

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 783 859**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2016 PCT/IB2016/054423**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017 WO17021814**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2016 E 16832386 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2020 EP 3329019**

54 Título: **Uso de IL-3, IL-33, e IL-12P40 para caracterización de las infecciones respiratorias por Virus Respiratorio Sincitial**

30 Prioridad:

31.07.2015 CL 201502153

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

18.09.2020

73 Titular/es:

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE (100.0%)

**Avenida Libertador Bernardo O'Higgins 340
8331150 Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**KALERGIS PARRA, ALEXIS MIKES;
BUENO RAMIREZ, SUSAN MARCELA;
BERTRAND NAVARRETE, JOSÉ PABLO y
LAY REMOLCOI, MARGARITA KAM-LEM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 783 859 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

Uso de IL-3, IL-33, e IL-12P40 para caracterización de las infecciones respiratorias por Virus Respiratorio Sincicial

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con el uso de marcadores moleculares como herramienta de detección de la evolución de cuadros de infección respiratoria. Concretamente durante el diagnóstico diferencial de infecciones respiratorias causadas por los Virus Respiratorio Sincicial (VRS) y Metapneumovirus humano (hMPV).

Específicamente en la presente invención se describe el uso de los marcadores IL-3, IL-12p40 e IL-33, para la predicción de ocurrencia de cuadros respiratorios recurrentes como consecuencia de la bronquiolitis causada por VRS.

Técnica anterior

10 El Virus Respiratorio Sincicial (VRS) es la causa más prevalente de infección del tracto respiratorio y la primera causa de hospitalización debido a infección aguda del tracto respiratorio inferior en infantes. La bronquiolitis por VRS se ha relacionado con asma y sibilancias recurrentes, sin embargo, los mecanismos responsables de esta asociación no han sido elucidados.

15 El VRS es un virus envuelto que pertenece a la familia *Paramyxoviridae* y es uno de los agentes etiológicos más prevalentes de infecciones agudas del tracto respiratorio, causando una gran carga en los sistemas públicos de salud.

20 El VRS causa enfermedad en el tracto respiratorio inferior en pacientes de todas las edades, siendo la infección más severa en infantes menores a 6 meses de edad y especialmente en aquellos que presentan enfermedades crónicas o de base. Muchos infantes que sufren de bronquiolitis por VRS durante sus primeros meses de vida desarrollan sibilancia recurrente y asma, pero los mecanismos específicos involucrados en la inmunopatogénesis de bronquiolitis por VRS aún están pobremente definidos. Más aún, los parámetros clínicos actuales no permiten predecir la posibilidad de sufrir alguna de estas enfermedades crónicas posteriormente en la vida de los infantes, una vez que han sufrido de bronquiolitis por VRS.

25 La inflamación causada por este virus se caracteriza por la presencia de una infiltración celular masiva, mayormente neutrófilos, en el tracto respiratorio inferior. Tales alteraciones en los pulmones han sido descritas como una consecuencia de la infección por VRS en células epiteliales de la vía aérea, macrófagos alveolares y neutrófilos de sangre periférica, que inducen secreción de citoquinas y quimioquinas específicas. Estas moléculas muestran propiedades quimiotácticas sobre células inflamatorias y otros tipos de células. Un desbalance de citoquinas de tipo Th1/Th2 también ha sido propuesto como un evento clave en la inflamación con reclutamiento celular, causado por la infección con VRS, que podría estar mediado por eosinófilos y otras células relacionadas con la inducción de la alergia, tales como basófilos y mastocitos que pueden contribuir al desarrollo de asma. Más aún, se sabe que algunas citoquinas producidas por las células del epitelio de las vías aéreas, están directamente involucradas en la inducción de alergia y asma, incluyendo IL-25, IL-33 y linfopoyetina estromal tímica (TSLP).

30 En la técnica anterior se encuentran algunos documentos que hacen referencia al uso de marcadores como herramienta de diagnóstico diferencial de enfermedades respiratorias, entre los cuales se encuentra:

35 La solicitud de patente WO2012169887A2 se relaciona con un método de predicción de la severidad del VRS, sin embargo este documento trabaja con los marcadores OLFM4, CD177, MMP8, MMP9, PTX3, IL-8, RANTES y CD4 y una combinación de ellos, sin mencionar el uso de los marcadores IL-3, IL-12p40, e IL-33. No es deducible de este documento que las citoquinas IL-33, IL12p40 o IL-3 iban a tener una relación en los pacientes que manifestaron sibilancias recurrentes o la posibilidad de desarrollar asma en el futuro tras la infección con el VRS.

40 El documento EP1867734A1 describe el uso de marcadores moleculares para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Sin embargo, las enfermedades hacia las que está dirigido son de tipo cerebrovascular, y no hace ninguna referencia a marcadores para diagnóstico de enfermedades respiratorias.

45 Solamente unos pocos estudios han analizado las regiones superiores e inferiores del tracto respiratorio durante una bronquiolitis por VRS en infantes. El objetivo de la presente invención es divulgar el uso de las citoquinas IL-3, IL-12p40 e IL-33, los marcadores moleculares para predecir la ocurrencia de sibilancia recurrente en el futuro (IL-3 e IL12p40) o posible desarrollo de asma (IL-33), en etapas posteriores de la vida de estos infantes, debido a una bronquiolitis producida por la infección con VRS.

Descripción de las figuras

50 Figura 1. La Figura 1 muestra el patrón de producción de citoquinas y quimioquinas en fluidos de lavado broncoalveolares (BALF, en inglés) de pacientes infectados con VRS comparados a los controles. La concentración de citoquinas y quimioquinas fue determinada en el BALF de infantes con bronquiolitis por VRS y de infantes saludables como control, analizada por Luminex. La concentración de citoquinas y quimioquinas están expresadas en pg/ml y agrupadas de acuerdo a su mediana y rango intercuartil para su comparación. La significancia de bronquiolitis por VRS (N=14) comparada con infantes saludables controles (N=5) fue determinada por el test no paramétrico U de

Mann-Whitney (**P*-value < 0,05 fue considerado como estadísticamente significativo). La producción de IL-3, IL-4, IL-10 e IL-13 (a), IL-1 β, IL-6, IL-7 e TNF-β (b), las quimioquinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP 1 α, Eotaxin e IL-8 (c) e IL-12p40, IL-12p70, IFN-γ e IL-17 (d) fueron analizadas en muestras BALF.

5 Figura 2. La Figura 2 muestra el patrón de producción de citoquinas y quimioquinas en muestras de aspirado nasofaríngeo (NPA) de pacientes infectados con VRS, comparado con individuos controles. La expresión de mediadores en NPAs de infantes con bronquiolitis por VRS (N=14) fue comparado a infantes controles (N=5) por cuantificación relativa (RQ), usando sondas TaqMan en un RT-PCR cuantitativo. Las sondas específicas TaqMan fueron usadas para amplificar las citoquinas IL-1α, IL-1β, TNFα, IL-6 e IL-8 (a); las quimioquinas CXCL10, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α, y CCL4/MIP-1β (b). Las concentraciones relativas de los mediadores están expresadas como veces de aumento en relación a la inducción relativa de los controles. Se muestran los valores de sus medianas e intercuartiles como barra horizontal y rectángulos, respectivamente (se consideró un **P*-value < 0,05 como estadísticamente significativo).

15 Figura 3. La Figura 3 muestra la producción de citoquinas y quimioquinas en muestras BALF de infantes con bronquiolitis por VRS de acuerdo al desarrollo de asma en el período de seguimiento. Las concentraciones de citoquinas y quimioquinas: Eotaxin, IL-3, IL-5, TNF-β (a) e IL-12p40, IL-12p70 e IL-7 (b), detectadas por Luminex en las muestras BALF de infantes con bronquiolitis causada por VRS (N=14), fueron analizadas de acuerdo al desarrollo de asma en el período de seguimiento. La concentración de mediadores está expresada en pg/ml y los valores de sus medianas e intercuartiles se muestran como barras horizontales y rectángulos, respectivamente (se consideró un **P*-value < 0,05 como estadísticamente significativo).

20 Figura 4. La figura 4 muestra la cuantificación relativa de inducción del ARN mensajero de IL-33 en aspirado nasofaríngeo de infantes con bronquiolitis por VRS, analizado de acuerdo a historial familiar de atopia. La expresión génica de IL-33 fue determinada en aspirado nasofaríngeo de infantes con bronquiolitis por VRS (N=14) con o sin historial familiar de atopia. Los resultados se muestran como veces de aumento en inducción relativa a los controles. Los valores de las medianas e intercuartiles, de cada grupo, se muestran como barras horizontales y rectángulos, respectivamente (se consideró un **P*-value < 0,05 como estadísticamente significativo).

25 Figura 5. La figura 5 muestra la correlación entre IL-12p40 e IL-3 en muestras BALF de pacientes infectados con VRS con el número de episodios de sibilancia recurrente. Se estableció una correlación de Pearson entre IL-12p40 (a) o IL-3 (b) y episodios de sibilancia recurrente en muestras BALF de infantes con VRS (14). Los resultados se expresan como pg/ml para citoquinas y número de episodios durante el período de seguimiento (se consideró un **P*-value < 0,05 como estadísticamente significativo).

Descripción de la invención.

35 La presente invención describe el uso de los marcadores moleculares IL-3, IL-12p40, e IL-33 para predecir y distinguir individuos que pueden sufrir sibilancias recurrentes (IL-3, IL-12p40) y posible desarrollo de asma (IL-33), en etapas posteriores de la vida de estos infantes tras la bronquiolitis causada por VRS, específicamente en pacientes menores de 12 meses de vida.

El método para predecir y distinguir individuos que pueden sufrir sibilancias recurrentes y asma después de una bronquiolitis causada por el virus sincitial respiratorio (VSR) consiste en:

- amplificar y detectar utilizando un procedimiento de biología molecular tal como PCR y ELISA, utilizando los marcadores IL-3, IL-12p40 e IL-33;
- 40 - cuantificar la sobreexpresión de la secuencia diana complementaria a los marcadores IL-3, IL-33 e IL-12p40;
- correlacionar con base a la cuantificación de la sobreexpresión obtenida, el desarrollo de la enfermedad causada por VRS: Alta probabilidad de desarrollar sibilancias si se encuentra una concentración mayor de 500pg/ml de IL-12p40 o IL-3 en lavados broncoalveolares; alta probabilidad de desarrollar asma si se encuentra una concentración mayor de 500pg/ml de IL-33 en lavados broncoalveolares.

45 Ejemplo

Infantes previamente saludables menores de 12 meses de edad, hospitalizados debido a bronquiolitis viral, fueron registrados en el estudio. Para calificar en el registro, los pacientes debían ser positivos por inmunofluorescencia para VRS y ser menores de 12 meses, sin factores de riesgo de enfermedades severas y con una evolución durante su primera semana desde una enfermedad leve a moderada, definido por una puntuación clínica. Los infantes con condiciones médicas crónicas o que recibieron corticoesteroides al momento de registro fueron excluidos del estudio. Durante el mismo período de tiempo se registraron infantes normales que fueron sometidos a un procedimiento invasivo por una enfermedad no infecciosa (hernia inguinal=4, y fístula tiroglosal=1). Muestras de estos últimos fueron usados como control.

55 Se evaluó los perfiles de citoquina y quimioquina en las vías aéreas superiores e inferiores en los infantes afectados por bronquiolitis por infección de VRS. Además, el resultado clínico fue considerado durante un período de seguimiento

de tres años. Los aspirados nasofaríngeos y los BALF de infantes hospitalizados, debido a bronquiolitis por VRS y controles saludables, fueron colectados y analizados para la detección de citoquinas y quimioquinas por Luminex y RT-PCR en tiempo real cuantitativo. Como resultado, se observaron niveles elevados de citoquinas de tipo Th2 (IL-3, IL-4, IL-10 y IL-13), citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas (IL-1 β , IL-6, TNF- β , MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3 y IL-8) en BALF de infantes con bronquiolitis por VRS, comparado a los controles. Se identificó que aquellos pacientes que presentaron una historia familiar de atopía produjeron mayores niveles de IL-33 que aquellos pacientes que no tenían este antecedente familiar (Figura 4). Extraordinariamente, se encontró una correlación directa de los niveles de IL-3 e IL-12p40 en infantes infectados con VRS con el desarrollo de sibilancia recurrente, posteriormente en su vida. De hecho, una correlación directa significativa se encontró entre los niveles de IL-12p40 e IL-3 en las muestras BALF de pacientes infectados con VRS con el número de sibilancia recurrente, durante el período de seguimiento (correlación de Pearson: $r = 0,68$; $p=0,0071$; $r = 0,71$; $p=0,0058$, respectivamente) (Figura 5). Estos resultados sugieren que IL-3 e IL-12p40 son predictores moleculares para sibilancia recurrente, en infantes con bronquiolitis causado por VRS.

Catorce pacientes con bronquiolitis por VRS y cinco controles fueron enrolados. Los infantes con bronquiolitis por VRS fueron admitidos al hospital por un periodo de 4,5 días como promedio (rango: 1-9 días), con una mediana del puntaje de severidad equivalente a 4. Todos los pacientes fueron capaces de dejar la terapia con oxígeno en los primeros dos días, antes de que el procedimiento fuera realizado. No presentaron complicaciones debido al procedimiento y fueron dados de alta en buenas condiciones. Todos los pacientes fueron monitoreados por tres años, sin reportes de admisión hospitalaria debido a otras causas. Un paciente en el grupo control no pudo seguir siendo monitoreado después de 24 meses. Las variables clínicas evaluadas fueron: sibilancias recurrentes reportadas por un médico, diagnóstico de asma reportado por un médico y uso crónico de terapia con corticosteroides, características que no mostraron diferencias significativas entre ambos grupos durante el seguimiento clínico. Las características clínicas se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 Características clínicas de los pacientes registrados

| | RSV (n=14) | Controles (n=5) |
|---------------------------------|------------|-----------------|
| Edad (rango) meses | 2,2 (0-9) | 2,8 (1-6) |
| Género: masculino/femenino | 06-8 | 3-2 |
| Atopía parental | 7-14 | 2-5 |
| Puntaje clínico (rango) | 4 (1-7) | - |
| Estadía en hospital (rango) | 4,5 (1-9) | - |
| Sibilancia recurrente | 4-14 | 2-5 |
| Asma | 3-14 | 1-5 |
| Terapia con corticosteroides | 6-14 | 1-5 |

25 Producción de citoquinas y quimioquinas en muestras de BALF de infantes con bronquiolitis con VRS

Los niveles de concentración de proteína de citoquinas y quimioquinas en muestras BALF de infantes con bronquiolitis por VRS, comparado con aquellos en infantes control fueron medidos por Luminex. Se observaron niveles elevados de IL-3, IL-4, IL-10, IL-13 (citoquinas relacionadas a 5 Th2); IL-1 β , IL-6, TNF- β (citoquinas proinflamatorias); MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, IL-8 (quimioquinas); IL-12p40 (citoquinas relacionadas a Th1); e IL-7 (factores de crecimiento) en muestras BALF de infantes con bronquiolitis por VRS comparado a controles. Además, se encontraron niveles significativamente reducidos de Eotaxin (quimioquina) e IL-12p70 en muestras BALF de infantes con bronquiolitis por VRS comparado con infantes control. La producción de IFN- γ (citoquina relacionada a Th1) e IL-17 (citoquina relacionada a Th17) no fueron detectados en BALF, ya sea del paciente infectado o del control sano (Figura 1).

Se observaron niveles elevados significativos de IL-12p40, IL-12p70 (citoquinas relacionadas a Th1), IL-3, IL-5 (citoquinas relacionadas a Th2), TNF- β (citoquina proinflamatoria), Eotaxin (quimioquina) e IL-7 (factor de crecimiento) en muestras de BALF de pacientes infectados con VRS, que desarrollaron asma en el período de seguimiento, comparado con pacientes que no lo desarrollaron (Figura 3). Más aún, un aumento significativo de ARN mensajero de IL-33, normalizado a GAPDH, se observó en aspirado nasofaríngeo de pacientes infectados con VRS que tenían un historial familiar de atopía, comparado con pacientes que no lo tenían (Figura 4).

REIVINDICACIONES

1. Uso de marcadores moleculares IL-3, IL-12p40 e IL-33, para predecir y distinguir individuos que pueden sufrir sibilancias recurrentes y asma después de una bronquiolitis causada por el Virus Sincitial Respiratorio (VSR).
- 5 2. Un método que involucra los marcadores IL-3, IL-12p40 e IL-33 para predecir y distinguir individuos que pueden sufrir sibilancias recurrentes y asma después de una bronquiolitis causada por el Virus Sincitial respiratorio (RSV), en el que el método consiste en:
 - amplificar y detectar utilizando un procedimiento de biología molecular tal como PCR y ELISA, utilizando los marcadores IL-3, IL-12p40 e IL-33;
 - cuantificar la sobreexpresión de la secuencia diana complementaria a los marcadores IL-3, IL-33 e IL-12p40;
- 10 - correlacionar con base en la cuantificación de la sobreexpresión obtenida, el desarrollo de la enfermedad causada por VSR: alta probabilidad de desarrollar sibilancias si se encuentra una concentración mayor de 500 pg/ml de IL-12p40 o IL-3 en lavados broncoalveolares; alta probabilidad de desarrollar asma si se encuentra una concentración mayor de 500 pg/ml de IL-33 en lavados broncoalveolares.

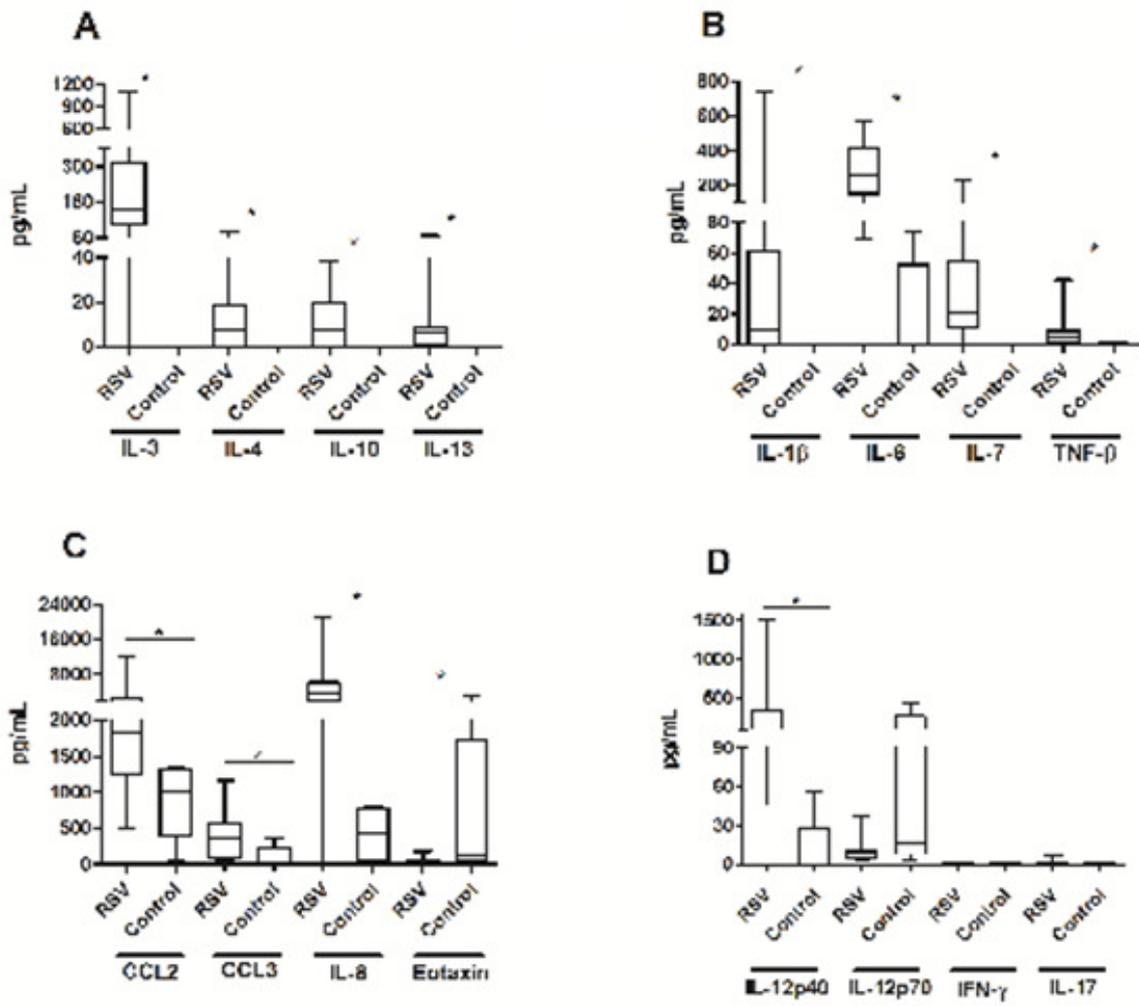


Fig 1

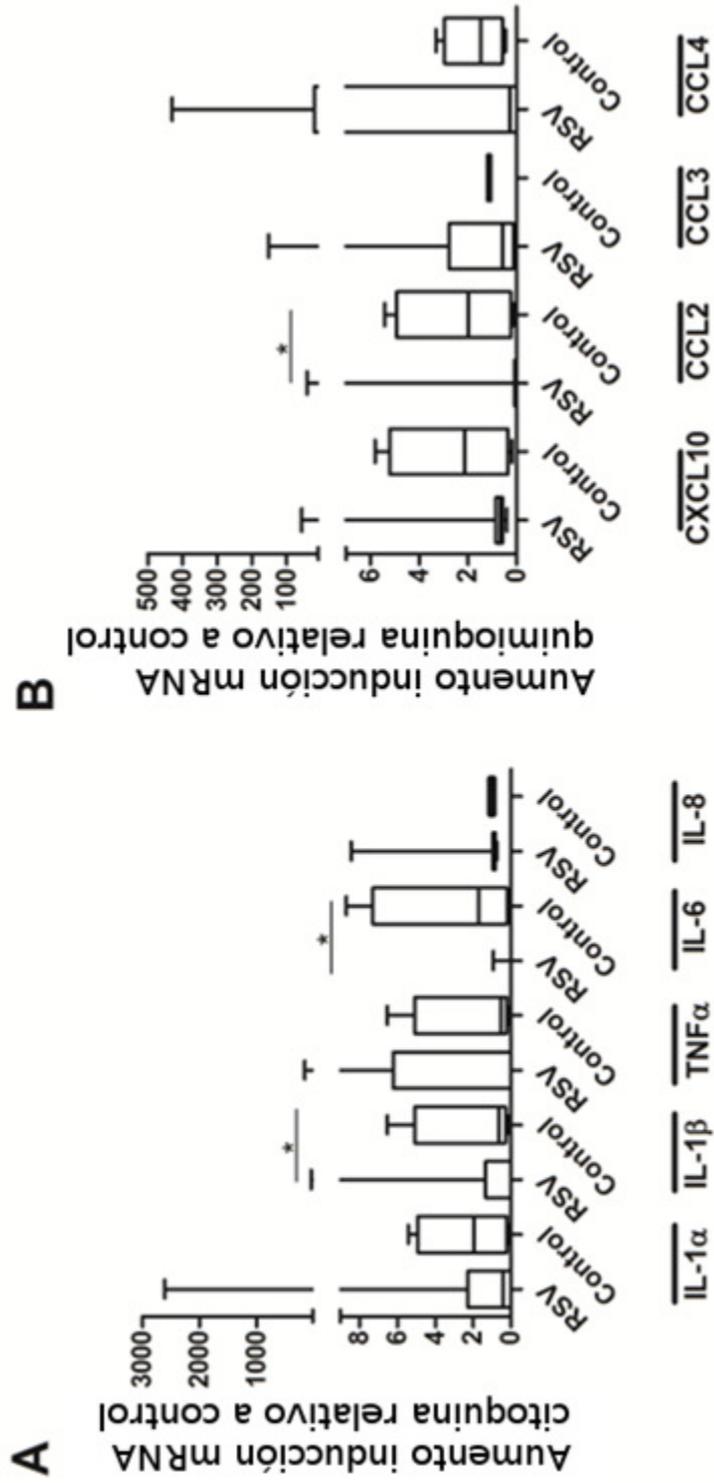


Fig 2

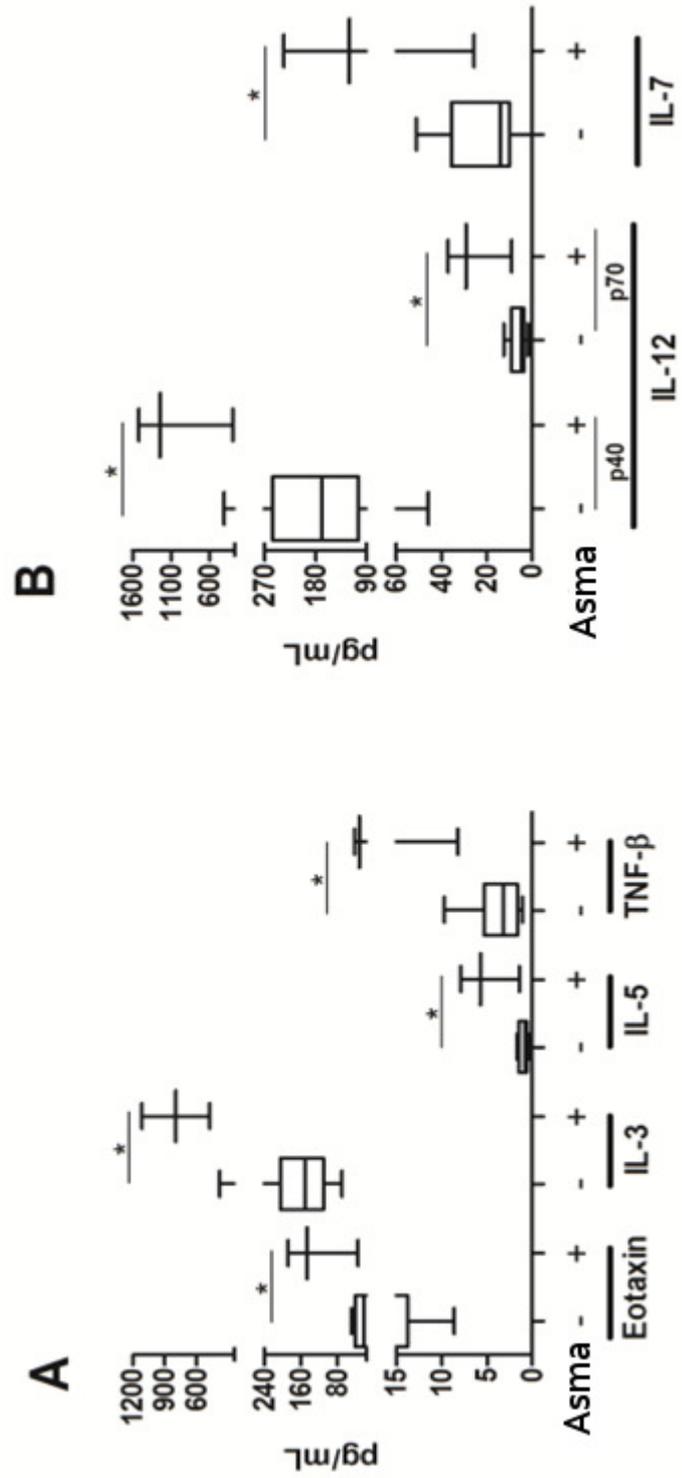


Fig 3

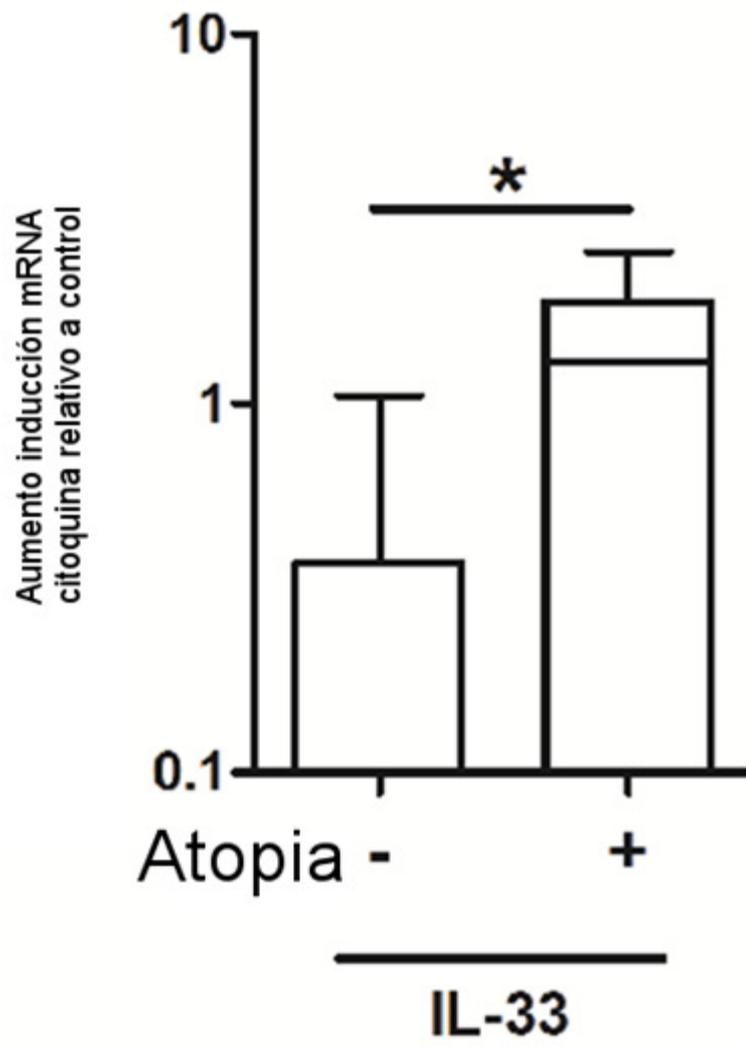


Fig 4

