lesión por reperusión resultante de infarto de miocardio o ictus, trasplante de órganos o cualquier otra operación quirúrgica,
- c) cáncer o metástasis de cáncer, y
- d) un estado inflamatorio,

55 y en donde se usa como biomarcador la CD73 extraída de un líquido tisular de dicho paciente, en donde el método se repite en dos o más tiempos y se compara el nivel de CD73 de la muestra, con el de un análisis previo, y se usa para indicar el agravamiento de la enfermedad o para indicar la remisión de la enfermedad, en donde un aumento

del nivel del la CD73 indica remisión de la enfermedad y una disminución del nivel de la CD73 indica agravamiento de la enfermedad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5 **Figura 1.** La lesión por isquemia-reperfusión del intestino induce daño tisular primario y secundario. La arteria mesentérica fue ocluida durante 30 minutos y luego se permitió la reperfusión (restablecimiento del flujo sanguíneo) durante 4 horas. Las microfotografías representativas del (A) intestino y (B) pulmones de ratones de tipo natural (TN, es decir, no modificados genéticamente) después de la operación falsa (solamente laparotomía) y después de la inducción de lesión por isquemia-reperfusión (IR).

10 **Figura 2.** La actividad de CD73/5'NT sobre los pulmones se correlaciona inversamente con la actividad de la enfermedad. Ratones CD73/5NT^{-/-} y sus compañeros de camada de tipo natural (TN,) fueron sometidos a una operación falsa o a 30 minutos de isquemia intestinal seguida por 240 minutos reperfusión (por LPA). En otros grupos, los animales expuestos a LPA fueron tratados previamente con IFN-β. (A) Actividad de CD73/5'NT sobre el pulmón (valor medio ± error estándar, mmol de AMP hidrolizado por miligramo de proteína por hora) medida en lisados de tejidos por cromatografía en capa delgada (CCD). (B) Análisis semicuantitativo de fuga vascular [(exudación de dextrano conjugado con fluorescein-isotiocianato (FITC)) en los pulmones medido en cortes histológicos usando análisis de imagen (% del área del corte que exhibe fluorescencia por encima de un valor de fondo elegido arbitrariamente, valores medios ± error estándar). También se muestran microfotografías representativas de los grupos indicados. Barra, 50 μm. *p<0,05. **p<0,01.

20 **Figura 3.** La actividad de CD73/5'NT en paciente con SRIS que sufren pancreatitis. Los datos muestran la actividad de CD73/5'NT frente al grado de gravedad de la pancreatitis: 0 = pancreatitis suave; 1 = pancreatitis grave sin insuficiencia del órgano; 2 = pancreatitis grave con insuficiencia del órgano; 3 = control sano.

Figura 4. Actividad de CD73/5'NT' frente a la estancia total en la unidad de tratamiento intensivo (UTI) para pacientes con todos los grados de pancreatitis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

25 **Definiciones y realizaciones preferidas:**

El término "paciente" o "individuo" se refiere a un ser humano o a un sujeto animal.

30 El término "monitorizar el desarrollo de una enfermedad" significa que el agravamiento de la enfermedad (es decir, el empeoramiento de la enfermedad) o la remisión de la enfermedad (es decir, la recuperación del paciente) pueden ser detectados comparando un nivel medido del biomarcador con un valor de control o una o más medidas previas, realizadas en diferentes tiempos, del nivel del biomarcador en el mismo paciente. Por ejemplo, se puede usar un menor nivel del biomarcador, comparado con el resultado de una medida previa o con un valor de control para indicar el agravamiento de la enfermedad, mientras que se usa un mayor nivel del biomarcador, comparado con el resultado de una medida previa o con un valor de control para indicar la remisión de la enfermedad. Sin embargo, probablemente hay ciertas enfermedades que afectan al nivel del biomarcador en el modo contrario.

35 La expresión "líquido tisulares" debe entenderse que incluye cualquier líquido que bañe y circunde las células. La expresión incluye, por ejemplo, plasma sanguíneo, suero, linfa, orina, exudados (pleural, peritoneal) y líquido cefalorraquídeo.

40 La expresión "estado inflamatorio" pretende incluir cualquier respuesta inflamatoria perjudicial y no deseada de un tejido de un individuo, en donde dicho estado inflamatorio puede ser el resultado de un estado agudo tal como traumatismo tisular, lesión por reperfusión resultante de un infarto de miocardio o ictus, trasplante de órganos u otra operación quirúrgica o por un estado crónico incluyendo estados alérgicos, enfermedades autoinmunitarias, y enfermedades inflamatorias.

Las enfermedades cuyo desarrollo puede ser monitorizado usando la proteína CD73 en líquido tisular se seleccionan típicamente del grupo que comprende:

- 45
- a) traumatismo de tejidos
 - b) una lesión por reperfusión resultante de infarto de miocardio o ictus, trasplante de órganos o cualquier otra operación quirúrgica,
 - c) cáncer o metástasis de cáncer, y
 - d) un estado inflamatorio.

50 Las enfermedades típicas que conducen a un cambio en el nivel de CD73 en fluidos tisulares de pacientes especialmente en el suero son: traumatismo tisular; lesiones por reperfusión resultante de infarto de miocardio o ictus, trasplante de órganos u otras operaciones quirúrgicas, cáncer o metástasis de cáncer; o estados inflamatorios resultantes de los traumatismos antes mencionados o lesiones por reperfusión o por estados crónicos incluyendo estados alérgicos, enfermedades autoinmunitarias, y enfermedades inflamatorias. Como ejemplos de dichos estados

55 crónicos se pueden mencionar artritis, estados alérgicos, tales como asma, estados inflamatorios, tales como enfermedad intestinal inflamatoria o un estado inflamatorio de la piel, psoriasis, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunitarias, diabetes de tipo I o de tipo II, aterosclerosis, esclerosis

múltiple, enfermedad de Crom, o reacciones de rechazo debidas a trasplante de órganos. Particularmente, las enfermedades inflamatorias síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión pulmonar aguda (LPA), insuficiencia multiorgánica (IMO), lesión por isquemia-reperusión (LIR) y reacción adversa a medicamento (RAM) conducirán a alteraciones de la proteína CD73 en el tejido tisular.

5 El término "citoquina" incluye cualquier proteína o péptido usado en organismos como compuestos de señalización. En particular, este término se refiere a un interferón o una interleuquina, pero no está restringido a ellos. En el caso de que la citoquina sea un interferón, dicho interferón puede ser alfa-, beta-, gamma-, omega- o cualquier otro interferón y puede ser cualquier subtipo de los interferones antes mencionados. Los interferones se usan en el tratamiento de las enfermedades antes mencionadas. Como ejemplos de interleuquinas se pueden mencionar IL-4,
10 IL-10, IL-13 e IL-20.

Las "estatinas" forman una clase de agentes hipolipidémicos usados para disminuir los niveles de colesterol en individuos, particularmente para reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares. También pueden responder al tratamiento con estatinas los estados inflamatorios, demencia, cáncer, cataratas nucleares e hipertensión pulmonar.

15 La determinación de la proteína CD73 en una muestra extraída de un líquido tisular de un individuo puede ser llevada a cabo por inmunodetección cuantificando el nivel de la proteína CD73 en dicha muestra sometiendo la muestra a un aglutinante o agente de unión que reconoce la proteína CD73, y cuantificar dicho aglutinante.

Alternativamente, la detección puede ser llevada a cabo detectando la actividad de la proteína CD73 en dicha muestra usando cromatografía en capa delgada o sometiendo dicha muestra a la acción de un sustrato de la CD73 y monitorizando el cambio de dicho sustrato.

20 El término "aglutinante" debe entenderse que incluye anticuerpos, que pueden ser monoclonales o policlonales o modificados por ingeniería genética; cualesquiera fragmentos de anticuerpos; aptámeros y *afficuerpos*, y cualquier otro aglutinante capaz de unirse a un epítipo de la proteína CD73. Los anticuerpos para la CD73 son bien conocidos en la técnica, véase por ejemplo <http://www.biocompare.com/matrixse/3194/6/67151/CD73.html>. Los *afficuerpos* representan una nueva clase de aglutinantes y son proteínas pequeñas y especialmente estables, desarrolladas por
25 Affibody Ab.

El ensayo de unión (aglutinación) puede ser competitivo o no competitivo. Un ensayo preferido es un ensayo sándwich en donde un anticuerpo de captura (u otra clase de aglutinante) inmovilizado en un soporte sólido se somete a una muestra que comprende el antígeno, que se une por un primer epítipo para capturar el anticuerpo y añadir un anticuerpo marcado (u otra clase de aglutinante), dirigido a otro epítipo del antígeno. El anticuerpo
30 marcado se cuantifica bien sea directamente (ensayo homogéneo) o después de separación de los anticuerpos marcados no inmovilizados. El marcador puede ser un isótopo radiactivo, un colorante fluorescente, una enzima o cualquier otro marcador detectable.

Por ejemplo, para los fines de inmunodetección, cualquier anticuerpo específico anti-CD73 se puede usar para capturar la CD73 soluble de la muestra, y luego se puede cuantificar la cantidad de proteína unida usando una
35 variedad de técnicas. Por ejemplo, se puede emplear un ensayo ELISA de tipo sándwich en el cual un anticuerpo anti-CD73 está inmovilizado en el fondo de placas multi-pocillos, se añade la muestra, y la CD73 unida es detectada usando otro anticuerpo anti-CD73. El anticuerpo anti-CD73 se detecta luego usando cualquiera de las múltiples técnicas adecuadas para la detección de anticuerpos, tales como anticuerpos marcados de segunda etapa. La especificidad para la CD73 de la reacción se controla incluyendo un anticuerpo irrelevante como un anticuerpo de
40 captura o detección y comparando las señales entre estos controles negativos y los anticuerpos anti-CD73.

Determinación de la actividad de CD73

La actividad de CD73 puede ser medida usando cromatografía en capa delgada de acuerdo con los protocolos publicados. La actividad de CD73 se puede medir también usando un ensayo enzimático que mida la conversión de
45 AMP, u otro mononucleótido de purina que se pueda usar como sustrato de la CD73, en el nucleósido correspondiente. Por ejemplo, el ensayo puede estar basado en la conversión de sustratos marcados radiactivamente o fluorescentemente. Los métodos de detección pueden estar basados en la cuantificación de la disminución en una concentración de sustrato o un aumento en la concentración de producto o la liberación del grupo fosfato. La dependencia de CD73 de la reacción se puede determinar realizando el ensayo en presencia y ausencia de un inhibidor conocido de la CD73, tal como AMPCP.

50 Los sustratos conocidos para la CD73 son, por ejemplo nucleósido-5'-monofosfatos incluyendo adenosin-5'-monofosfato (AMP), inosina-5'-monofosfato (IMP) y similares.

La invención se ilustrará por el siguiente apartado de ejemplos no restrictivos.

APARTADO EXPERIMENTAL

Materiales y métodos

55 **Modelo de la lesión pulmonar aguda (LPA) y fuga vascular**

Se usaron ratones CD73^{-/-}, que fueron retrocruzados con otros de procedencia C57BL/6 durante 8 generaciones y

ratones C57BL/6 de tipo natural (TN). Dichos ratones carecían del RNA de la proteína CD73 con actividad enzimática, [3]. Los animales fueron agrupados por igualdad de peso, sexo y edad. Todos los ratones tuvieron acceso a comida estándar para ratones y agua hasta el final del experimento.

Los ratones fueron anestesiados con hidrocloreto de ketamina (100 mg/kg de peso corporal, i.p.) y xilazina (10 mg/kg peso corporal, i.p.). Durante la anestesia los ratones respiraron espontáneamente con aire normal. Antes de la cirugía los animales recibieron 1 ml de solución salina subcutáneamente para compensar la pérdida de líquidos antes de la operación. Se disecó la arteria mesentérica superior mediante una laparotomía en la línea central y se ocluyó por una pinza microvascular durante 30 minutos. Los animales operados falsamente experimentaron una disección de la arteria mesentérica superior sin oclusión vascular. La herida se suturó en una capa. La temperatura corporal de los animales se mantuvo a través de la fase de isquemia con una lámpara calentadora. Después de la isquemia, la pinza microvascular se liberó, se suturó la herida y los animales recibieron subcutáneamente 1 ml adicional de solución salina. Después de 235 minutos de reperfusión los ratones recibieron dextrano conjugado con FITC (25 mg/kg de peso corporal en 0,2 ml de solución salina estéril; peso molecular: 70.000 D, Molecular Probes). Después de 240 minutos de reperfusión se sacrificaron los ratones y se recogieron las muestras de tejidos.

El protocolo de 30 min de isquemia-240 minutos de reperfusión es un modelo de LPA establecido y reproducible [9]. El protocolo fue aprobado por el *Committee on Animal Ethics* de la Universidad de Turku (permiso nº 1597/05 a Sirpa Jalkanen).

Se estudió el efecto del IFN- β sobre la actividad y permeabilidad del CD73 usando protocolos pre- y pos-tratamiento. Sub-grupos de ratones fueron pretratados con IFN- β recombinante de ratón (6000 UI s.c. una vez al día durante 3 días antes de la isquemia). En el grupo del pos-tratamiento, los animales tuvieron un solo bolo de IFN- β (20.000 UI) intravenosamente después de la fase isquémica al comienzo del periodo de reperfusión.

Todos los ratones fueron inyectados i.v. con dextrano conjugado con FITC (70 kDa) 5 minutos antes de la eutanasia. La fuga vascular fue determinada a partir de tres imágenes en color tomadas de campos elegidos al azar de pulmones de ratones crioseccionados usando análisis de imagen por ordenador (Imagen J).

25 **Análisis de la actividad de CD73**

Se analizó la actividad de ecto-5'-nucleotidasa por CCD, como se ha descrito previamente [10]. Explicado brevemente: el ensayo se realizó con la enzima estándar contenida en un volumen final de 120 μ l de RPMI 1640, lisado de pulmón, β -glicerofosfato 5 mmol/L, y las concentraciones indicadas de AMP con el trazador [3 H]AMP (actividad específica, 18,6 Ci/mmol; Amersham, Little Chalfont, Reino Unido). Se eligieron tiempos de incubación para asegurar la linealidad de la reacción con el tiempo, de modo que la cantidad de AMP convertido no excedió de 7-10% del sustrato introducido inicialmente. Se aplicaron partes alícuotas de la mezcla a hojas de CCD Alugram SIL G/UV254 (Machery-Nagel, Düren, Alemania) y se realizó la separación con isobutanol/alcohol isoamílico /2-etoxi-etanol/amoniaco/H₂O (9:6:18:9:15) como disolvente. El AMP marcado con 3 H y sus derivados de nucleósidos desfosforilados fueron visualizados en luz UV y cuantificados usando un espectrómetro Wallac-1409 β . La actividad de CD73 se expresó como nM de AMP hidrolizado por miligramo de proteína por hora. La concentración de proteína en los lisados se determinó con el kit de análisis de proteínas con ácido bicinconínico (abreviadamente BCA por la expresión inglesa *bicinchoninic acid*) (Pierce, Rockford, IL) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Valoraciones estadísticas

Se usó el programa informático ANOVA no paramétrico de una vía (ensayos U de Kruskal-Wallis y Mann-Whitney).

40 **Resultados**

La actividad de CD73 está correlacionada con la actividad de enfermedades.

La isquemia-reperfusión (IR) intestinal causó un daño tisular marcado tanto en el intestino como en los pulmones (Fig. 1). En los pulmones del ratón de tipo natural operado falsamente la actividad de CD73 fue baja (Fig. 2A). Los análisis microscópicos de FITC-dextrano en los pulmones mostraron que hubo solo una fuga marginal en los ratones TN sometidos a la operación falsa (Fig. 2B).

Cuando se indujo LPA en los animales TN, la actividad de CD73 se redujo en 25%. Al mismo tiempo aumentó significativamente la fuga vascular. Los cambios en la permeabilidad vascular se correlacionan directamente con la gravedad de la enfermedad, puesto que la fuga de líquidos intravasculares al parénquima pulmonar y además a los alveolos es la principal causa de deterioro de la función pulmonar y perjudicó el intercambio de gases.

Como era de esperar la actividad de CD73 fue indetectable o a niveles extremadamente bajos en ratones deficientes en CD73 tanto después de la operación falsa como después de la IR intestinal. En ratones deficientes en CD73 la fuga en los animales falsamente operados fue aumentada moderadamente cuando se comparan con los ratones de tipo natural operados falsamente. Notablemente, cuando se indujo LPA los ratones deficientes en CD73 mostraron aproximadamente 80% más fuga en los pulmones que sus compañeros de camada de ratones TN ($p=0,03$).

Estos datos muestran que hay una correlación inversa entre la actividad de CD73 y la permeabilidad vascular, que es una medida de la gravedad de la enfermedad.

La actividad de CD73 está correlacionada con la respuesta al tratamiento

El tratamiento previo durante 3 días con IFN- β (a una dosis usada clínicamente en el tratamiento de la esclerosis múltiple) condujo a un aumento del 230 % en la actividad de CD73 en pulmones de ratones TN durante la LPA ($p=0,002$, Fig. 2A). Más sorprendentemente, el área de fuga en los ratones TN después de la inducción de LPA se redujo en más del 90% después del tratamiento previo con IFN- β cuando se comparó con los compañeros de camada no tratados ($p=0,0001$, Fig. 2B). De hecho, no hubo diferencia de los animales solamente sometidos a la operación falsa. Sorprendentemente el IFN- β tampoco tuvo efectos protectores en los ratones con LPA deficientes en CD73. Estos datos muestran que el tratamiento con interferón beta disminuye la fuga vascular de un modo sorprendentemente dependiente de CD73. Además, el aumento en la actividad de CD73 en ratones de tipo natural (TN) puede ser usado para predecir un resultado beneficioso en la respuesta al tratamiento con IFN- β .

Luego los inventores analizamos si el tratamiento con IFN- β podía revertir una lesión capilar ya establecida. Para tal fin tratamos los ratones con IFN- β solamente después del periodo isquémico en el momento de la reperusión. Notablemente, la única dosis de IFN- β significativamente alta mejoró la función de la barrera vascular durante las 4 horas siguientes al periodo de reperusión. La fuga de FITC-dextrano se redujo en $90 \pm 9\%$ en el grupo de post-tratamiento cuando se comparó con el grupo de control ($n=8-13$ ratones/grupo, $p<0,001$). Al mismo tiempo, la medida de la actividad de CD73 en la muestras de suero aumentó en más de 30% (desde 427 ± 22 en el grupo con LPA sin tratamiento hasta 561 ± 48 en el grupo con LPA tratado con IFN- β ; $p=0,04$, $n=4$ /grupo). Por tanto, la inducción de la actividad de CD73 se correlaciona positivamente con una respuesta al tratamiento. Además, medir la actividad de CD73 en una muestra de sangre puede proporcionar información útil acerca de la capacidad de respuesta al IFN- β .

Referencias

1. Hasko, G. and Cronstein, B. N., *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity*. *Trends Immunol.* 2004. 25; 33-39.
2. Ohta, A. and Sitkovsky, M., *Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage*. *Nature* 2001. 414: 916-920.
3. Thompson, L. F., Elzschig, H. K., Ibla, J. C., Van De Wiele, C. J., Resta, R., Morote-García, J. C. and Colgan, S. P., *Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia*. *J. Exp. Med.* 2004. 200: 1395-1405.
4. Lennon, P. F., Taylor, C. T., Stahl, G. L. and Colgan, S. P., *Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation*. *J. Exp. Med.* 1998. 188: 1433-1443.
5. Synnestvedt, K., Furuta, G. T., Comerford, K. M., Louis, N., Karhausen, J., Elzschig, H. K., Hansen, K. R., Thompson, L. F. and Colgan, S. P., *Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia*. *Clin. Invest.* 2002. 110: 993-1002.
6. Henttinen, T., Jalkanen, S. and Yegutkin, G. G., *Adherent leukocytes prevent adenosine formation and impair endothelial barrier function by Ecto-5'-nucleotidase/CD73-dependent mechanism*. *J. Biol. Chem.* 2003. 278; 24888-24895.
7. Eckle, T., Fullbier, L., Wehrmann, M., Koury, J., Mittelbronn, M., Ibla, J., Rosenberger, P. and Elzschig, H. K., *Identification of Ectonucleotidases CD39 and CD73 in Innate Protection during Acute Lung Injury*. *J. Immunol.* 2007. 178: 8127-8137.
8. Niemela, J., Henttinen, T., Yegutkin, G. G., Airas, L., Kujari, A. M., Rajala, P. and Jalkanen, S., *IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) upregulation*. *J. Immunol.* 2004. 172; 1646-1653.
9. Ohara, M., Unno, N., Mitsuoka, H., Kaneko, H. and Nakamura, S.; *Peritoneal lavage with oxygenated perfluorochemical preserves intestinal mucosal barrier function after ischemia-reperfusion and ameliorates lung injury*. *Crit.Care Med.* 2001. 29: 782-788.
10. Yegutkin, G. G., Henttinen, T. and Jalkanen, S., *Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via fosfotransfer reactions*. *FASEB J.* 2001, 15: 251-260.
11. Airas, L., Niemelä, J., Yegutkin, G. and Jalkanen, S., *Mechanism of Action of IFN- β in the treatment of Multiple Sclerosis*. *Ann N.Y. Acad. Sci.* 1110:641-648 (2007).
12. S. M. Johnson, S. Patel, F. E. Bruckner and D. A. Collins, *5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients*. *Rheumatology*, 1999; 38: 391-396.

REIVINDICACIONES

1. Un método para monitorizar el desarrollo de una enfermedad en un paciente, en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que comprende:
 - a) traumatismo de tejidos
 - 5 b) una lesión por reperfusión como resultado de infarto de miocardio o ictus, trasplante de órganos o cualquier otra operación quirúrgica,
 - c) cáncer o metástasis de cáncer, y
 - d) un estado inflamatorio.
- 10 y en donde se usa como biomarcador la CD73 extraída de un líquido tisular de dicho paciente, en donde el método se repite en dos o más tiempos y se compara el nivel de CD73 de la muestra, con el de un análisis previo, y se usa para indicar el agravamiento de la enfermedad o para indicar la remisión de la enfermedad, en donde un aumento del nivel de la CD73 indica remisión de la enfermedad y una disminución del nivel de la CD73 indica agravamiento de la enfermedad.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la enfermedad es una enfermedad inflamatoria.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la enfermedad es síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión pulmonar aguda (LPA), insuficiencia multiorgánica (IMO), lesión por isquemia-reperfusión (LIR) o reacción adversa a medicamentos (RAM).

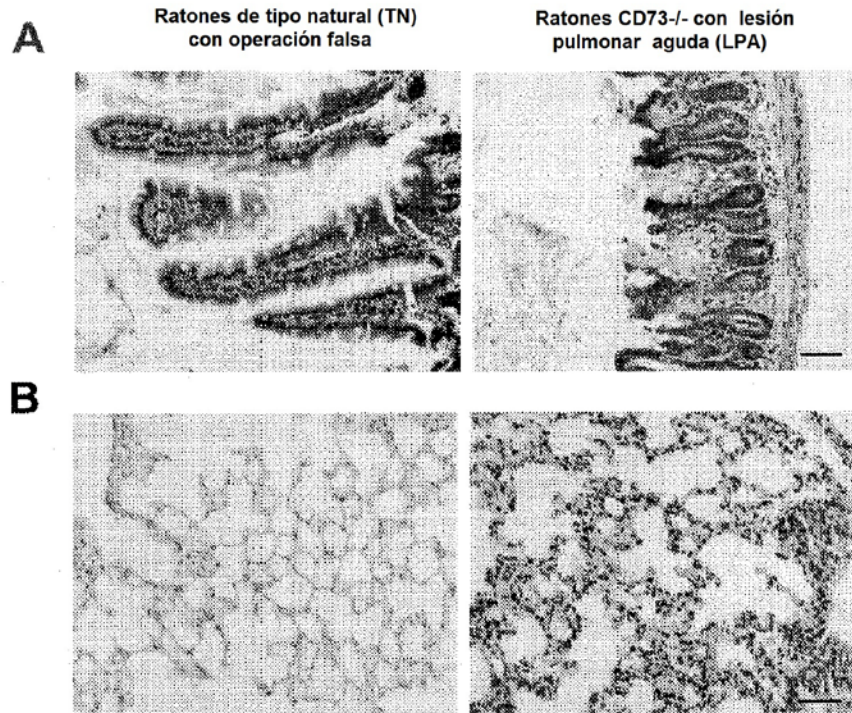


FIG. 1

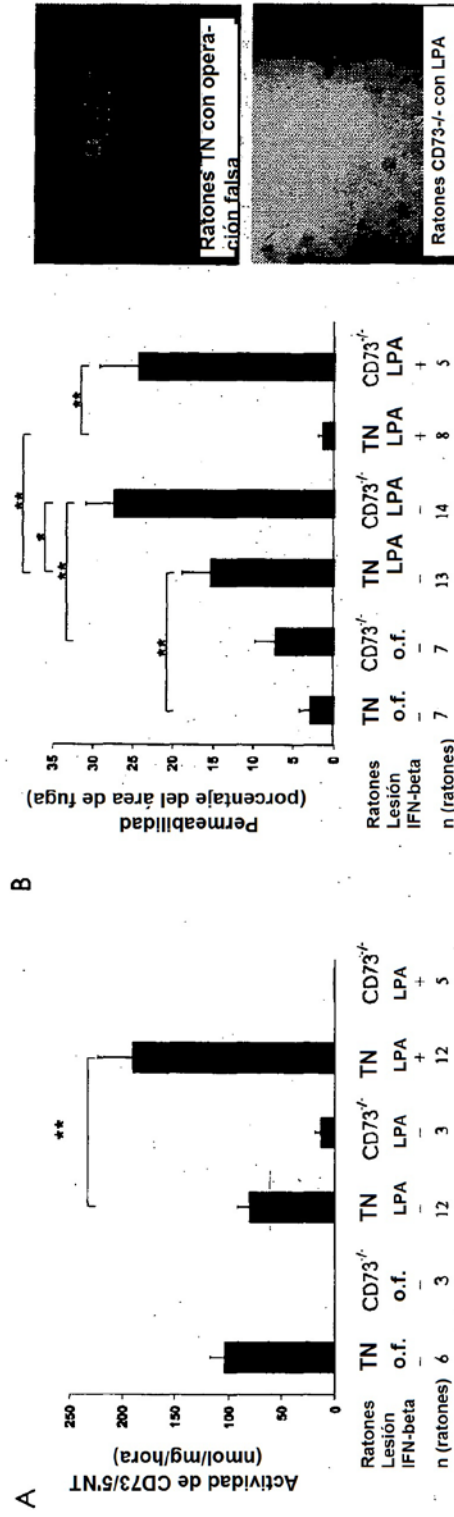


FIG. 2

Actividad de CD73 en pacientes con síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

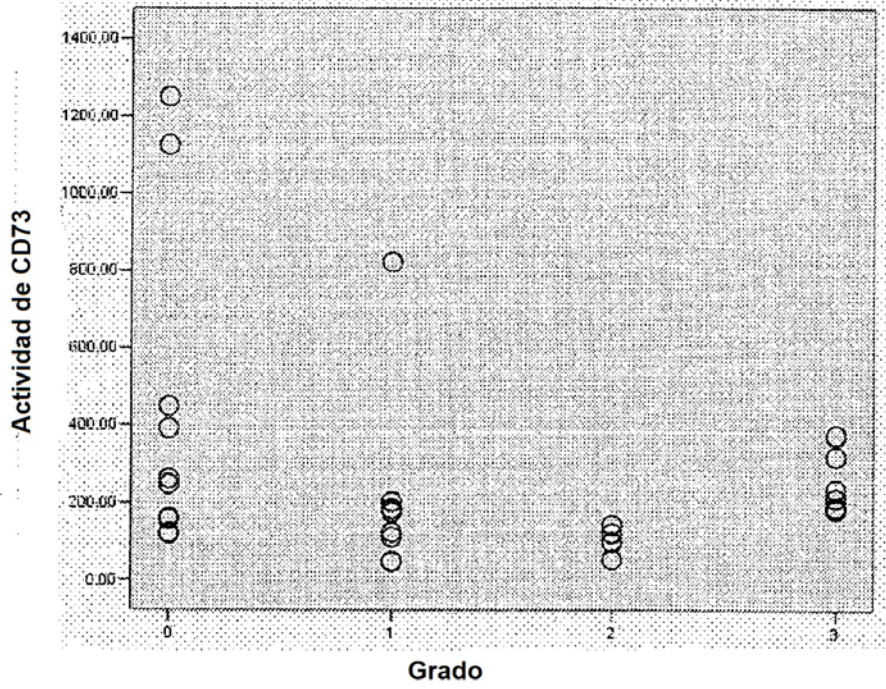


FIG. 3

Actividad de CD73 frente a estancia total en la unidad de tratamiento intensivo (UTI) (Todos los grados)

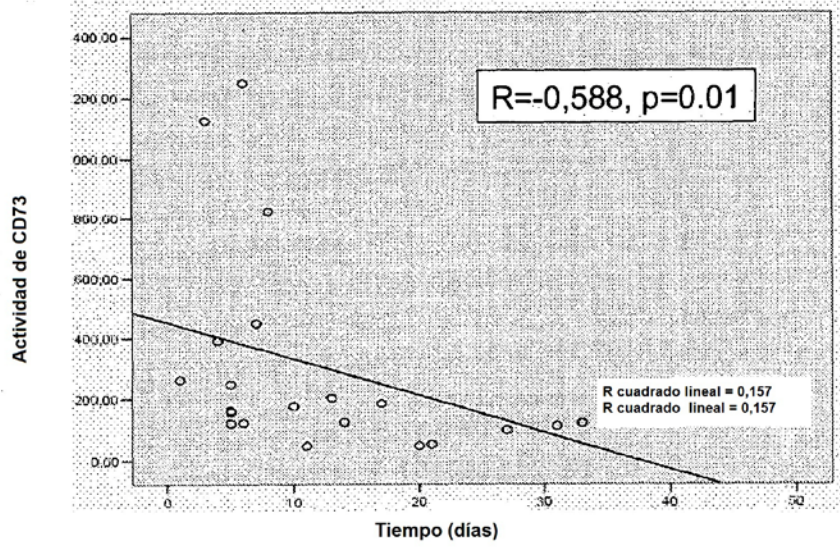


FIG. 4