

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 113**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/EP2012/076296**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13092810**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12806467 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2794912**

54 Título: **Procedimientos relacionados con la fibrosis pulmonar idiopática (FPI)**

30 Prioridad:

21.12.2011 US 201161578339 P

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

20.03.2018

73 Titular/es:

**THE PROVOST, FELLOWS, FOUNDATION
SCHOLARS, & THE OTHER MEMBERS OF
BOARD, OF THE COLLEGE OF THE HOLY &
UNDIV. TRINITY OF QUEEN (100.0%)
College Green
Dublin 2 , IE**

72 Inventor/es:

DONNELLY, SEAMAS

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 660 113 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

Procedimientos relacionados con la fibrosis pulmonar idiopática (FPI)

5 La presente invención se refiere a procedimientos relacionados con la fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar progresiva mortal caracterizada por una inflamación pulmonar persistente. Actualmente no es posible predecir la progresión de la enfermedad para pacientes que presentan FPI. Por tanto, los pacientes con FPI no tienen conocimiento de lo agresiva que será la enfermedad ni
 10 tienen perspectivas de la terapia más apropiada para tratar la enfermedad. Los documentos WO 00/60117 y WO 2011/094345 divulgan SNP (incluyendo variaciones en los genes de MUC5B, IL-1RN y TNF-A) que están asociados a la enfermedad pulmonar intersticial (EPI) y enfermedades pulmonares.

Es un objeto de la invención superar o mitigar los problemas anteriormente mencionados.

15 La invención está basada en el hallazgo de que un subgrupo de pacientes de FPI porta un polimorfismo de nucleótido único (SNP) específico en uno o ambos alelos del gen de receptor de tipo toll 3 (TLR3). El SNP se identifica como C1234T en ARNm de TLR3 humano (referencia del SNP Cluster Report rs 3775291), que da lugar a la sustitución aminoacídica L412F (es decir, la leucina en posición 412 reemplazada por fenilalanina) en la
 20 correspondiente proteína.

La solicitante ha encontrado que los pacientes que portan el polimorfismo C1234T en ambos alelos del gen de TLR3 tienen un fenotipo clínico más agresivo de FPI que los pacientes que portan el polimorfismo C1234T en solo un alelo o los que no portan el polimorfismo C1234T en ningún alelo del gen de TLR3.

25 Puede hacerse referencia a los pacientes que portan el polimorfismo C1234T en ambos alelos como homocigóticos TT (fenotipo Phe/Phe); puede hacerse referencia a los pacientes que portan el polimorfismo C1234T en un alelo como heterocigóticos CT (fenotipo Leu/Phe) y puede hacerse referencia a los pacientes que no portan el polimorfismo C1234T en ningún alelo (es decir, el tipo silvestre) como homocigóticos CC (fenotipo Leu/Leu).

30 La invención proporciona un procedimiento de clasificación de un sujeto que tiene fibrosis pulmonar idiopática (FPI) basándose en el genotipo que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra de un sujeto para ensayar;
- b) determinar a partir de la muestra si el sujeto:

35 i) es homocigótico (Phe/Phe) del gen de TLR3/polimorfismo C1234T/L412F;
 ii) es heterocigótico (Leu/Phe) del gen de TLR3/polimorfismo C1234T/L412F; o
 iii) es homocigótico del alelo C (Leu/Leu) y

40 c) clasificar el sujeto como perteneciente a un fenotipo moderado de FPI o un fenotipo agresivo de FPI basándose en el genotipo determinado en b).

De acuerdo con la invención, un sujeto se clasifica como perteneciente a un fenotipo moderado de FPI basándose en la determinación del sujeto como heterocigótico (Leu/Phe) del polimorfismo de TLR3 (C1234T) L412F o por tener
 45 el gen de TLR3 (Leu/Leu) de tipo silvestre.

De acuerdo con la invención, un sujeto se clasifica como perteneciente a un fenotipo agresivo de FPI basándose en la determinación del sujeto como homocigótico (Phe/Phe) del polimorfismo de TLR3 (C1234T) L412F.

50 La invención proporciona además el uso del polimorfismo C1234T en el gen de TLR3 de un paciente que tiene FPI para clasificar al paciente como perteneciente a un fenotipo moderado de FPI o un fenotipo agresivo de FPI.

El sujeto al que se hace referencia en la presente memoria es preferiblemente humano.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "muestra" pretende significar cualquier fluido o tejido corporal que posibilite determinar el fenotipo del sujeto. Las muestras adecuadas incluyen, pero sin limitación, tejido, células, sangre completa, suero sanguíneo no filtrado o filtrado, saliva y semen. Una muestra preferida comprende tejido pulmonar tal como fibroblastos pulmonares, y especialmente fibroblastos pulmonares humanos primarios.

60 Como se usa en la presente memoria, el término "fenotipo moderado de FPI" se pretende caracterizar por una

esperanza de vida de más de 3 años, opcionalmente más de 4 años, más opcionalmente más de 5 años, desde el diagnóstico de FPI.

Como se usa en la presente memoria, el término “fenotipo agresivo de FPI” se pretende caracterizar por una esperanza de vida de menos de 3 años, opcionalmente menos de 2 años, desde el diagnóstico de FPI.

Es conocido que existe un polimorfismo C1234T en el gen (L412F en la proteína) que codifica el receptor similar a toll 3 (TLR3). Los individuos pueden clasificarse por tener el gen de tipo silvestre (CC correspondiente al fenotipo Leu/Leu) o por ser homocigóticos (TT correspondiente al fenotipo Phe/Phe) del polimorfismo, o por ser heterocigóticos (CT correspondiente al fenotipo Leu/Phe) del polimorfismo.

Los procedimientos para detectar la presencia o ausencia del polimorfismo C1234T en el gen de TLR3 humano son bien conocidos por los especialistas en la materia e incluyen secuenciación de ADN, polimorfismo de conformación monocatenaria, polimorfismo de longitud de fragmento de restricción y análisis de hibridación. La detección del polimorfismo C1234T puede basarse también en el análisis de la proteína TLR3, p.ej., por espectrometría de masas.

Clasificar un sujeto basándose en el genotipo como se describe en la presente memoria proporciona convenientemente información de pronóstico. Por ejemplo, como se describe anteriormente, proporciona información de pronóstico tal como si un sujeto pertenece a un fenotipo moderado de FPI o a un fenotipo agresivo de FPI. Basándose en tal información de pronóstico, se proporciona convenientemente también cierta información predictiva tal como poder predecir o prever cualquier aspecto del curso o progresión de la FPI, tanto en ausencia como en presencia de tratamiento. Los ejemplos de información predictiva incluyen, p.ej., la esperanza de vida media de un sujeto que tiene FPI y/o la probabilidad de que un sujeto responda a un tratamiento o terapia particular. Por lo tanto, al proporcionar un procedimiento fiable de clasificación de pacientes con FPI de acuerdo con su genotipo, los pacientes pueden proporcionarse con una previsión precisa de su progresión de la enfermedad, y pueden guiarse a la terapia más apropiada basándose en la progresión de la enfermedad esperada.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención, pero se apreciará que la invención no está limitada a estos ejemplos.

30 EJEMPLO 1

Estudios genéticos humanos en FPI

35 Se cribó en una colección de ADN de FPI del Reino Unido (n= 157) la prevalencia del polimorfismo de TLR3 específico (L412F). La cohorte de ADN de FPI de RU provenía de la Universidad de Sheffield (n= 66) y de la Universidad de Edimburgo (n= 91) y la prevalencia de homocigóticos era del 12,1 %. Había números significativamente mayores de homocigóticos en la cohorte de FPI en comparación con la población de control (P< 0,05, cociente de posibilidades: 2,79). Los resultados se muestran en la Tabla 1.

40 La cohorte de Edimburgo es una colección en curso donde el seguimiento máximo es de hasta 2,5 años. Los datos de mortalidad total no están todavía disponibles. La colección de la Universidad de Sheffield es de hace 11 años y se han recogido los datos de mortalidad total para todos los pacientes. Se encontró que las medias en meses desde el diagnóstico hasta la muerte para cada subtipo genético eran:

45

Tipo silvestre:	46,4 meses +/- 5,5,
Heterocigótico:	52,8 meses +/- 11,8,
Homocigótico:	20,6 meses +/- 7,6.

Se ilustra la media en meses desde el diagnóstico hasta la muerte para cada subgrupo genético en la Fig. 1.

50 **Tabla 1. Frecuencias del polimorfismo L412F de TLR3 en la cohorte de FPI de RU[†]: Estudio de casos y controles.**

Estado	Leu/Leu	Leu/Phe	Phe/Phe
Controles de RU (n= 158)	75 (0,47)	74 (0,47)	9 (0,06)
Casos de FPI en RU (n= 157)	87 (0,55)	51 (0,33)	19 (0,12)
Valores de P			
Genotipo (usando la prueba de chi cuadrado para independencia)			0,013 ^a
Tendencia (usando la prueba de chi cuadrado para tendencia)			0,833

Alelo (usando la prueba exacta de Fisher)		0,860
Cálculo del cociente de posibilidades (IC del 95 %) usando la prueba exacta de Fisher		
Portador de Phe	Valor de P: 0,176	0,720 (0,466 - -1,133)
Homocigótico Phe/Phe	Valor de P: 0,049	2,279 (0,997 - 5,209)

† Fibrosis pulmonar idiopática diagnosticada según: International Consensus Guidelines. American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS) y la European Respiratory Society (ERS). Am J Respir Crit Care Med, 2000 161(2 Pt 1). pág. 646-64.

EJEMPLO 2

5 Trabajo celular in vitro en FPI

Los inventores construyeron un biorrepositorio de fibroblastos pulmonares humanos primarios derivados de pacientes con FPI. Con relación a las células derivadas de pacientes de FPI, se cribó en las células el polimorfismo de TLR3 específico (L412F). Se compararon entonces las células homocigóticas (n= 2 donantes) como las células de tipo silvestre (n= 2 donantes) derivadas de pacientes de FPI y una línea celular de fibroblastos pulmonares humanos derivada de la ATCC (CC19Lu) después de estimulación con Poli(I:C). Se anotaron los resultados, particularmente con respecto a las lecturas de:

- a) la ruta de IRF3 (producción de Rantes), y
- b) la ruta de NFkB (producción de IL-8).

Se muestran los resultados en las Fig. 2 y 3. Se determinó que las células homocigóticas defectivas (Phe/Phe) tienen una respuesta de IRF3 e IL-8 suavizada en comparación con los fibroblastos de FPI de tipo silvestre (Leu/Leu) y los fibroblastos normales (CCD).

EJEMPLO 3

Datos in vivo en el modelo de bleomicina de FPI

Se practicaron experimentos usando el modelo de fibrosis pulmonar por bleomicina en murino tanto en un fondo con desactivación génica de TLR3 como de tipo silvestre. Los experimentos en ratones TLR3^{-/-} exhibían una fibrosis pulmonar significativamente potenciada como se manifestaba por la potenciación de IL-13, TGFB e hidroxiprolina en homogeneizados pulmonares. Se muestran los resultados en la Fig. 4, de la que puede observarse lo siguiente:

Los ratones TLR3^{-/-} experimentan una producción de IL-13, TGF-β y colágeno pulmonares aumentada en comparación con los ratones TLR3^{+/+} el día 21 (D21) después de la aplicación de bleomicina en comparación con los ratones TLR3^{-/-} a D21 en comparación con el día 0 (D0) después de la aplicación de bleomicina, como se cuantificó por ELISA. El TGF-β aumentaba significativamente en homogeneizados pulmonares a D21 después de la aplicación de bleomicina en ratones TLR3^{-/-} en comparación con ratones TLR3^{+/+}. Los niveles de hidroxiprolina aumentaban significativamente en homogeneizados de pulmón entero a D21 después de la aplicación de bleomicina en ratones TLR3^{-/-}, pero no en ratones TLR3^{+/+}. (**P < 0,01, ***P < 0,001: D21 TLR3^{-/-} en comparación con ratones D0 TLR3^{-/-}. +p<0,05: D21 TLR3^{-/-} en comparación con ratones D21 TLR3^{+/+}. *p< 0,05: D21 TLR3^{+/+} en comparación con ratones de D0).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de clasificación de un sujeto que tiene fibrosis pulmonar idiopática (FPI) basado en el genotipo que comprende las etapas de:
- 5
- a) determinar a partir de una muestra de un sujeto para ensayar si el sujeto:
- i) es homocigótico (Phe/Phe) del polimorfismo C1234T/L412F del gen de TLR3;
- ii) es heterocigótico (Leu/Phe) del polimorfismo C1234T/L412F del gen de TLR3; o
- 10 iii) es homocigótico del alelo C (Leu/leu) y
- b) clasificar el sujeto por tener un fenotipo moderado de FPI si el sujeto es heterocigótico del polimorfismo C1234T/L412F del gen de TLR3, o si el sujeto es homocigótico del alelo C;
- y clasificar el sujeto por tener un fenotipo agresivo de FPI si el sujeto es homocigótico del polimorfismo
- 15 C1234T/L412F del gen de TLR3.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, donde la etapa a) se lleva a cabo detectando la presencia o ausencia de la sustitución aminoacídica L412F en la proteína TLR3.
- 20 3. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde la muestra para ensayar comprende fibroblastos pulmonares primarios humanos.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, donde el sujeto es humano.
- 25 5. Uso del polimorfismo C1234T/L412F en el gen de TLR3 para clasificar a un paciente que tiene FPI como perteneciente a un fenotipo moderado de FPI o un fenotipo agresivo de FPI, donde el paciente se clasifica como perteneciente a un fenotipo moderado de FPI si es heterocigótico (Leu/Phe) del polimorfismo C1234T/L412F del gen de TLR3 o si es homocigótico del alelo C y donde el paciente se clasifica como perteneciente a un fenotipo agresivo de FPI basándose en la determinación de si el paciente es homocigótico (Phe/Phe) del polimorfismo
- 30 C1234T/L412F del gen de TLR3.

Meses desde el diagnóstico hasta la muerte. 04-04-11

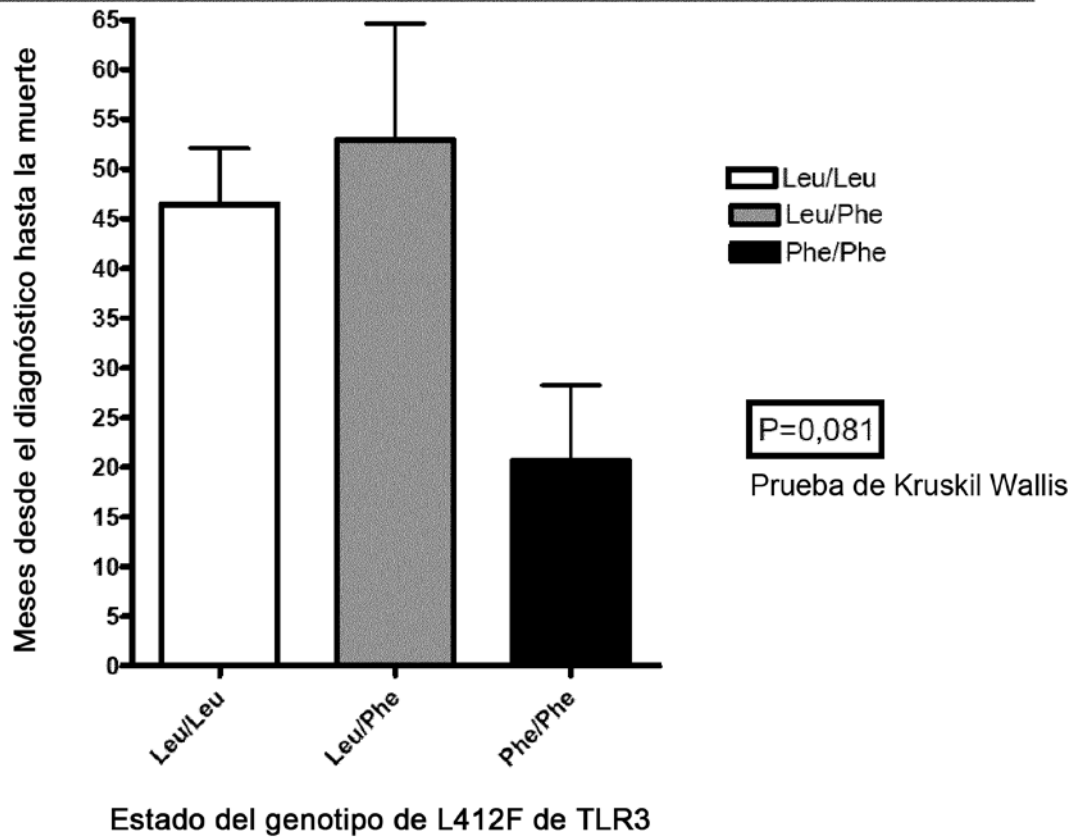


Fig. 1

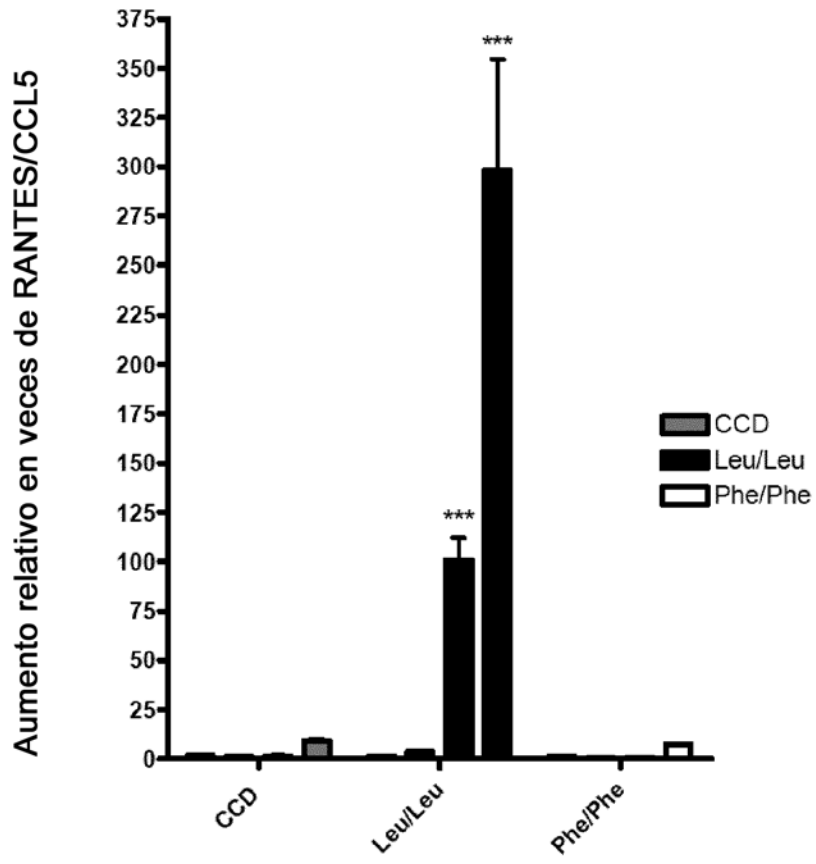


Fig. 2

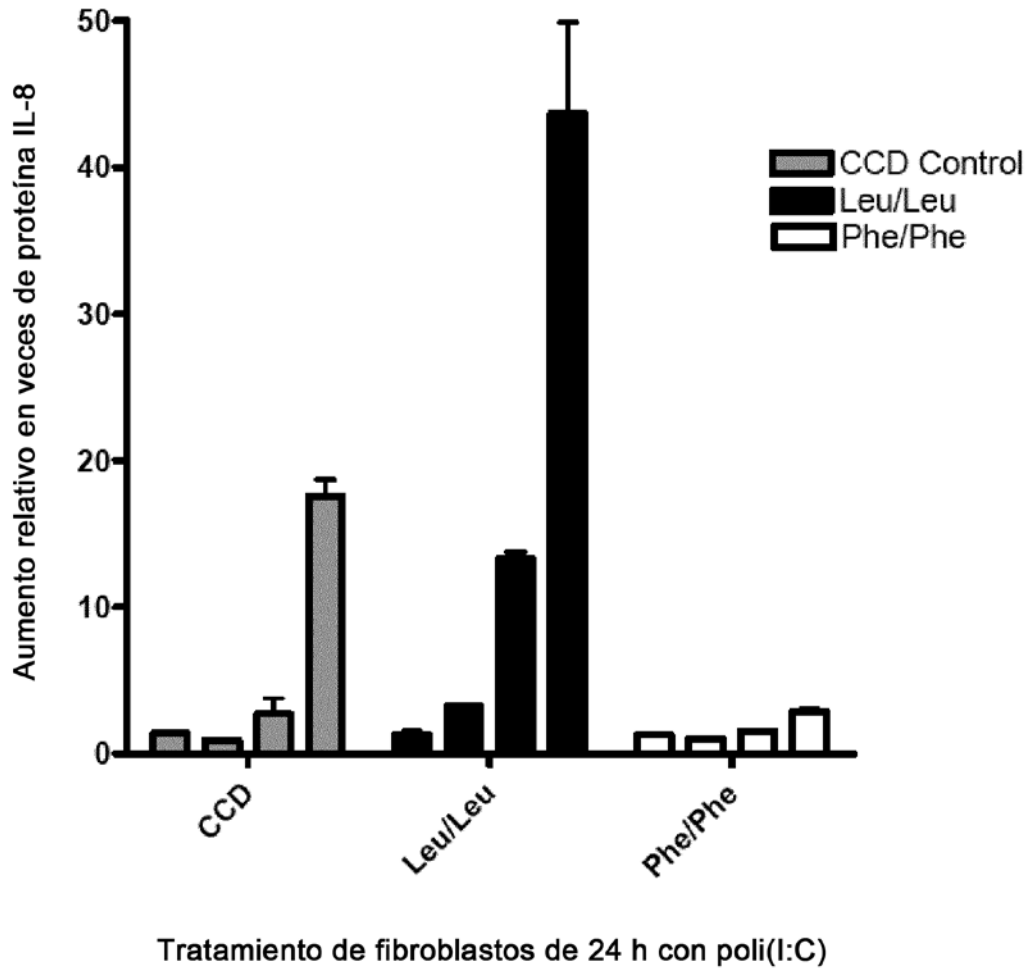


Fig. 3

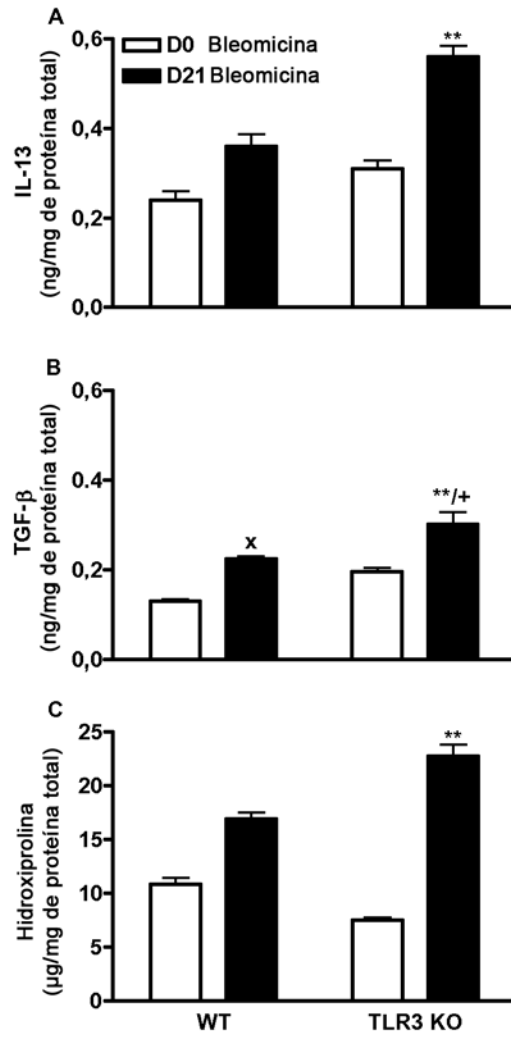


Fig. 4