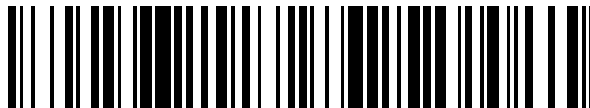


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 468 394**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2009 E 09833528 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2370816**

54 Título: **Método para el diagnóstico de la fibrosis quística mediante el uso de los niveles de KL-6**

30 Prioridad:

18.12.2008 US 193717 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.06.2014

73 Titular/es:

**EIDIA CO., LTD. (100.0%)
1-10-6 Iwamoto-cho Chiyoda-ku
Tokyo 101-0032, JP**

72 Inventor/es:

**OHSIMO, SHINICHIRO;
KOHNO, NOBUOKI y
COSTABEL, ULRICH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 468 394 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

Método para el diagnóstico de la fibrosis quística mediante el uso de los niveles de KL-6

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la fibrosis quística mediante el uso de los niveles de KL-6.

Técnica antecedente

10 La fibrosis quística (FQ) es el trastorno genético que acorta la esperanza de vida más habitual entre individuos de raza blanca, con una frecuencia estimada de 1:3.400 nacidos vivos (por ejemplo, véase Stat Med 1996; 15:449-462). El factor patogénico principal de FQ es una mutación en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (por ejemplo, véase Science 1989; 245:1066-1073). A pesar de unos avances terapéuticos espectaculares, FQ continúa siendo progresiva, lo que da como resultado una infección pulmonar crónica y una esperanza de vida acortada. Los estudios previos han demostrado que la función pulmonar deteriorada es el factor pronóstico más sensible para los pacientes de FQ (por ejemplo, véase Am J Respir Crit Care Med 2006; 173:659-666, Thorax 2001; 56:746-750, Jama 2001; 286:2683-2689, Eur Respir J 2000; 16:1056-1060, y N Engl J Med 1992; 326:1187-1191). Los marcadores séricos sensibles para predecir la función pulmonar deteriorada y el pronóstico pueden ser, por tanto, útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad. Aunque la especificidad de un análisis de sangre es limitada, en general, para estudiar la patología local en las vías respiratorias pequeñas de los pacientes de FQ, todavía puede ser beneficiosa porque la toma de muestras de sangre es mínimamente invasiva y se puede repetir fácilmente.

20 Descripción de la invención

La presente invención se ha hecho en vista de las circunstancias anteriormente descritas. Proporciona un método para el diagnóstico de la fibrosis quística mediante el uso de un marcador útil no invasivo.

25 Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un método para el diagnóstico de la fibrosis quística que comprende: medir una cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal de un sujeto, y determinar, basándose en la cantidad de KL-6 medida, el grado de presencia de fibrosis quística en el sujeto. Es favorable medir la cantidad de KL-6 mediante un ensayo ELISA o un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia.

Según un segundo aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar la eficacia de un tratamiento de la fibrosis quística en un sujeto, y el método comprende: medir una cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal del sujeto, y determinar la eficacia del tratamiento en el sujeto basándose en la cantidad de KL-6 medida.

30 Descripción breve de los dibujos

La Figura 1 muestra un gráfico de dispersión que muestra una distribución por sexos de los niveles de KL-6 sérico en 80 sujetos sanos.

La Figura 2 muestra un gráfico de dispersión que muestra una distribución por edades de los niveles de KL-6 sérico en 80 sujetos sanos.

35 La Figura 3 muestra un gráfico de dispersión que muestra la distribución de los niveles de KL-6 sérico en pacientes con FQ, sujetos sanos no fumadores y sujetos sanos fumadores habituales (fumador hab.).

La Figura 4 muestra las curvas de características operativas del receptor para KL-6, LDH y CRP para la detección de la fibrosis quística.

40 La Figura 5 muestra diagramas de dispersión que muestran la correlación de los niveles de KL-6 sérico con el % VC predicho.

La Figura 6 muestra diagramas de dispersión que muestran la correlación de los niveles de KL-6 sérico con el % FEV₁ predicho.

Descripción de la realización preferida

45 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de la fibrosis quística mediante el uso de los niveles de KL-6. En particular, la invención se refiere a un método para determinar la gravedad de la fibrosis quística después de medir la cantidad de KL-6 en un fluido corporal de un paciente.

En la presente invención, el término "etapa" se usa no solamente para una etapa específica, sino también para una etapa que es indistinguible de otras etapas, con tal de que el propósito o los resultados deseados se puedan conseguir u obtener.

50 Una primera realización de la presente invención proporciona un método para el diagnóstico de la fibrosis quística

que comprende: medir una cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal de un sujeto (etapa de medición); y determinar, basándose en la cantidad de KL-6 medida, el grado de presencia de fibrosis quística en el sujeto (etapa de determinación). Es favorable medir la cantidad de KL-6 mediante un ensayo ELISA o un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia.

- 5 KL-6 es una glicoproteína similar a mucina con un peso molecular de 200 kd, y se ha clasificado como mucina MUC1 humana (por ejemplo, véase Int J Cancer, Supl. 1994; 8:6-26). Se ha informado que KL-6 es un marcador sensible para diversas enfermedades pulmonares intersticiales, que incluyen fibrosis pulmonar idiopática (FPI), neumonitis por radiación, neumonitis inducida por fármacos, neumonitis intersticial asociada a enfermedad vascular del colágeno, alveolitis alérgica extrínseca, sarcoidosis pulmonar y proteinosis alveolar pulmonar (por ejemplo, véase Chest 1989; 96:68-73, Thorax 2003; 58:872-875, Chest 1996; 109:1276-1282, y Am J Respir Crit Care Med 1998; 158:1294-1298). Además, la importancia pronóstica de KL-6 también se ha demostrado en pacientes con FPI y neumonitis inducida por fármacos con daño alveolar difuso o patrón de neumonía intersticial crónica (por ejemplo, Thorax 2003; 58:872-875 y Respirology 2006; 11:164-168). Sin embargo, no se ha investigado la importancia de KL-6 sérico en los pacientes de FQ.
- 10
- 15 En la etapa de medición del método de diagnóstico de fibrosis quística de la presente invención, se mide la cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal de un sujeto.

La muestra de fluido corporal es preferiblemente, pero sin limitación, al menos una seleccionada de sangre, plasma, líquido linfático y suero. La preparación de la muestra de fluido corporal no está limitada en particular, y se puede llevar a cabo mediante métodos convencionales.

- 20 El método para medir el KL-6 no está limitado, con tal de que se pueda medir la cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal. Se pueden usar los métodos habituales para detectar proteínas, tales como un método que usa anticuerpos anti-KL-6, cromatografía de intercambio iónico, espectrometría de masas y similares. Es preferible un método de medición que use anticuerpos anti-KL-6 en vista de la sensibilidad de detección, especificidad de detección y comodidad de detección. Los anticuerpos anti-KL-6 están disponibles comercialmente como componente de equipos para ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) para detectar KL-6, tales como Picolumi KL-6 o Eitest KL-6, fabricados por Sanko Junyaku, Tokio, Japón.
- 25

En una realización preferida de la presente invención, la medición del nivel de KL-6 se puede llevar a cabo mediante un inmunoensayo que incluye el uso de anticuerpos anti-KL-6 y anticuerpos marcados.

- 30 El inmunoensayo se puede llevar a cabo mediante cualquier ensayo convencional sin ninguna limitación particular. Los ejemplos del inmunoensayo incluyen el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo de quimioluminiscencia, inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL), ensayo de absorción, una técnica con anticuerpos fluorescentes, radioinmunoensayo (RIA), resonancia de plasmones superficiales, transferencia de Western, transferencia puntual y similares. En la presente invención, son preferibles el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o el inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECL) en vista de la sensibilidad de detección, especificidad de detección y comodidad de detección. Los equipos para ELISA o ECL para detectar KL-6 están disponibles comercialmente, por ejemplo, como Picolumi KL-6 o Eitest KL-6, fabricados por Sanko Junyaku, Tokio, Japón.
- 35

- 40 Se puede usar cualquier agente marcador conocido ("un marcador") para marcar anticuerpos y materiales en las realizaciones de la presente invención sin ninguna limitación particular. Los ejemplos del marcador incluyen enzimas, materiales quimioluminiscentes, materiales electroquimioluminiscentes, materiales radiactivos y similares. En la presente invención, las enzimas son preferibles como marcador en vista de la sensibilidad de detección y comodidad de detección.

- 45 Las enzimas se pueden usar sin ninguna limitación particular, con tal de que se pueda llevar a cabo una detección cuantitativa mediante un procedimiento físico o químico. Los ejemplos de las enzimas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano (HRP), luciferasa y similares.

- 50 El método para detectar los materiales marcados no está limitado, con tal de que el método se use normalmente para este fin. Los métodos para detectar los materiales marcados incluyen, por ejemplo, el espectro de absorbancia, la intensidad de luminiscencia, la intensidad de fluorescencia, o la medición de radiación, y similares. El método se puede seleccionar de manera adecuada de acuerdo con el tipo de marcador.

En una etapa de determinación de la presente invención, se puede determinar el grado de presencia de fibrosis quística en el sujeto basándose en la cantidad de KL-6 medida.

- 55 Por ejemplo, cuando la cantidad de KL-6 en la muestra de fluido corporal del sujeto es igual o mayor que un nivel de referencia establecido para distinguir entre una persona sana y un paciente con fibrosis quística, se puede determinar que el sujeto tiene fibrosis quística.

El nivel de referencia usado en la etapa de determinación puede ser un nivel basado en cualquier criterio, con tal de

que se pueda usar para distinguir entre una persona sana y un paciente con fibrosis quística. Una persona sana como control es un individuo en el que previamente se ha determinado que no tiene fibrosis quística.

5 En una realización preferida de la presente invención, el nivel de referencia puede ser un nivel de detección normal (nivel umbral) o una cantidad de KL-6 de una muestra de fluido corporal de otra persona sana. Un nivel umbral se puede determinar como un valor que es el nivel medio detectado en las personas sanas más un valor de varias veces (por ejemplo, dos veces) la desviación estándar. Además, el nivel umbral se puede cambiar de manera adecuada a otro nivel de acuerdo con el sexo, la edad, un factor del estilo de vida, tal como el tabaquismo, el grupo étnico, la región en la que viven los pacientes, y similares. Por ejemplo, una cantidad de KL-6 de un hombre sano puede ser mayor que la de una mujer sana, o una cantidad de KL-6 de un anciano sano puede ser mayor que la de un joven sano. El nivel de referencia se puede determinar según al menos el sexo o la edad del sujeto.

10 La cantidad de KL-6 en la muestra de fluido corporal del sujeto se puede correlacionar con las variables ensayo de la función pulmonar. Las variables de ensayo de la función pulmonar pueden cambiar según el grado de gravedad de la fibrosis quística en el sujeto, y el grado de gravedad de la fibrosis quística se puede determinar mediante la cantidad de KL-6.

15 Por ejemplo, el % de capacidad vital (VC) y el % de volumen espiratorio máximo en un segundo (FEV₁) pueden disminuir según el grado de gravedad de la fibrosis quística. Por otra parte, un incremento de la cantidad medida de KL-6 se puede correlacionar con una disminución de VC y FEV₁. El grado de gravedad de la fibrosis quística se puede determinar basándose en la cantidad de KL-6 medida.

20 La segunda realización de la presente invención es un método para determinar la eficacia de un tratamiento de fibrosis quística en el sujeto, y el método comprende medir una cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal del sujeto (etapa de medición), y determinar la eficacia del tratamiento en el sujeto basándose en la cantidad de KL-6 medida (etapa de determinación).

25 Las cuestiones relacionadas con las muestras de fluido corporal y KL-6 con respecto al método para determinar la eficacia del tratamiento de la fibrosis quística pueden ser las mismas que en la descripción del método para el diagnóstico de la fibrosis quística descrito anteriormente.

La etapa de medición del método para determinar la eficacia del tratamiento de la fibrosis quística se puede llevar a cabo de la misma manera que la etapa de medición del método para el diagnóstico de la fibrosis quística descrito anteriormente.

30 En la etapa de determinación del método para la determinación de la eficacia del tratamiento de la fibrosis quística, la eficacia del tratamiento de la fibrosis quística se puede determinar basándose en la cantidad de KL-6 en la muestra de fluido corporal del sujeto. El tratamiento no está limitado en particular, con tal de que sea un método de tratamiento de la fibrosis quística. Mediante el uso del método para determinar la eficacia, se puede llevar a cabo de manera más eficaz el tratamiento de la fibrosis quística en el sujeto.

35 Por ejemplo, cuando la cantidad de KL-6 en la muestra de fluido corporal del sujeto tratado es igual o menor de un nivel de referencia que se establece según la cantidad de KL-6 en el fluido corporal del sujeto sin tratar, se puede determinar que el tratamiento de la fibrosis quística puede ser eficaz en el paciente. Por otra parte, cuando la cantidad de KL-6 en la muestra de fluido corporal del sujeto tratado es mayor que el nivel de referencia, se puede determinar que el tratamiento de la fibrosis quística puede no ser eficaz. El nivel de referencia usado en la etapa de determinación puede ser la cantidad de KL-6 en el sujeto sin tratar o un nivel de referencia que se selecciona basándose en la cantidad de KL-6 con un error aceptable.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos.

<Sujetos de Estudio>

45 Se estudiaron pacientes consecutivos de FQ admitidos en la Ruhrlandklinik (Essen, Alemania) para determinaciones rutinarias entre febrero y noviembre de 2007. El diagnóstico se basó en hallazgos clínicos compatibles, mutaciones genéticas o el ensayo del sudor. En el momento de la incorporación al estudio, se excluyeron las enfermedades pulmonares intersticiales obvias de etiología conocida, neoplasias malignas o infecciones agudas. Los sujetos sanos que coincidían en edad y sexo sirvieron como controles para los niveles de KL-6 sérico. Todos los sujetos fueron de raza blanca. Hubo 72 pacientes con FQ (ninguno era fumador habitual), 40 no fumadores sanos, y 40 fumadores habituales sanos. No se observaron diferencias significativas en la distribución de sexos y edades entre los grupos (Tabla 1). Los pacientes de FQ tuvieron una altura media de 170,0 ± 9,7 cm, un peso corporal medio de 59,5 ± 12,4 kg y un índice de masa corporal medio (IMC) de 20,5 ± 3,4. Se obtuvieron muestras de suero de todos los sujetos al someterse a análisis de sangre rutinarios, y se almacenaron a -80 °C hasta el análisis de KL-6. Se obtuvo un consentimiento informado documentado de todos los sujetos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética Médica.

55

Tabla 1

| Factores | FQ | Sanos | Sanos |
|---|----------------|-----------------|------------------------|
| | | (no fumadores) | (fumadores habituales) |
| Número, n | 72 | 40 | 40 |
| Sexo, masculino/femenino, n | 32/40 | 18/22 | 14/26 |
| Edad (años), media \pm DE (intervalo) | 30,6 \pm 9,9 | 32,6 \pm 10,0 | 35,5 \pm 12,4 |
| | (15 - 63) | (16 - 58) | (19 - 64) |

<Ensayo de KL-6>

5 El nivel de KL-6 sérico se midió mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de tipo sándwich mediante el uso del equipo de ELISA Eitest KL-6 (Eisai, Tokio, Japón) según el protocolo del fabricante. Todas las muestras se midieron por duplicado, y se usaron los valores medios para el análisis posterior.

<Función Pulmonar>

10 Se analizó la capacidad vital (VC) y el volumen espiratorio máximo en un segundo (FEV₁) mediante el uso de espirometría (ZAN 400 Sniff, ZAN Messgeraete GmbH, Alemania). Los valores se expresaron como porcentajes de los valores normales predichos.

<Métodos Estadísticos>

15 Los datos se expresan como la media \pm desviación estándar. La comparación de las variables que no están distribuidas de manera normal entre grupos se realizó con la prueba U de Mann-Whitney. Se analizaron las correlaciones entre los niveles de KL-6 sérico y las variables de la función pulmonar con un análisis de regresión lineal. Se usó el procedimiento LSD de Fisher para el análisis de comparaciones múltiples. Se usó la prueba t para datos emparejados para comparar las áreas bajo la curva ROC. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso del programa SPSS versión 13.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor p fue $< 0,05$.

<Niveles de KL-6 Sérico en Sujetos Sanos>

20 La distribución de los niveles de KL-6 sérico en 80 sujetos sanos se muestra en la Figura 1 y la Figura 2. En la Figura 1 y la Figura 2, las barras indican la media. El nivel de KL-6 sérico medio fue significativamente mayor en los hombres que en las mujeres (media \pm DE, hombres 262 \pm 79 U/mL, mujeres 225 \pm 81 U/mL; $p < 0,03$). Los niveles de KL-6 sérico se correlacionaron con la edad ($r = 0,45$, $p < 0,0001$).

<Niveles de KL-6 Sérico en Pacientes de FQ>

25 El nivel de KL-6 sérico medio estuvo significativamente elevado en los pacientes de FQ en comparación con los sujetos sanos (media \pm DE, FQ 410 \pm 200 U/mL, no fumadores sanos 228 \pm 73 U/mL, fumadores habituales sanos 252 \pm 90 U/mL, $p < 0,0001$, $p < 0,0001$, respectivamente) (Figura 3). En la Figura 3, las barras indican los valores medios y NS significa "no significativo estadísticamente". Tras el ajuste por edad y sexo, las diferencias entre grupos todavía fueron significativas. No hubo diferencia significativa en los niveles de KL-6 sérico entre los no fumadores sanos y los fumadores habituales sanos. La localización de el/los órgano(s) implicado(s), la presencia de infección(es) crónica(s), el uso de terapia de inhalación, el uso de medicación oral y la frecuencia de hospitalización no tuvieron un efecto significativo en los niveles de KL-6 sérico (datos no mostrados).

<Análisis de la Curva de Características Operativas del Receptor (ROC)>

35 El análisis de la curva ROC se usó para estudiar la sensibilidad, especificidad y exactitud del diagnóstico de los niveles de KL-6 sérico, LDH y CRP (Figura 4). En la Figura 4, los círculos oscuros indican KL-6, los cuadrados claros indican LDH y las aspas indican CRP. Se halló el área mas grande bajo la curva (ABC) para KL-6: KL-6, 0,79 (intervalo de confianza (CI) del 95%, 0,71 a 0,86); LDH, 0,62 (CI del 95%, 0,53 a 0,71); CRP, 0,71 (CI del 95%, 0,62 a 0,81). Cuando los niveles umbrales se establecieron como el punto más cercano al 100% de sensibilidad y 100% de especificidad, los niveles fueron de 310 U/mL para KL-6 (sensibilidad, 63%; especificidad, 85%; y exactitud del diagnóstico, 74%, respectivamente), 195 IU/L para LDH (51%; 71%; y 61%, respectivamente), y 0,6 mg/dl para CRP (58%; 95%; y 77%, respectivamente). Las diferencias en el ABC entre KL-6, LDH y CRP fueron significativas (KL-6 y LDH, $p = 0,0005$; KL-6 y CRP, $p = 0,0002$, LDH y CRP, $p = 0,001$).

<Correlación de los Niveles de KL-6 Sérico con las Variables del Ensayo de Función Pulmonar>

Los niveles de KL-6 sérico mostraron una relación inversa con el % VC predicho ($r = -0,37$, $p = 0,001$) (Figura 5), y con el % FEV₁ predicho ($r = -0,35$, $p = 0,003$) (Figura 6). En la Figura 5 y la Figura 6, el valor r indica un coeficiente de correlación, la ecuación indica una ecuación de regresión, y las líneas indican las líneas de regresión. Cuando los 72 pacientes de FQ se clasificaron en dos grupos basándose en los valores de % VC predichos (mayores o iguales al 40%, $n = 59$; menores del 40%, $n = 13$) o % FEV₁ predichos (superiores o iguales al 40%, $n = 40$; menores del 40%, $n = 32$), los pacientes con los VC o FEV₁ menores mostraron niveles significativamente mayores de KL-6 sérico ($p = 0,01$, $p = 0,0009$, respectivamente).

Este estudio es el primero que exploró la utilidad de KL-6 como marcador sérico en pacientes con FQ. Los niveles de KL-6 sérico en los pacientes de FQ se incrementaron significativamente en comparación con los sujetos sanos de control. Tras el ajuste por edad y sexo, la diferencia todavía fue significativa. Los niveles incrementados de KL-6 sérico se correlacionaron con los valores inferiores de FEV₁ y VC. Los niveles de KL-6 sérico en los pacientes de FQ no estuvieron influidos por lesiones extrapulmonares, la presencia de infecciones crónicas o la forma de terapia. De manera interesante, comparado con los marcadores tradicionales de lesión celular o inflamación, tales como LDH y CRP, el KL-6 sérico distinguió mejor los pacientes de FQ y los controles sanos.

Se ha informado previamente que los niveles de KL-6 sérico están incrementados en diversas enfermedades pulmonares intersticiales (por ejemplo, véase *Chest* 1989; 96:68-73, *Thorax* 2003; 58:872-875, *Chest* 1996; 109:1276-1282, y *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1294-1298). La correlación significativa del nivel de KL-6 sérico con los ensayos de la función pulmonar indica que el KL-6 sérico es un marcador no invasivo para determinar el grado de destrucción pulmonar en los pacientes de FQ.

FEV₁ es un factor pronóstico importante en los pacientes de FQ (por ejemplo, véase *N Engl J Med* 1992; 326:1187-1191 y *Thorax* 1997; 52:291-293). Kerem et al. ha demostrado que un FEV₁ <30% predicho estuvo asociado a una tasa de mortalidad del 50% en 2 años (por ejemplo, véase *N Engl J Med* 1992; 326:1187-1191). Milla et al. ha demostrado que el deterioro anual de FEV₁ fue un factor pronóstico de la mortalidad en FQ (por ejemplo, véase *Chest* 1998; 113:1230-1234). Además, los pacientes de FQ con un FEV₁ bajo tienen una probabilidad mayor de experimentar exacerbaciones pulmonares (por ejemplo, véase *Thorax* 2006; 61:969-974). La correlación inversa del KL-6 sérico con el FEV₁ indica la capacidad de KL-6 de establecer la gravedad de la remodelación de las vías respiratorias debida a fibrosis en FQ. Las concentraciones locales de KL-6 en LLBA, esputo o condensado de aire exhalado son también buenos biomarcadores para FQ como los niveles séricos. Además, estos hallazgos se pueden aplicar a niños.

Solamente unos pocos estudios han demostrado que un marcador sérico puede ser útil para predecir el deterioro de la función pulmonar en los pacientes de FQ. McColley et al. ha demostrado que el nivel sérico del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) estuvo incrementado en comparación con los sujetos sanos, y predijo la disminución de FEV₁ (por ejemplo, véase *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1877-1880). Carlsson et al. ha demostrado que un nivel sérico incrementado de autoanticuerpos contra la proteína bactericida/incrementadora de la permeabilidad (BPI-ANCA) predijo una disminución de FEV₁ y un mal pronóstico (por ejemplo, véase *J Cyst Fibros* 2007; 6:228-233). Otros investigadores estudiaron las concentraciones locales de biomarcadores potenciales en pacientes de FQ. Meyer et al. informó que los niveles de elastasa de neutrófilos (EN) activa y los niveles de mieloperoxidasa activa en LLBA se correlacionaron de manera inversa con FEV₁ (por ejemplo, véase *J Lab Clin Med* 1993; 121:654-661). O'Connor et al. demostró que los niveles de EN activa en esputo se correlacionaron con la gravedad de la enfermedad pulmonar; también descubrió que los niveles de inhibidor de α 1-proteínasa (α 1-PI), un inhibidor de EN, estuvieron incrementados en esputo y en plasma en comparación con los sujetos de control (por ejemplo, véase *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:1665-1670).

Además, se ha descubierto que varias citocinas proinflamatorias, que incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1, IL-6 e IL-8 están incrementadas en LLBA o esputo de los pacientes de FQ (por ejemplo, véase *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:2111-2118, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 278:L33-41, y *Eur Respir J* 1999; 14:339-346). Estos marcadores proinflamatorios podrían ser potencialmente útiles para estudiar a los pacientes de FQ. Wolter et al., sin embargo, ha demostrado una divergencia entre la respuesta inflamatoria local y la sistémica (por ejemplo, véase *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:260-265). IL-8 y TNF- α en general fueron indetectables en suero. No se descubrieron correlaciones, o solamente fueron débiles, entre los niveles en suero y esputo de los marcadores proinflamatorios, que incluyen IL-8, TNF- α , α 1-PI y el complejo NE- α 1-PI (por ejemplo, véase *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6:260-265).

La característica histológica predominante del pulmón en la FQ es una inflamación de las vías respiratorias pequeñas con una obstrucción resultante y fibrosis circundante. Se sabe que los niveles de KL-6 sérico se incrementan en diversas enfermedades pulmonares fibróticas (por ejemplo, véase *Chest* 1989; 96:68-73, *Thorax* 2003; 58:872-875, *Chest* 1996; 109:1276-1282, y *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1294-1298). Se cree que el incremento de los niveles de KL-6 sérico en la neumonitis intersticial se debe a una producción incrementada de KL-6 por los neumocitos de tipo II alveolares regenerados, y/o debido a una permeabilidad incrementada tras la destrucción de la barrera alveolo-capilar en los pulmones afectados (por ejemplo, véase *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:637-642 y *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:109-115). La concentración de KL-6 en LLBA se corresponde con el KL-6 sérico en los pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales (por ejemplo, véase *Am Rev Respir Dis* 1993; 148:637-642). Se ha demostrado previamente que la molécula de KL-6 purificada tiene efectos

quimiotácticos, proliferativos y anti-apoptóticos sobre los fibroblastos in vitro, y que los efectos proliferativos y anti-apoptóticos de KL-6 son aditivos a los del factor de crecimiento transformante β (por ejemplo, véase *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338:1845-1852 y *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:501-507). El incremento de KL-6 sérico en los pacientes de FQ es probablemente favorecer una fibrosis acelerada.

- 5 Stahel et al. han demostrado inmunohistoquímicamente que la localización de KL-6 se da en las células epiteliales de los conductos pancreáticos y mamarios, así como en las células epiteliales de tipo II del pulmón (por ejemplo, véase *Int J Cancer, Supl.* 1994; 8:6-26). Sakuma et al. ha demostrado que los niveles de KL-6 sérico disminuyeron en un 36% tras lobectomía, lo que indica que el KL-6 circulante deriva principalmente del pulmón (por ejemplo, véase *Surg Today* 1999; 29:121-128). El presente estudio demostró la ausencia de una correlación significativa entre
- 10 los niveles de KL-6 sérico y la presencia de insuficiencia pancreática o tolerancia a la glucosa, lo que indica que KL-6 es un marcador específico de pulmón en los pacientes de FQ.

El presente estudio es el primero en demostrar la distribución de los niveles de KL-6 sérico en sujetos sanos de raza blanca. En estos sujetos, los niveles de KL-6 sérico son mayores en los hombres que en las mujeres, y muestran una correlación con la edad, mientras que no hubo diferencias entre los fumadores sanos y los no fumadores. Estos

15 hallazgos son compatibles con un estudio previo llevado a cabo en sujetos japoneses (por ejemplo, véase *Jpn J Pathol* 1996; 44:653-658).

En conclusión, se ha demostrado la presencia de niveles de KL-6 sérico incrementados en los pacientes de FQ y una correlación inversa con FEV₁ y VC. Estos hallazgos indican que el KL-6 sérico es un marcador útil para determinar la gravedad de la enfermedad.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para el diagnóstico de la fibrosis quística, y el método comprende:
medir una cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal de un sujeto, y
determinar, basándose en la cantidad de KL-6 medida, la presencia o ausencia de fibrosis quística en el sujeto.
- 5 2. El método según la reivindicación 1, en el que la cantidad de KL-6 se mide mediante un ensayo ELISA o un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia.
3. El método según la reivindicación 1, que comprende además determinar el grado de gravedad de la fibrosis quística en el sujeto basándose en la cantidad de KL-6 medida.
- 10 4. Un método para determinar la eficacia de un tratamiento de fibrosis quística en un sujeto, y el método comprende:
medir una cantidad de KL-6 en una muestra de fluido corporal del sujeto tratado, y
determinar la eficacia del tratamiento en el sujeto basándose en la cantidad de KL-6 medida.

Figura 1

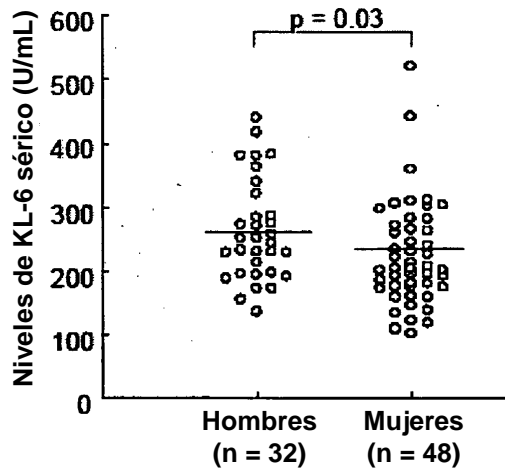


Figura 2

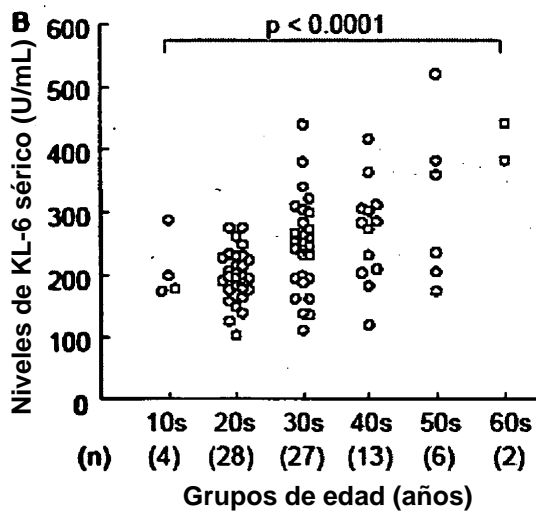


Figura 3

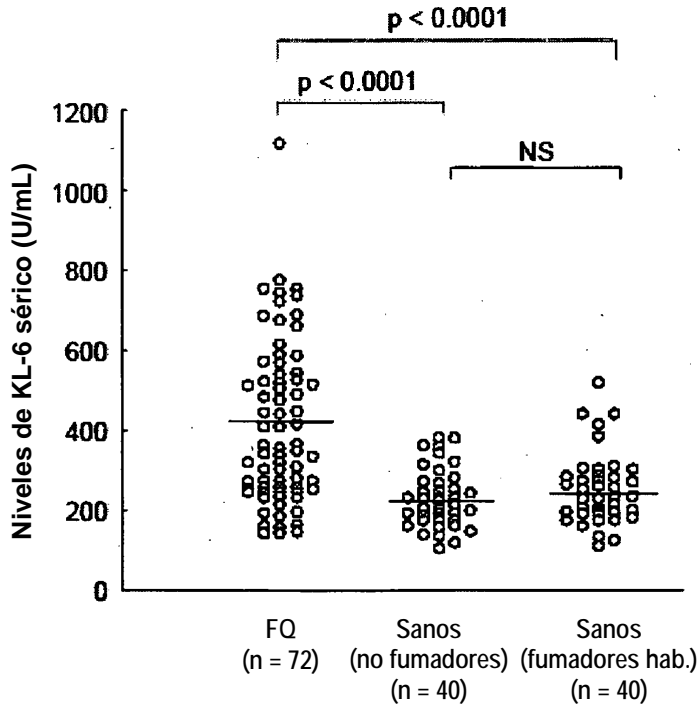


Figura 4

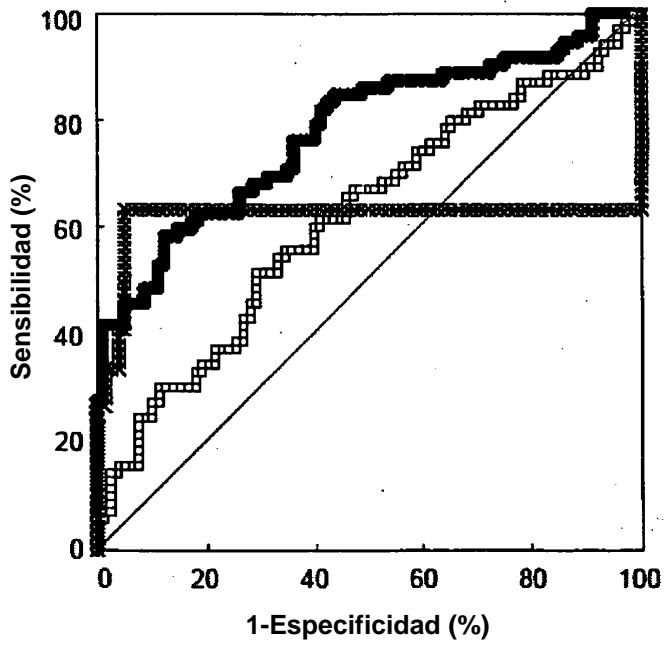


Figura 5

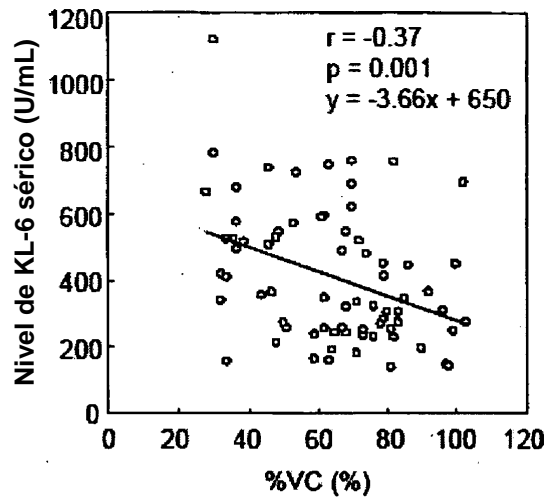


Figura 6

