

No. 13-301122-00000-0000

Fecha: 2013-12-27 13:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 152

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: ENSAYO DE LISILOXIDASA-HOMÓLOGO 2 Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL

71. SOLICITANTE: GILEAD BIOLOGICS, INC.

DOMICILIO: California, Estados Unidos de América.

74. APODERADO SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-301122- -00000-0000 Fecha: 2013-12-27 13:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 152	
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT			
1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☒ Capítulo I ☐ Capítulo II	
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/040585	Fecha 01 de Junio de 2012
Publicación Internacional No.		WO 2012/167181 A1	Fecha 06 de diciembre de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCION (200 caracteres o espacios máximos)		
ENSAYO DE LISILOXIDASA-HOMÓLOGO 2 Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C07K 16/40		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL GILEAD BIOLOGICS, INC		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 333 Lakeside Drive Foster City, No. TELÉFONO: CIUDAD: California 94404, CORREO ELECTRONICO: PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América			
7	INVENTOR (ES) VER HOJA INFORMACION COMPLEMENTARIA		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO PAÍS RESIDENCIA
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS LÓPEZ DÍAZ		NOMBRES SILVANA MARIA	IDENTIFICACIÓN C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO	notificaciones@clarkemodet.com.co.
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO (32) FECHA AAA/MM/DD
1.Estados Unidos de América		US	61/492.210 2011/06/01
2. Estados Unidos de América		US	61/550.895 2011/10/24
3. Estados Unidos de América		US	61/578.813 2011/12/21

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 13-129174// 13-	Fecha 13/12/2013 27/12/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción Nº de folios:		9. ☐ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones Nº Reivindicaciones:		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. Regla 4.17	
3. ☐ Dibujos y/o figuras Nº folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

ANEXO INVENTORES

- 1.) **SMITH, Victoria.**
(C/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América);
- 2.) **ADAMKEWICZ, Joanne, I**
(C/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América);
- 3.) **LYMAN, Susan, K**
(C/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América);
- 4.) **CHIEN, Jason**
(C/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América);
- 5.) **LI, Xiaoming**
(C/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América);
- 6.) **SHAO, Lixin**
(c/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América);
- 7.) **BORNSTEIN, Jeffrey, D.**
(C/o Gilead Sciences, Inc. 333 Lakeside Drive Foster City, California 94404, Estados Unidos de América);

ENSAYO DE LISILOXIDASA-HOMÓLOGO 2 Y MÉTODOS DE USO DEL MISMO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos N ° 61/492,210, presentada el 01 de junio de 2011, y la aplicación provisional de los Estados Unidos N° 61/550,895, presentada el 24 de octubre del 2011, y los Estados Unidos la aplicación provisional N ° 61/578, 813, presentada el 21 de diciembre de 2011, cuyas descripciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad a todos los efectos.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADAS A TRAVÉS DE EFS-WEB

[0002] Todo el contenido de la siguiente presentación electrónica del listado de secuencias a través del servidor USPTO EFI-WEB, según lo autorizado y establecido en MPEP § 1730 II.B.2 (a) (C), se incorpora al presente por referencia en su totalidad para todos los propósitos. El listado de la secuencia se identifica en el archivo de texto presentado electrónicamente de la siguiente manera:

<u>Nombre del archivo</u>	<u>Fecha de Creación</u>	<u>Tamaño (bytes)</u>
246102008340Seqlist.txt	1 de Junio, 2012	25,654 bytes

ANTECEDENTES

[0003] La lisil oxidasa-homólogo 2 (LOXL2) una proteína de la matriz extracelular. Poca LOXL2 extracelular se observa en tejidos adultos sanos, pero su expresión se induce en una variedad de enfermedades fibróticas y tumores. Es secretada por fibroblastos activados, células de músculo liso asociadas a la enfermedad, células endoteliales, y epitelios.

RESUMEN

[0004] La presente descripción se refiere a la detección de la lisil oxidasa-homólogo 2 (LOXL2), por ejemplo, polipéptidos LOXL2, y su uso en métodos de diagnóstico, pronóstico, y predictivos. Por ejemplo, los proporcionados son ensayos

para detectar y/o cuantificar LOXL2, tales como los ensayos para detectar y/o cuantificar polipéptidos de lisil oxidasa like-2 (LOXL2) circulantes en un individuo. También se proporcionan métodos y usos de tales ensayos en aplicaciones de diagnóstico, pronóstico, y predictivas y dispositivos de ensayo y kits para el uso del mismo.

[0005] Los proporcionados son métodos para detectar LOXL2, normalmente LOXL2 circulante, en un individuo. Entre los métodos proporcionados están la detección, el diagnóstico, la predicción, el monitoreo y los métodos de pronóstico. En algunos ejemplos, los métodos se llevan a cabo poniendo en contacto una muestra, en general, una muestra líquida obtenida del individuo, con un anticuerpo específico para LOXL2 y detectar la unión del anticuerpo al polipéptido, por ejemplo, polipéptido LOXL2, presente en la muestra. En algunos ejemplos, el ensayo detecta LOXL2 en la muestra líquida a 300, 250, 200, 175 pg/ ml o menos, o detecta LOXL2 en la muestra a una concentración tan baja como 300, 250, 200, 175 pg/ml, por ejemplo, tan baja como desde aproximadamente 150 pg/ml hasta aproximadamente 175 pg/ ml, desde aproximadamente 125 pg/ml hasta aproximadamente 150 pg/ml, desde aproximadamente 100 pg/ml hasta aproximadamente 125 pg/ml, desde aproximadamente 75 pg/ml hasta aproximadamente 100 pg/ml, desde aproximadamente 50 pg/ml hasta aproximadamente 75 pg/ml, o desde aproximadamente 40 pg/ml hasta aproximadamente 50 pg/ml.

[0006] En algunos ejemplos, el nivel LOXL2 detectado indica la presencia o ausencia de una enfermedad o condición. En algunos ejemplos, indica la probabilidad de que el individuo responderá a un tratamiento particular para la enfermedad, o indica la eficacia de un tratamiento. En algunos ejemplos, como cuando los métodos son métodos de pronóstico, el nivel detectado de LOXL2 indica la probabilidad de un resultado, evento o criterio de valoración de la enfermedad o condición. En algunos aspectos, la enfermedad o condición se caracteriza por, o está asociada a, la circulación de LOXL2 o con elevado LOXL2 circulante. En algunos aspectos, el individuo tiene la enfermedad o condición; en algunos aspectos, se sospecha que el individuo tiene la enfermedad o condición. En algunos aspectos, los métodos incluyen además la determinación de que el individuo tiene o no tiene la enfermedad o condición, responden probablemente o no a un tratamiento particular, o pueda tener o no un resultado o un evento en particular, o que un tratamiento ha sido o no ha sido efectivo.

[0007] En algunos ejemplos, el individuo se encuentra en un tratamiento para la enfermedad o condición y un nivel detectado de LOXL2 que es inferior a un nivel determinado en un punto de tiempo anterior, tal como un nivel de pre-tratamiento, lo que indica la eficacia del tratamiento.

[0008] La muestra es típicamente una muestra de líquido, tal como sangre, una fracción de sangre, tales como suero o plasma, orina, saliva, esputo, o lavado broncoalveolar.

[0009] En algunos ejemplos, el anticuerpo incluye un marcador detectable; marcadores a modo de ejemplo incluyen un agente quimioluminiscente, un marcador particulado, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo. En algunos ejemplos, la LOXL2 presente en la muestra se inmoviliza en un soporte insoluble por el contacto de la muestra de líquido con un segundo anticuerpo específico para LOXL2 para formar un segundo complejo anticuerpo-LOXL2. En un ejemplo, el segundo anticuerpo se inmoviliza sobre el soporte insoluble. En otro ejemplo, el segundo complejo anticuerpo-LOXL2 se forma antes de poner en contacto la muestra con el anticuerpo. El anticuerpo inmovilizado puede ser policlonal o monoclonal. En algunos ejemplos, el anticuerpo se une a LOXL2 cuando el LOXL2 se une a un agente que inhibe la actividad enzimática de la LOXL2, tal como un inhibidor alostérico de la actividad enzimática de LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2, tal como uno que se une a un epítipo dentro de un dominio SRCR3-4.

[0010] Los ejemplos de los anticuerpos anti-LOXL2 para uso en relación con los métodos y formas de realización proporcionadas incluyen, por ejemplo, AB0023, AB0024, anticuerpos que tienen una región variable de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEC ID N° : 6, 8, 10, 11, o 12, o con 75% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, o 99% o más de homología con la SEC ID N° : 6, 8, 10, 11, o 12, o con una CDR1, CDR2, y/o CDR3 de la secuencia de región variable expuesta en la SEC ID N° : 6, 8, 10, 11, o 12, y/o que tiene una región de cadena ligera variable que tiene la secuencia de aminoácidos establecida en la SEC ID N° : 7, 9, 13, o 14, o con 75% o más, 80% o más, 90% o más, 95% o más, o 99% o más de homología con la SEC ID N° : 7 o con una CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la secuencia de la región variable establecida en la SEC ID N° : 7; 9, 13, o 14, tal como un anticuerpo con una cadena pesada que tiene la CDR1, CDR2, y/o CDR3 o toda la secuencia de la secuencia de región variable expuesta en la SEC ID N° : 8 y una región

variable de cadena ligera con la CDR1, CDR2 y/o CDR3 o toda la secuencia de la secuencia de región variable expuesta en la SEC ID N°: 9 .

[0011] En algunos ejemplos, los métodos incluyen además la comparación del nivel detectado con un valor normal de control, donde un nivel detectado más alto que un valor normal de control es indicativo de la presencia de la enfermedad o condición, una probabilidad de que el individuo responderá a un tratamiento para la enfermedad o condición, o una probabilidad de un resultado patológico. Por ejemplo, en algunos ejemplos, los métodos de detección de niveles patológicos de LOXL2 circulante. Tales métodos pueden incluir la comparación del nivel detectado con un control normal u otro valor de referencia, donde un nivel detectado que es mayor que un control normal o valor de referencia es indicativo de una patología.

[0012] También se proporcionan métodos para determinar si un individuo tiene una enfermedad o condición caracterizada por o asociada con la elevada circulación de la lisil oxidasa like-2 (LOXL2), el diagnóstico de una enfermedad o condición, o hacer una determinación predictiva o pronóstico en relación con tal enfermedad o condición. En los ejemplos, tales métodos se llevan a cabo mediante la detección de un nivel de LOXL2 en una muestra, por ejemplo, muestra líquida, obtenida del individuo, por ejemplo, de acuerdo con los ensayos y métodos proporcionados en este documento, tales como los descritos anteriormente. Típicamente, un nivel de LOXL2 que es mayor que un nivel de control normal, el nivel de referencia, o en algunos casos superiores a la basal indica que el individuo tiene una enfermedad caracterizada por elevada LOXL2 circulante, o indica información de pronóstico o predictiva sobre la enfermedad o condición, tales como la predicción de la probabilidad de un resultado particular o la probabilidad de que el individuo responderá a un tratamiento de la enfermedad en particular.

[0013] En algunos aspectos de los métodos proporcionados, la enfermedad o condición es fibrosis o cáncer o una enfermedad asociada con la misma. Los ejemplos incluyen fibrosis pulmonar (tales como la fibrosis pulmonar idiopática (IPF)), la fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, mielofibrosis, cirrosis, hepatitis viral crónica, virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la hepatitis B (VHB). En algunos aspectos, la enfermedad o afección es la fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

[0014] Los métodos pueden incluir además someter al individuo a una o más pruebas de diagnóstico adicionales, que pueden incluir pruebas de función pulmonar, pruebas de la función cardíaca, y pruebas de función hepática.

[0015] También se proporcionan métodos para determinar la probabilidad de que un individuo que tiene una enfermedad fibrótica exhibirá una respuesta clínica beneficiosa a un tratamiento para la enfermedad fibrótica. Tales métodos pueden incluir la determinación de un nivel circulante de lisil oxidasa like-2 (LOXL2), por ejemplo, en una muestra líquida obtenida del individuo, tales como por los métodos descritos anteriormente. En un aspecto, un nivel circulante de LOXL2 que es mayor que un nivel de control normal indica que el individuo tiene una mayor probabilidad de mostrar una respuesta clínica beneficiosa a un tratamiento para la enfermedad fibrótica. En algunos ejemplos, los informes se generan en función de la probabilidad determinada. En algunos ejemplos, los métodos incluyen además el tratamiento del individuo para la enfermedad fibrótica. En algunos ejemplos, el individuo tiene una enfermedad activa fibrótica, tales como fibrosis hepática de METAVIR F1 o F2, y/o una enfermedad fibrótica de etapa avanzada, tal como fibrosis hepática de METAVIR F4.

[0016] También se proporcionan métodos para determinar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad caracterizada por elevada lisil oxidasa like-2 (LOXL2) en un individuo. En algunos ejemplos, tales métodos se llevan a cabo mediante la determinación de un nivel LOXL2 de circulación en un punto de tiempo en un individuo sometido a tratamiento para la enfermedad, de acuerdo con los métodos de detección descritos anteriormente y en el presente documento. Típicamente, un nivel de circulación LOXL2 en la muestra que es menor que un nivel obtenido en un punto de tiempo anterior, tal como un nivel de pre-tratamiento, del individuo, indica la eficacia del tratamiento. Alternativamente, el nivel circulante de LOXL2 en la muestra se puede incrementar inicialmente seguido de la depuración por el cuerpo.

[0017] También entre los métodos establecidos están los métodos de predicción y de pronóstico para la fibrosis pulmonar idiopática (IPF). En algunos ejemplos, tales métodos se llevan a cabo mediante la obtención de una muestra de un individuo, y la detección de un nivel de LOXL2 en la muestra, tal como el uso de los métodos descritos en el presente documento. Generalmente, el nivel de LOXL2 indica la probabilidad de un resultado de la enfermedad IPF o evento en el individuo.

[0018] Estos y otros de los métodos proporcionados también puede incluir una etapa de comparar el nivel detectado a un nivel de control normal de LOXL2, donde un

nivel elevado de LOXL2 en comparación con el nivel de control normal indica un aumento de la probabilidad de la ocurrencia de un resultado de la enfermedad IPF o evento en el individuo. En algunas realizaciones de los métodos proporcionados, un nivel de LOXL2 que es más alto que un nivel de referencia de umbral se correlaciona con la evolución negativa o la mortalidad en un sujeto. En un ejemplo, el nivel umbral de LOXL2 en la muestra es al menos 800 picogramos (pg) por mililitro (mL), al menos 600 pg/mL, al menos 400 pg/mL, o al menos 200 pg/mL. En otro ejemplo, el nivel umbral de LOXL2 en la muestra es de al menos 440 pg/mL. En un ejemplo, el método indica al menos un aumento de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, o 7 veces en la probabilidad de evolución de la enfermedad IPF en el individuo en comparación con un sujeto que tiene un nivel LOXL2 que es igual al nivel de LOXL2 de control normal o de basal.

[0019] Entre los resultados y los eventos de la enfermedad IPF son la progresión de la enfermedad IPF (como la definida como la mortalidad por cualquier causa, hospitalización respiratoria o una disminución categórica de la función pulmonar), disminución de la función pulmonar, hospitalización respiratoria, supervivencia libre de trasplante, muerte, y la respuesta al tratamiento. En algunos casos, los métodos de predecir un resultado, un evento o criterio de valoración, o la posibilidad del mismo, asociado con IPF, en un individuo. En algunos casos, los métodos de predecir el resultado, criterio de valoración, o la probabilidad del mismo en un individuo que ha sido considerado "negativo" para tal resultado, criterio de valoración, o la probabilidad por otro método o ensayo, tal como en base al índice Personal de Mortalidad Clínica y Molecular (PCMI) o el nivel de uno o más biomarcadores, tales como MMP7, ICAM1, IL8, VCAM1 y S100A12 (o para los que cualquier otro método o ensayo no detecte o sea incapaz de detectar el resultado, evento, criterio de valoración, o probabilidad de los mismos).

[0020] El método predictivo o de pronóstico de IPF puede incluir además la detección de una medida de la gravedad de la enfermedad IPF o el estado funcional en el individuo, seleccionado de entre el grupo, que consiste del porcentaje esperado de la capacidad vital forzada (CVF), el porcentaje esperado de la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO), la distancia recorrida en 6 minutos (6MWD), la presión media de la arteria pulmonar (PAPm), la saturación más baja de oxígeno en reposo (SpO2), el índice fisiológico compuesto (IPC), la puntuación del Cuestionario Respiratorio de St. George (SGRQ), y la puntuación del Índice de Transición de Disnea

(TDI), la capacidad de respuesta al tratamiento, y los biomarcadores de la enfermedad FPI. En algunos ejemplos, los métodos incluyen además analizar el nivel LOXL2 y/o medida de la gravedad de la enfermedad o el estado funcional usando un modelo predictivo.

[0021] También se proporcionan métodos para el seguimiento de la respuesta de un individuo a un tratamiento de IPF o determinar la probabilidad de que el individuo responderá al tratamiento. En un ejemplo, tales métodos se llevan a cabo mediante la obtención de una muestra de un individuo sometido a tratamiento para FPI, y detectar un nivel de LOXL2 en la muestra. Típicamente, el nivel de LOXL2 indica la capacidad de respuesta del individuo al tratamiento o la probabilidad de que el individuo responderá al tratamiento.

[0022] En algunos casos, los métodos incluyen además iniciar, alterar, o suspender un tratamiento de IPF en el individuo. En algunos ejemplos, el tratamiento es iniciado, alterado, o suspendido en base a la información determinada por los métodos, tales como el nivel o nivel relativo de LOXL2 o la información de pronóstico o predictiva. En algunos ejemplos, el tratamiento se inicia antes de la determinación de los niveles de LOXL2.

[0023] También se proporcionan dispositivos de ensayo y kits para uso en los métodos proporcionados, tales como para su uso en la determinación del nivel de un polipéptido de lisil oxidasa-homólogo 2 (LOXL2) en una muestra biológica líquida obtenida de un individuo. En una realización, un dispositivo de este tipo incluye una matriz que define una trayectoria de flujo axial, la matriz incluye i) una zona de recepción de muestra en un extremo en dirección ascendente a la trayectoria de flujo que recibe la muestra de fluido; ii) una o más zonas de ensayo posicionadas dentro de la trayectoria del flujo y en trayectoria descendente de la zona de recepción de muestra, cada una de la una o más zonas de ensayo comprende un anticuerpo específico para LOXL2, en donde cada uno de los anticuerpos específicos para LOXL2 es capaz de unirse a un polipéptido LOXL2 presente en la muestra de líquido para formar un complejo anticuerpo anti-LOXL2/LOXL2; y iii) una o más zonas de control situadas dentro de la trayectoria de flujo y en dirección descendente de la zona de recepción de la muestra.

[0024] La una o más zonas de control se pueden colocar entre las zonas de prueba cuando dos zonas de prueba están presentes. Las zonas de prueba y las zonas de control se pueden colocar en un formato alterno dentro de la trayectoria de flujo que

comienza con una zona de ensayo situada en dirección ascendente de cualquier zona de control. En un ejemplo, uno o más de los anticuerpos anti-LOXL2 está inmovilizado sobre la matriz en la zona de prueba.

[0025] En algunos ejemplos, el dispositivo incluye además una zona de marcado que incluye un anticuerpo marcado específico para un anticuerpo específico de LOXL2. En general, el anticuerpo marcado es capaz de unirse a un anticuerpo anti-LOXL2 presente en un complejo de anticuerpo anti-LOXL2/LOXL2 para formar un anticuerpo anti-LOXL2/LOXL2 marcado, y el anticuerpo marcado es movilizable en presencia de la muestra de líquido. El anticuerpo marcado puede incluir un componente de marcado seleccionado de entre un agente quimioluminiscente, un marcado particulado, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

[0026] En algunos ejemplos de los dispositivos, la matriz se coloca dentro de un alojamiento que comprende un soporte y, opcionalmente, una cubierta, en donde el alojamiento contiene una abertura de aplicación y uno o más puertos de observación. Entre los dispositivos provistos están las tiras reactivas y los dispositivos de prueba de tira reactiva.

[0027] Entre los kits proporcionados para determinar el nivel de un polipéptido de lisil oxidasa-homólogo 2 (LOXL2) en una muestra biológica obtenida de un individuo están los que incluyen un primer anticuerpo específico para LOXL2 y un segundo anticuerpo específico para LOXL2. El kit también puede incluir LOXL2purificado para su uso en la generación de una curva estándar. En un ejemplo, al menos uno de los anticuerpos en el kit incluye un marcador detectable, tal como un agente quimioluminiscente, un marcador particulado, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS ILUSTRACIONES

[0028] La Figura 1 muestra la concentración sérica LOXL2 versus la puntuación Ishak de fibrosis de 87 pacientes con infección crónica del virus de hepatitis C (VHC).

[0029] La Figura 2 representa los niveles de LOXL2 (pg/ml) en muestras de suero de pacientes con diagnóstico de fibrosis hepática.

[0030] La Figura 3 representa los niveles de LOXL2 en muestras de suero de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática.

[0031] La Figura 4 proporciona una secuencia de aminoácidos de LOXL2 humana (SEC ID N°: 1).

[0032] La Figura 5 muestra una alineación de las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de proteínas LOXL2 de humano (H) (SEC ID N°: 2), de ratón (M) (SEC ID N°: 3), de rata (R) (SEC ID NO: 4) y mono cynomolgus (C) (SEC ID N°: 5). Los residuos en la proteína de rata, mono cynomolgus y de ratón, que difieren de la de la proteína humana, se indican mediante subrayado.

[0033] La Figura 6 muestra la expresión de LOXL2 en el tejido de hígado fibrótico humano, como se determina por tinción inmunohistoquímica (IHC) de los tejidos del hígado de un paciente con infección crónica por el VHC. En el panel izquierdo (5x aumento del objetivo), las flechas negras indican áreas de expansión fibrosa en regiones portal y tractos. Las flechas blancas indican áreas de septos fibrosos cortos que rodean los lóbulos hepáticos. El panel de la derecha (aumento de 40x objetivo) muestra inmunoreactividad a LOXL2, observada en los septos fibrosos (S) en la interfaz con hepatocitos (H), en el espacio perisinusoidal (flechas), y en los miofibroblastos en el parénquima del hígado (flechas).

[0034] La Figura 7 muestra las curvas del estándar calibrador para el inmunoensayo de LOXL2, con recuentos en filas de ECL (electroquimioluminiscencia) graficados en el eje y, y la concentración de LOXL2 (nM/L) trazada en el eje x. La proteína LOXL2 purificada de longitud completa recombinante se añadió a una mezcla de sueros de humanos normales, seguidos por dilución en serie en el suero para crear una curva de calibrado. Cada punto de datos representa la media de tres pocillos replicados; se muestran las curvas para cuatro placas independientes.

[0035] La figura 8 muestra los niveles séricos de LOXL2 por la puntuación de fibrosis de Ishak agrupada desde el inicio del estudio y el tiempo. Cada panel muestra, para el punto de tiempo indicado, la concentración de LOXL2 (pg/mL) para dos grupos de pacientes, agrupados de acuerdo con la puntuación de Fibrosis de Ishak (1-3 y 5-6, respectivamente). Tres valores atípicos (concentración de LOXL2 = 5529, 6621, 8845 pg/mL), con concentración de LOXL2 fuera de los rangos graficados fueron todos del mismo sujeto, que tiene un puntaje de fibrosis de Ishak de 5.

[0036] La Figura 9 muestra los niveles medios de LOXL2 en suero, en un mismo sujeto, calculados como la concentración media de LOXL2 en suero durante 4-30 semanas, para los dos grupos de pacientes, agrupados de acuerdo con la puntuación de

Fibrosis de Ishak (1-3 y 5-6, respectivamente). El promedio del coeficiente de variación dentro del sujeto fue del 22%.

[0037] La figura 10 muestra la concentración media de LOXL2 en suero (pg/mL) en el tiempo (semanas), por el índice de fibrosis de Ishak agrupado desde el inicio del estudio del estudio, con intervalos de confianza del 95%. Sólo un sujeto tuvo un cambio mayor que o igual a 2 en la puntuación de fibrosis de Ishak sobre las 25-28 semanas entre las biopsias del estudio.

[0038] La figura 11 muestra la mediana de los niveles de LOXL2 dentro de los sujetos versus los niveles de ácido hialurónico (HA) (panel izquierdo) y el inhibidor de tejido metaloproteinasas-1 (TIMP1) (panel derecho), para los sujetos que tienen las puntuaciones de Ishak indicadas (1 -6). La mediana de la expresión dentro de los sujetos dentro se calculó como la mediana de la expresión de más de 4 semanas hasta la 30. La curva se construyó utilizando un suavizado del gráfico de dispersión ponderado.

[0039] La figura 12 muestra las matrices del gráfico de dispersión que demuestran la correlación entre los niveles basales de LOXL2 (con niveles LOXL2 no transformadas en el panel (a) y niveles LOXL2 transformados mediante el $\log_{10}x$ en el panel (b)) y las medidas de referencia de la gravedad y estado funcional de la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), tal como se describe en el Ejemplo 9. En cada panel, el eje x y el eje y de la primera fila y la primera columna, respectivamente, representan los niveles LOXL2 basales; el eje x y el eje y de la segunda fila y la segunda columna, respectivamente, representan la capacidad vital forzada (FVC) del inicio del estudio esperada; el eje x y el eje y de la tercera fila y la tercera columna, respectivamente, representan el porcentaje de la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO) de la basal esperada; el eje x y el eje y de la cuarta fila y la cuarta columna, respectivamente, representan la distancia recorrida en 6 minutos del inicio del estudio (6MWD); el eje x y el eje y de la quinta fila y la quinta columna, respectivamente, representan el índice compuesto fisiológico (IPC) basal; el eje x y el eje y de la sexta fila y la sexta columna, respectivamente, representan la puntuación en el Cuestionario Respiratorio de St. George del inicio del estudio; y el eje x y el eje y de la séptima fila y la séptima columna, respectivamente, representan la puntuación de Transición de Disnea del inicio del estudio. La correlación entre LOXL2 y las medidas basales de gravedad y el estado funcional de IPF se destacan dentro de las cajas oscuras de la fila superior de los paneles (a) y (b).

[0040] La figura 13 muestra las curvas de Kaplan-Meier, comparando bajos (<800 pg/mL) y altos (> 800 pg/mL) niveles de LOXL2 de progresión de la enfermedad (PFS) (el panel (a)) y sus componentes: disminución de la función pulmonar (el panel (b)), las hospitalizaciones respiratorias (panel (c)) y la muerte (el panel (d)). En cada panel, la línea más oscura de la parte superior representa a los pacientes con bajos (<800 pg/mL) niveles de LOXL2 sérico basal y la línea inferior, más ligera, representa los pacientes con elevados (> 800 pg/mL) niveles LOXL2 basales. Todos los pacientes fueron tratados con ambrisentan. Cada eje y muestra el porcentaje de pacientes sin el evento dado (con 0, 25, 50, 75, y 100 marcados a lo largo del eje) y cada eje x muestra el tiempo en días (con 0, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, y 800 días marcados a lo largo del eje).

[0041] La figura 14 muestra una comparación de la distribución de LOX basal en los sujetos de ARTEMIS-IPF (14A: placebo y pacientes tratados con Ambrisentan combinados; 14B: Ambrisentan solamente) y los individuos de esa cohorte de GAP.

[0042] La Figura 15A muestra las curvas de Kaplan-Meier para la mortalidad por cualquier causa de acuerdo a los niveles bajos (línea superior, <440 pg/mL) versus los niveles altos (línea inferior, >440 pg/mL) séricos de LOXL2 a los 6 meses (panel superior izquierdo), 12 meses (panel superior derecho), 18 meses (panel inferior izquierdo) y 24 meses (panel inferior derecho) después del inicio del estudio en el estudio de cohortes GAP. La Figura 15B muestra las curvas de Kaplan Meier para todas las causas de mortalidad de acuerdo a los niveles menores (línea superior, <800 pg/mL) versus los niveles altos (línea inferior, >800 pg/mL) séricos de LOXL2 a los 6 meses (panel superior izquierdo), 12 meses (panel superior derecho), 18 meses (panel inferior izquierdo) y 24 meses (panel inferior derecho) después del inicio del estudio en el estudio de ARTEMIS-IPF.

[0043] La figura 16 muestra los niveles medios de LOXL2 séricos (pg/mL) para los distintos grupos de sujetos. La figura 16A muestra los niveles medios de LOXL2 en suero para las muestras del inicio del estudio y la semana 240 (total de 162 muestras (una del inicio del estudio y una de la semana 240 para cada uno de los 81 sujetos), agrupados según la puntuación de fibrosis de Ishak del sujeto correspondiente (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, izquierda-derecha). LOQ = nivel de cuantificación. La figura 16B muestra los niveles medios basales y de la semana 240 de LOXL2 en suero de pacientes con etapas de Ishak dadas (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, de izquierda a derecha) en el inicio del estudio y la semana 240. La figura 16C muestra los niveles de LOXL2 en suero del inicio del

estudio, la semana 240, y los niveles generales de LOXL2 en suero para los pacientes con las etapas de Ishak correspondientes a entre 1 y 3 y entre 4 y 6.

[0044] La Figura 17 muestra el porcentaje de sujetos en el estudio con cada etapa de Ishak dada (1, 2, 3, 4, 5, 6 (barras individuales de izquierda a derecha)) que se han determinado que tienen un nivel dado de suero LOXL2 (pg/mL). LD = límite de detección; LOQ = límite de cuantificación. Cada categoría se muestra extendida desde el límite superior de la categoría anterior, por ejemplo, 1500 = 1001-1500 pg/mL.

[0045] La figura 18 muestra los niveles LOXL2 en suero (pg/mL) al inicio del estudio y a la semana 240 después del tratamiento para los sujetos individuales con CHB. Figura 18A: sujetos con cirrosis persistente (n = 16); Figura 18B: sujetos con reversión de la cirrosis por la semana 240 (n = 42); Figura 18C: sujetos no cirróticos que no experimentaron un cambio en la fase fibrótica (Ishak) por la semana 240); Figura 18D: sujetos que experimentaron una progresión a cirrosis en el transcurso del estudio, y Figura 18E: sujetos no cirróticos con mayor que o igual a la reducción de la etapa 2 en la fibrosis (puntuación de Ishak). LDC (límite de cuantificación) = 440 pg/mL, LOD (límite de detección) = 180 pg/mL.

[0046] La Figura 19 muestra el porcentaje de sujetos con CHB cirróticos que exhibieron una mejora histológica en la semana 240 ("Y") teniendo niveles de LOXL2 en suero al inicio del estudio (<1500, > 1500, 1500-3000, <3000, y > 3000 pg/mL) y el porcentaje de sujetos cirróticos determinados a no tener mejoría histológica en la semana 240 ("N") teniendo los mismos niveles de LOXL2 en suero dados al inicio del estudio..

DEFINICIONES

[0047] Como se usa en este documento, el término "anticuerpo" se refiere a un agente de unión aislado o recombinante que comprende las secuencias de la región variable necesarias para unirse específicamente a un epítipo antigénico. Por lo tanto, un anticuerpo es cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que presenta la actividad biológica deseada, por ejemplo, la unión del antígeno diana específico. Por lo tanto, se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo incluyendo pero no limitados a, scFv, Fab y Fab2, siempre que presenten la actividad biológica deseada. El término

"anticuerpo humano", por lo tanto se refiere a anticuerpos que contienen secuencias de origen humano, a excepción de posibles regiones determinantes de complementariedad no humanas (CDR), y no implica que la estructura completa de una molécula de Ig esté presente, sólo que el anticuerpo tiene efecto inmunogénico mínimo en un ser humano .

[0048] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, por ejemplo, la región de unión del antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata et al, Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995)); de moléculas de una sola cadena de anticuerpo, y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizarse fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y es todavía capaz de unirse de forma cruzada al antígeno.

[0049] "Fv" es un fragmento de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento de antígeno completo y un sitio de unión, y consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en estrecha asociación, no covalente. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

[0050] El fragmento "Fab" también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi-terminal del dominio CH₁ de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en la que el residuo(s) de cisteína(s) de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen bisagra de cisteínas entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0051] Como se usa en este documento, el término "muestra biológica" puede referirse a una variedad de tipos de muestras obtenidas de un individuo que se puede utilizar en la detección, ensayo de diagnóstico, pronóstico, o monitoreo. Una muestra biológica líquida puede incluir, por ejemplo, sangre, una fracción de sangre (por ejemplo, suero o plasma), orina, saliva, lavado broncoalveolar, esputo, o líquido cefalorraquídeo. La definición también incluye muestras que han sido manipuladas de cualquier forma después de su obtención, como por tratamiento con reactivos, solubilización, o enriquecimiento por ciertos componentes, tales como proteínas.

[0052] "Flujo axial" tal como se utiliza aquí, se refiere al flujo lateral, vertical o transversal a través de una matriz o material particular que comprende una o más zonas de prueba y/o zonas de control. El tipo de flujo previsto en un dispositivo, ensayo o método en particular, varía de acuerdo con la estructura del dispositivo. Sin estar ligado por la teoría, el flujo lateral, vertical o transversal puede referirse al flujo de una muestra de fluido desde el punto de contacto del fluido en un lado extremo o lateral de una matriz particular (el extremo de dirección ascendente o proximal) hasta un área en dirección descendente (o distal) de este contacto. La zona en dirección descendente puede estar en el mismo lado o en el lado opuesto de la matriz desde el punto de contacto con el fluido. Por ejemplo, en dispositivos de flujo vertical de ciertas personificaciones de la presente invención, el flujo axial puede progresar verticalmente desde y a través de un primer miembro (de arriba a abajo) hasta un segundo miembro y de ahí a un medio absorbente. A modo de ejemplo adicional, y como se apreciará por los expertos en la técnica, en un dispositivo de flujo vertical configurado, por ejemplo, como una varilla de nivel, una muestra de fluido puede fluir literalmente al dispositivo, en cuyo caso sin embargo, el punto del primer contacto de la muestra de fluido al dispositivo se considera, no obstante, el extremo en dirección ascendente (es decir, proximal) y el punto de terminación del flujo el extremos en dirección descendente (es decir, distal).

[0053] Como se utilizan aquí, los términos "dirección corriente arriba" y "dirección corriente abajo", en el contexto de flujo axial, se refieren a la dirección de flujo de la muestra del fluido posterior al contacto de la muestra de fluido con un dispositivo representativo de la presente divulgación, en el que, en virtud de condiciones normales de funcionamiento, la dirección del flujo de la muestra de fluido se extiende desde una posición en dirección ascendente a una posición en dirección descendente. Por ejemplo, cuando la muestra de fluido se pone en contacto inicialmente con la zona de recepción

de muestra, la muestra de fluido a continuación fluye en dirección descendente a través de la zona de marcado y así sucesivamente.

[0054] Antes de que las personificaciones de la presente invención sean descritas con más detalle, se ha de entender que esta invención no se limita a las personificaciones particulares descritas, como tal, puede, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología usada en este documento es con el propósito de describir personificaciones particulares solamente, y no se pretende que sea limitante.

[0055] Cuando se proporciona un rango de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese rango y cualquier otro valor establecido o intervenido en ese rango establecido, está incluido. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también se incluyen, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también están incluidos.

[0056] A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento también se pueden utilizar en la práctica o ensayo de formas de personificaciones de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan aquí por referencia a revelar y describen los métodos y/o materiales en relación con los cuales se citan las publicaciones.

[0057] Hay que señalar que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo específico de LOXL2 " incluye una pluralidad de tales anticuerpos y la referencia a "el polipéptido LOXL2" incluye la referencia a uno o más polipéptidos LOXL2 y equivalentes de los mismos conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Se observa, además, que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Por lo tanto, esta declaración tiene la intención de servir como base antecedente para el uso de una terminología tan

exclusiva como "el único", "sólo" y similares en relación con la recitación de elementos de la reivindicación, o el uso de una limitación "negativa".

[0058] Se aprecia que ciertas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de personificaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola personificación. A la inversa, diversas características proporcionadas, que son, por razones de brevedad, descritas en el contexto de una sola personificación, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier sub-combinación adecuada. Todas las combinaciones de las personificaciones previstas son aceptadas específicamente por la presente descripción y se describen en el presente documento como si todos y cada combinación se diera a conocer de forma individual y de forma explícita. Además, todas las sub-combinaciones de las diversas personificaciones y elementos de los mismos también son abarcados específicamente por la presente descripción y se dan a conocer en el presente documento como si cada una de tales sub-combinaciones se dieran a conocer de forma individual y de forma explícita en el presente documento.

[0059] Las publicaciones descritas en este documento se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de la invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que pueden necesitar ser confirmadas de forma independiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0060] La presente descripción proporciona un ensayo para detectar y/ o cuantificar LOXL2, generalmente polipéptidos circulantes de lisil oxidasa-homólogo 2 (LOXL2) en un individuo. El ensayo es útil en aplicaciones de diagnóstico y pronóstico, las cuales también son proporcionadas,

[0061] La lisil oxidasa like-2 (LOXL2) se expresa en el tejido fibrótico hepático humano donde lleva a cabo la reticulación de colágeno y otros componentes de la matriz, lo que resulta en aumento de la rigidez, la activación de los fibroblastos patológicos y un proceso dinámico de remodelación de la matriz y la fibrogénesis. Barry-Hamilton V, Spangler R, Marshall D, et al., "Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment," *Nat Med.* 2010. 16: 1009-1017. LOXL2 se expresa en el tejido de hígado fibrótico de

enfermedades humanas de diversa etiología, incluyendo la infección por hepatitis C 1, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA)¹, esteatohepatitis alcohólica (ASH), la enfermedad de Wilson (Vadasz Z, Kessler O, Akiri G, et al., "Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson's disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2," *J Hepatology*. 2005. 43: 499–507), y cirrosis biliar primaria², además de modelos de ratones de colangitis esclerosante. Nakken KE, Nygard S, Haaland T, et al. "Multiple inflammatory-, tissue remodelling- and fibrosis genes are differentially transcribed in the livers of Abcb4 (-/-) mice harbouring chronic cholangitis," *Scand J Gastroent*. 2007. 42: 1245–1255.

[0062] La inhibición alostérica de LOXL2 utilizando un anticuerpo monoclonal es eficaz en la inhibición de la fibrosis en una variedad de modelos de enfermedades, incluyendo los modelos de hígado y la fibrosis pulmonar. La inhibición de la LOXL2 dio lugar a la baja regulación de la señalización de TGF y varios mediadores profibróticos clave (por ejemplo, el TGF- β 1, CTGF, endotelina, CXCL12)¹; LOXL2 es una diana principal de señalización en las enfermedades fibróticas. Mehal WZ, Iredale J, & Friedman SL., "Expressway to the core of fibrosis," *Nat Med*. 2011. 17: 552–553

[0063] La acumulación gradual de colágeno en el parénquima hepático es una vía final común de la enfermedad hepática crónica. Esta progresiva acumulación de fibrosis en última instancia, puede conducir a la cirrosis hepática y la enfermedad hepática terminal. LOXL2 cataliza la reticulación de las fibrillas de colágeno y es una proteína reguladora central de la fibrogenesis. La expresión de LOXL2 se aumenta en el tejido de hígado enfermo.

[0064] Hay poca expresión de LOXL2 en tejidos adultos sanos; y bajo condiciones normales (por ejemplo, no enfermedades), la cantidad de circulación de LOXL2 es baja o indetectable. Bajo ciertas condiciones de enfermedad, el LOXL2 circulante está elevado. Por ejemplo, LOXL2 puede estar elevada en el suero de pacientes con enfermedad hepática crónica, como en los pacientes con hepatitis C crónica, con mayores niveles en pacientes con fibrosis avanzada. La detección de LOXL2 circulante es por lo tanto útil para determinar si un individuo tiene una enfermedad que resulta en elevados niveles circulantes de LOXL2. Tales enfermedades incluyen la fibrosis y el cáncer. La presente descripción proporciona métodos de diagnóstico para determinar si un individuo tiene una enfermedad asociada con elevados niveles circulantes de LOXL2. La detección de LOXL2 circulante puede ser seguida con otros métodos de

diagnóstico, para confirmar un diagnóstico o para descartar la posibilidad de que una persona tiene una enfermedad en particular.

[0065] Se ha encontrado que el nivel de LOXL2 circulante se correlaciona con la etapa de la fibrosis.

[0066] También se ha encontrado que el nivel de LOXL2 circulante puede proporcionar una indicación en cuanto a si un individuo que tiene fibrosis es susceptible al tratamiento para la fibrosis y proporciona otra información de pronóstico y predictiva con respecto a la enfermedad, tales como la probabilidad de un criterio de valoración, resultado, o evento determinado, como resultado de la enfermedad o la respuesta al tratamiento. La presente descripción proporciona métodos para determinar la probabilidad de que un individuo responderá al tratamiento para una enfermedad fibrótica y/o la probabilidad de tal evento y el resultado, criterio de valoración, o evento.

[0067] Las decisiones de tratamiento para los pacientes con infección por el VHC se basan cada vez más en pruebas de suero no invasivas en lugar de biopsias hepáticas. Sin embargo, las pruebas de suero no han sido del todo óptimas. Ver Castera, L., "Invasive and non-invasive methods for the assessment of fibrosis and disease progression in chronic liver disease," *Best Pract Res Clin Gastroent.* 2011. 25: 291–303..

MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LOXL2 CIRCULANTE

[0068] La presente descripción proporciona un ensayo para detectar y/o cuantificar polipéptidos LOXL2 circulantes en un individuo. En la práctica, LOXL2 se detecta en una muestra líquida obtenida de un individuo que está siendo evaluado, donde la muestra de líquido puede ser sangre o una fracción de sangre tal como plasma o suero, u otra muestra de líquido.

[0069] En algunas personificaciones, los métodos y ensayos proporcionados son útiles para la medición sustituta no invasiva del grado de fibrosis hepática, tales como en pacientes con infección crónica por el VHC o por el VHB.

El polipéptido LOXL2

[0070] Un "polipéptido LOXL2" se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, o 100 %, de identidad de secuencia aminoacídica para un tramo contiguo desde aproximadamente 100 aminoácidos (aa) hasta aproximadamente 200 aa, desde aproximadamente 200 aa hasta aproximadamente 300 aa, desde aproximadamente 300 aa hasta aproximadamente 400 aa, desde

aproximadamente 400 aa hasta aproximadamente 500 aa, desde aproximadamente 500 aa hasta aproximadamente 600 aa, desde aproximadamente 600 aa hasta aproximadamente 700 aa, desde aproximadamente 700 aa hasta 774 aa, de la secuencia de aminoácidos representada en la Figura 4. "LOXL2" también se refiere a la secuencia humana de aminoácidos LOXL2 representada en la Figura 4, y variantes de origen natural (polimorfismos) de los mismos.

[0071] La Figura 4 representa una secuencia de aminoácidos de LOXL2 humana, que muestra los dominios ricos en cisteína del receptor atrapador (SRCR). Un polipéptido LOXL2 puede ser un polipéptido de longitud completa o un polipéptido LOXL2 maduro (forma de escisión; forma procesada). La escisión esperada de la señal está entre Ala25-Gln26. La escisión del péptido señal a partir del pre-propéptido resulta en un propéptido LOXL2. El polipéptido LOXL2 se escinde entre SRCR2 y SRCR3 (por ejemplo, entre los aminoácidos 301 y 326 de la secuencia representada en la Figura 4), dejando un polipéptido LOXL2 que comprende SRCR3, SRCR4, y el dominio de lisil oxidasa (catalítico).

[0072] Un polipéptido LOXL2 puede ser enzimáticamente activo. Por ejemplo, un polipéptido LOXL2 puede catalizar la desaminación oxidativa de los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y los residuos de hidroxilisina, lo que resulta en la conversión de peptidil lisina a peptidil- α -aminoadípico- δ -semialdehído (alisina) y la liberación de cantidades estequiométricas de amoníaco y de hidrógeno peróxido. Esta reacción ocurre más a menudo extracelularmente, por ejemplo, en los residuos de lisina en el colágeno y la elastina.

[0073] . En algunos casos, el polipéptido LOXL2 que se detecta usando un ensayo de LOXL2 en sujetos es un polipéptido de longitud completa LOXL2 sin la secuencia señal, por ejemplo, incluyendo SRCR1-2, SRCR3-4, y el dominio catalítico. En algunos ejemplos, el polipéptido LOXL2 que se detecta usando un ensayo de LOXL2 en sujetos es un polipéptido LOXL2 maduro (es decir, sin la secuencia señal y sin SRCR1-2), incluyendo sólo el dominio SRCR3-4 y el dominio catalítico. Alternativamente, o además de, la detección del polipéptido LOXL2 maduro (dominios SRCR3-4 y los dominios catalíticos; sin la secuencia señal y los dominios SRCR1-2), un ensayo de LOXL2 en sujetos puede detectar un fragmento N-terminal de LOXL2, el fragmento N-terminal de LOXL2 incluye los dominios SRCR1-2 y no los dominios SRCR3-4 o los dominios catalíticos.

Muestras biológicas

[0074] Las muestras biológicas líquidas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, sangre total; fracciones sanguíneas (también referidos como “productos sanguíneos”), donde las fracciones sanguíneas adecuadas incluyen, pero no están limitadas a, suero y plasma; saliva; orina; lavado broncoalveolar; fluido cerebroespinal; esputo; y similares. La muestra biológica puede ser sangre fresca o sangre almacenada (p.e. en un banco de sangre) o fracciones sanguíneas. La muestra biológica puede ser una muestra líquida obtenida expresamente para un ensayo descrito en la presente declaración o una muestra líquida obtenida para otro propósito la cual puede ser submuestreada para un ensayo descrito en la presente declaración.

[0075] Como un ejemplo, la muestra biológica puede ser sangre total. La sangre total puede ser obtenida a partir del sujeto usando procedimientos clínicos estándares. En otra realización, la muestra biológica es plasma. El plasma puede ser obtenido de muestras de sangre total mediante la centrifugación de sangre con anticoagulante. Tal proceso provee una capa de glóbulos blancos (capa leucocitaria) y un sobrenadante de plasma. En otra realización, la muestra biológica es suero.

[0076] La muestra puede ser pretratada como sea necesario mediante la dilución con una solución tampón apropiada, heparinizada, concentrada si es deseable, o fraccionada por varios métodos incluyendo pero no estando limitados a la ultracentrifugación, fraccionamiento por cromatografía líquida de proteína rápida (FPLC por sus siglas en inglés) o precipitación. La muestra puede ser fraccionada, p.e., por un método de inmunoafinidad para remover uno o más proteínas no-LOXL2 u otros componentes no-LOXL2 de la muestra; p.e. anticuerpos anti-albumina pueden ser usados para remover albumina de la muestra. Pueden ser usados, una de varias soluciones tampón acuosas estándares, empleando una de una variedad de tampones, como es fosfato, Tris, o similar, a pH fisiológico.

Anticuerpos Anti-LOXL2

[0077] Un método en cuestión utiliza anticuerpo específico para LOXL2 para inmovilizar y detectar LOXL2 en una muestra líquida. El anticuerpo utilizado en un método de ensayo en cuestión es específico para LOXL2, por ejemplo, el anticuerpo se une específicamente a un polipéptido LOXL2, donde la unión específica se refiere a la unión con una afinidad de al menos 10^{-7} M aproximadamente, o al menos 10^{-8} M aproximadamente, o al menos 10^{-9} M aproximadamente, o al menos 10^{-10} M aproximadamente, o al menos 10^{-11} M aproximadamente, o al menos 10^{-12} M

aproximadamente, o superior a 10^{-12} M. La unión no específica se referiría a la unión con una afinidad de menos de 10^{-7} M aproximadamente, por ejemplo, unión con una afinidad de 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, etc.

[0078] Un anticuerpo LOXL2-específico no se une sustancialmente a cualquier otro polipéptido similar a lisil-oxidasa que no sea un polipéptido LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo LOXL2-específico no se une sustancialmente a un LOXL1, LOXL3, o polipéptido LOXL4, o a un polipéptido lisil-oxidasa (LOX).

[0079] En algunas realizaciones, un anticuerpo LOXL2-específico se une a un epítipo (s) que es accesible para la unión cuando el polipéptido LOXL2 está en una muestra biológica líquida, por ejemplo, el epítipo (s) unido por el anticuerpo LOXL2-específico está en la superficie accesible y / o no está enmascarado por una o más proteínas no LOXL2 que pueden estar presentes en la muestra biológica líquida.

[0080] Los anticuerpos adecuados para su uso en un método en cuestión de la invención incluyen anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, nanocuerpos, diacuerpos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno.

[0081] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 utilizado en un método en cuestión comprende un marcador detectable. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, perlas magnéticas (por ejemplo Dynabeads™), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, proteína fluorescente amarilla, y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rabanito, fosfatasa alcalina, luciferasa y otras enzimas comúnmente utilizadas en un ensayo inmunoabsorbente de unión a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés), y etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

[0082] Cuando un anticuerpo anti-LOXL2 comprende un marcador detectable, el anticuerpo anti-LOXL2 se puede detectar mediante la detección de una señal producida por la etiqueta (por ejemplo, un cromóforo, luminóforo, etc., producido como un producto de una enzima unido a el anticuerpo anti-LOXL2; una señal producida directamente por la etiqueta; etc.) En algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 no comprende un marcador detectable, en su lugar, se detecta el anticuerpo anti-LOXL2 usando un anticuerpo secundario que comprende un marcador detectable. Los

anticuerpos secundarios adecuados incluyen anticuerpos monoclonales y policlonales específicos para el epítipo (s) en el dominio de la región constante (s) de un anticuerpo anti-LOXL2. Un anticuerpo secundario puede comprender cualquiera de una variedad de marcadores detectables, incluyendo, pero no limitado a, perlas magnéticas (por ejemplo Dynabeads TM), tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, proteína fluorescente amarilla y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rabanito, fosfatasa alcalina, luciferasa y otras enzimas comúnmente utilizadas en un ensayo inmunoabsorbente de unión a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés)), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.). También adecuado para su uso como una etiqueta detectable es la etiqueta SULFO-TAGTM de Mesoscale Discovery. La etiqueta sulfo-TAG TM es un rutenio (II) tris-bipiridal, que se puede unir a un polipéptido (por ejemplo, un anticuerpo secundario) a través de la reacción del rutenio (II) tris-bipiridina-(4-metilsulfona) N-hidroxisuccinimida (NHS)-éster con una amina primaria (por ejemplo, una cadena lateral de lisina).

[0083] En algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 utilizado en un método de ensayo en cuestión se puede inmovilizar en un soporte insoluble. Los soportes insolubles adecuados pueden comprender diversos materiales incluyendo, pero no limitado a, difluoruro de polivinilo (PVDF), celulosa, nitrocelulosa, nylon, vidrio, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, dióxido de silicio, polietileno, policarbonato, dextrano, amilosa, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, sílice embebida en un gel de poliacrilamida, agarosa, gabros, magnetita y similares. El soporte insoluble puede estar en cualquiera de una variedad de formatos (por ejemplo, dimensiones, formas), por ejemplo, hojas, tales como las usadas en una tira de prueba; un formato de ensayo de tira reactiva; una placa de múltiples pocillos (por ejemplo, tales como las utilizadas en un ELISA) y similares.

[0084] Los ejemplos no limitantes de anticuerpos LOXL2-específicos incluyen los anticuerpos LOXL2-específicos dados a conocer en la publicación de patente de EE.UU. N ° 2009 / 0104201, y la Publicación de Patente de EE.UU. N ° 2009 / 0053224.

[0085] En algunos casos, un anticuerpo adecuado se une específicamente a un epítipo en el dominio SRCR1 de LOXL2. En algunos casos, un anticuerpo adecuado se une

específicamente a un epítipo en el dominio SRCR2 de LOXL2. En algunos casos, un anticuerpo adecuado se une específicamente a un epítipo en el dominio SRCR3 de LOXL2. En algunos casos, un anticuerpo adecuado se une específicamente a un epítipo en el dominio SRCR4 de LOXL2. En algunos casos, un anticuerpo adecuado se une específicamente a un epítipo en el dominio catalítico de LOXL2. La figura 5 proporciona las secuencias de aminoácidos de los dominios catalíticos de LOXL2. En algunos casos, un anticuerpo adecuado (por ejemplo, un anticuerpo policlonal) se une específicamente a epítipos múltiples en uno, dos, tres, o más dominios de LOXL2.

[0086] En algunos casos, un anticuerpo detecta un polipéptido LOXL2 de longitud completa sin la secuencia señal, por ejemplo, incluyendo SRCR1-2, SRCR3-4 y el dominio catalítico. En algunos casos, un anticuerpo detecta al polipéptido LOXL2 maduro (es decir, sin la secuencia señal y sin SRCR1-2), incluyendo sólo el dominio SRCR3-4 y el dominio catalítico. En otros casos, un anticuerpo detecta un fragmento N – terminal de LOXL2, tal fragmento N – terminal de LOXL2 incluye los dominios SRCR1-2 y no los dominios SRCR3-4 o dominios catalíticos.

[0087] Por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR3-enlazador-SRCR4, donde tal región se conoce como " SRCR3-4 . " Una región SRCR3-4 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 325 a 544, con los aminoácidos 325 a 547, con los aminoácidos 303 a 544, o con los aminoácidos 303 a 547, de la SEQ ID NO: 1. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 325 a 544, con los aminoácidos 325 a 547, con los aminoácidos 303 a 544 o con los aminoácidos 303 a 547 de la SEQ ID NO: 1.

[0088] En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región de enlazador-SRCR3-enlazador-SRCR4-enlazador, por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos

aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 303 a 544, los aminoácidos 303 a 545, los aminoácidos 303 a 546 o los aminoácidos 303-547 de la SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 en cuestión se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR3-enlazador-SRCR4-enlazador, por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 325 a 544, los aminoácidos 325 a 545, los aminoácidos 325 a 546 o los aminoácidos 325-547 de la SEQ ID NO : 1 .

[0089] En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR3 (y no dentro de SRCR4), donde una región SRCR3 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 325 a 425, con los aminoácidos 303 a 425, con los aminoácidos 303 a 434 o con aminoácidos 325-434 de la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región de enlazador-SRCR3, por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 303 a 425 de la SEQ ID NO : 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR3-enlazador, por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 325 a 434 de la SEQ ID NO : 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región de enlazador-SRCR3-enlazador, por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos

que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 303 a 434 de la SEQ ID NO : 1.

[0090] En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región de enlazador-SRCR4-enlazador, por ejemplo, en algunos casos, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 426 a 544, los aminoácidos 426 a 545, los aminoácidos 426 a 546 o los aminoácidos 426 a 547 de la SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR4 (y no dentro de SRCR3), donde una región SRCR4 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 435 a 544, los aminoácidos 435 a 545, los aminoácidos 435 a 546 o con los aminoácidos 435 a 547 de la SEQ ID NO : 1.

[0091] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR1-enlazador-SRCR2, donde tal región se conoce como "SRCR1-2". Una región SRCR1-2 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 58 a 302, o 58 a 324 de secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1 (Figura 4). En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 58 a 324 de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR1 (y no dentro de SRCR2), donde una región SRCR1 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 58 a 324 de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1.

98%, al menos aproximadamente 99 % o 100 de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 58 a 159 de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR1-enlazador, donde una región SRCR1-enlazador puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 58 a 187 de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado se une específicamente a un epítipo dentro de la región SRCR1 (y no dentro de SRC2), donde una región SRCR2 puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 % o 100 % de identidad de secuencia aminoacídica con los aminoácidos 188 a 302 de la secuencia de aminoácidos representada en la SEQ ID NO: 1.

[0092] Como un ejemplo no limitante, un anticuerpo adecuado es el anticuerpo monoclonal AB0030, que se une específicamente a un epítipo en el dominio catalítico de LOXL2. Véase, por ejemplo, EE.UU. 2009 / 0053224, en donde el anticuerpo AB0030 corresponde a proBM20.

[0093] En algunas realizaciones, un anticuerpo adecuado es uno que se une específicamente a LOXL2 cuando LOXL2 se une a un agente que inhibe la actividad enzimática de LOXL2. Los agentes que inhiben la actividad enzimática de LOXL2 incluyen un inhibidor alostérico de la actividad enzimática de LOXL2. En algunos casos, el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2 que se une a un epítipo dentro de un dominio "SRCR3-4" de LOXL2. Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad enzimática de LOXL2 y que se une a un epítipo dentro del dominio SRCR3-4, son AB0023 y AB0024; véase, por ejemplo, EE.UU. 2009 / 0053224. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado: a) se une específicamente a un epítipo dentro de SRCR3-4, y ii) no compite con un anticuerpo AB0023 y / o un anticuerpo AB0024 para la unión a un epítipo dentro de SRCR3-4.

[0094] Por ejemplo, en algunas formas de realización, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una región variable en la cadena pesada con los CDRs siguientes y regiones de

armazón interrumpiendo (correspondientes a las de AB0023, con las secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 subrayadas) :

[0095] MEWSRVFI~~FLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELVRPGTSVKVSC~~KASGYAFTYYLIE
WVKQRPQG~~LEWIGVINPGSGGTNYNEKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDS~~AVY
FCARNWMNFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 6). En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos con el 75 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más o 99 % o más de homología con la SEQ ID NO: 6. En algunas formas de realización, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena pesada con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de región variable expuesta en la SEC ID NO: 6.

[0096] En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una región variable en la cadena ligera con los CDRs siguientes y regiones de armazón interrumpiendo (correspondientes a las de AB0023, con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas):

[0097] MRCLAEFLGLLVLPWIPGAIGDIVMTQAAPSVSVTPGESVSISCRSSKSLH
SNGNTYLYWFLQRPQGSPQFLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEA
EDVG~~VYYCMQHLEYPYTF~~GGG~~TKLEIK~~ (SEQ ID NO: 7). En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos con el 75 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más o 99 % o más de homología con la SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena ligera con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de región variable expuesta en la SEC ID NO: 7. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de región variable expuesta en la SEC ID NO: 6 y una región variable en la cadena ligera con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de la región variable mostrada en la SEC ID NO: 7.

[0098] En algunas realizaciones, el anticuerpo es una versión humanizada de un anticuerpo de este tipo, tal como está descrito en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N ° EE.UU. 2009 / 0053224 (26 febrero del 2009), como aquel AB0024 designado, y / o uno que tiene una cadena pesada con los CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3) de AB0024 y / o que tiene una cadena ligera con los CDRs (CDR1, CDR2 y CDR3) de AB0024.

[0099] Por ejemplo, en una realización, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una región variable en la cadena pesada con las siguientes CDRs y regiones de armazón

interrumpiendo (correspondientes a las de AB0024, con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas):

[00100] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLE
WIGVINPGSGGTNYNEKFKGRATITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARN
WMNFDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 8).

[00101] En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena pesada con una secuencia de aminoácidos con el 75 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más o 99 % o más de homología con la SEQ ID NO: 8. En algunas formas de realización, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena pesada con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de región variable expuesta en la SEQ ID NO: 8.

[00102] En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena pesada con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 (QVQLVQSGAELKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVKQAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEK
FKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYFCARNWMNFDYWGQGTTVTVSS), SEQ ID NO: 11

(QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEK
FKGRATLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARNWMNFDYWGQGTTVTVSS) o SEQ ID NO: 12

(QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTYYLIEWVRQAPGQGLEWIGVINPGSGGTNYNEK
FKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNWMNFDYWGQGTTVTVSS) o un aminoácido que tiene 75 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más o 99 % o más de homología con la SEQ ID NO: 8, 10, 11 o 12, y / o región variable en la cadena ligera con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 o un aminoácido que tiene 75 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más o 99 % o más de homología con la SEQ ID NO: 9, 13 o 14.

[00103] En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo que tiene una región variable en la cadena ligera con los CDRs siguientes y regiones de armazón interrumpiendo (correspondientes a las de AB0024, con las secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 subrayadas):

[00104] DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLHSNGNTYLYWFLQKP
GQSPQFLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEY
PYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 9). En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos con el 75 % o más, 80 % o más, 90 % o más, 95 % o más o 99 % o más de homología con la SEQ

ID NO: 9. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena ligera con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de región variable expuesta en la SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene una región variable en la cadena pesada con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de región variable expuesta en la SEQ ID NO: 8 y una región variable en la cadena ligera con CDR1, CDR2 y / o CDR3 de la secuencia de la región variable mostrada en la SEQ ID NO: 9.

[00105] Si un agente inhibe la actividad enzimática de LOXL2 se puede determinar usando cualquier ensayo conocido. Por ejemplo, un ensayo para la actividad enzimática de LOXL2 puede llevarse a cabo utilizando diaminopentano (DAP) como un sustrato o usando colágeno como sustrato. En ambos ensayos, la actividad enzimática de LOXL2 se puede medir usando un ensayo que acopla la producción de peróxido de hidrógeno (liberado por LOXL2 sobre la desaminación de sustrato) con la conversión catalizada por la peroxidasa de rabanito de Amplex® Red (Invitrogen, Carlsbad, CA) hacia resorufina (un producto fluorescente).

[00106] En algunas realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado inhibe la actividad enzimática de un polipéptido LOXL2. En otras realizaciones, un anticuerpo anti-LOXL2 adecuado no inhibe la actividad enzimática de un polipéptido LOXL2.

[00107] Los anticuerpos anti- LOXL2 adecuados incluyen, por ejemplo, RPDS-1M1, RPDS-1M3, RPDS-1M8, RPDS-1M9, RPDS-1M11, RPDS – 1M15, RPDS-1M17, RPDS-1M19, RPDS-1M20 (AB0030), RPDS – 1M22, RPDS-1M24, RPDS-1M25, RPDS-1M27, RPDS-1M28, RPDS-1M29, RPDS – 1M30, RPDS-1M31, RPDS-1M32, RPDS-2M1, RPDS-2M2, RPDS-2M3, RPDS-2M4, RPDS-2M5, RPDS-2M6, RPDS-2M7, RPDS-2M8, RPDS-2M9, RPDS-2M10, RPDS-2M11, RPDS-2M12, RPDS-2M13, RPDS-2M14, RPDS-2M15, RPDS-2M16, RPDS-2M17, RPDS-2M18 y RPDS-2M19, estando dichos anticuerpos descritos en la Solicitud de Patente de EE.UU. N° de Serie 13 / 021, 555. Anticuerpos monoclonales RPDS-1M1, RPDS-1M3, RPDS-1M8, RPDS-1M9, RPDS-1M11, RPDS – 1M15, RPDS-1M17, RPDS-1M19, RPDS-1M20 (AB0030), RPDS – 1M22, RPDS-1M24, RPDS-1M25, RPDS-1M27, RPDS-1M28, RPDS-1M29, RPDS – 1M30, RPDS-1M31, RPDS-1M32, RPDS-2M1, RPDS-2M2, RPDS-2M3, RPDS-2M4, RPDS-2M5, RPDS-2M6, RPDS-2M7, RPDS-2M8, RPDS-2M9, RPDS-2M10, RPDS-2M11, RPDS-2M12, RPDS-2M13, RPDS-2M14, RPDS-2M15, RPDS-2M16, RPDS-2M17, RPDS-2M18 y RPDS-2M19 unido al dominio catalítico de LOXL2 .

Formatos de ensayo

[00108] Un ensayo de la invención para la detección de LOXL2 circulante en un individuo implica generalmente: a) poner en contacto una muestra líquida obtenida del individuo con un anticuerpo específico para LOXL2, y b) detectar la unión del anticuerpo con LOXL2 presente en la muestra de líquido. Métodos de ensayo adecuados incluyen un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA por sus siglas en inglés, un radioinmunoensayo (RIA por sus siglas en inglés), un ensayo de inmunoprecipitación, un ensayo de flujo lateral o axial, espectrometría de masas y similares.

[00109] Un método de ensayo de la invención puede detectar LOXL2 en una muestra líquida a 175 pg/ml o menos, por ejemplo, un método de ensayo de la invención puede detectar LOXL2 en una muestra líquida de aproximadamente 150 pg/ml a aproximadamente 175 pg/ml, de aproximadamente 125 pg/ml a aproximadamente 150 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 125 pg/ml, de aproximadamente 75 pg/ml a aproximadamente 100 pg/ml, de aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 75 pg/ml, o desde aproximadamente 40 ug/ml a aproximadamente 50 pg/ml. Por ejemplo, un método de ensayo de la invención puede detectar LOXL2 en una muestra líquida cuando el LOXL2 está presente en la muestra líquida en una concentración de menos de 10 ng/ml, por ejemplo, en una concentración de aproximadamente 10 ng/ml a aproximadamente 5 ng/ml, de aproximadamente 5 ng/ml a aproximadamente 1 ng/ml, de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 500 pg/ml, de aproximadamente 500 pg/ml a aproximadamente 400 pg/ml, de aproximadamente 400 pg/ml a aproximadamente 300 pg/ml, de aproximadamente 300 pg/ml a aproximadamente 200 pg/ml, de aproximadamente 200 pg/ml a aproximadamente 175 pg/ml, de aproximadamente 200 pg/ml a aproximadamente 150 pg/ml, de aproximadamente 150 pg/ml a alrededor de 100 pg/ml, de aproximadamente 100 pg/ml a aproximadamente 75 pg/ml, desde 75 ug / ml a aproximadamente 50 pg/ml, o desde aproximadamente 50 pg/ml a aproximadamente 40 pg/ml. En algunos casos, un método de ensayo de la invención detecta LOXL2 en una muestra líquida cuando el LOXL2 está presente en la muestra de líquido en un intervalo de concentración de aproximadamente 175 pg/ml a aproximadamente 5 ng/ml (o más de 5 ng/ml). En algunos casos, un método de ensayo de la invención detecta LOXL2 en una muestra líquida cuando el LOXL2 está presente en la muestra de líquido en un intervalo de concentración desde aproximadamente 40 pg/ml a aproximadamente 5 ng/ml (o más de 5 ng/ml). En algunos casos, un método de ensayo de la invención

detecta a LOXL2 en una muestra líquida a un límite de detección del fondo promedio más 2.5 x DE (desviación estándar del fondo).

[00110] En algunos casos, un método de ensayo de la invención implica el uso de dos anticuerpos LOXL2-específicos. Los dos anticuerpos LOXL2-específicos pueden ser ambos anticuerpos monoclonales; los dos anticuerpos LOXL2-específicos pueden ser un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal, o cualquier combinación similar.

[00111] Por ejemplo, un primer anticuerpo LOXL2-específico se pone en contacto con una muestra líquida, donde el primer anticuerpo LOXL2-específico forma un complejo con el LOXL2 presente en la muestra líquida. El primer anticuerpo LOXL2-específico puede ser inmovilizado sobre un soporte insoluble, de tal manera que el primer complejo anticuerpo LOXL2-específico / LOXL2 se inmoviliza sobre el soporte insoluble. Alternativamente, el primer anticuerpo LOXL2-específico puede estar en solución, y el primer complejo anticuerpo LOXL2-específico / LOXL2 puede ser insoluble, de tal manera que los primeros complejos inmunoprecipitados anticuerpo LOXL2-específico /LOXL2. El primer complejo anticuerpo LOXL2-específico /LOXL2 puede ser detectado usando un segundo anticuerpo LOXL2-específico. En algunos casos, el primer anticuerpo LOXL2-específico es un anticuerpo policlonal, y el segundo anticuerpo LOXL2-específico es un anticuerpo monoclonal.

[00112] En algunas realizaciones, un método de ensayo de la invención implica poner en contacto una muestra líquida, obtenida de un individuo, con un anticuerpo LOXL2-específico inmovilizado, en el que el anticuerpo LOXL2-específico inmovilizado se inmoviliza en un soporte insoluble. Cualquier LOXL2 presente en la muestra se unirá al anticuerpo LOXL2-específico inmovilizado, formando un complejo anti-LOXL2 inmovilizado / LOXL2. El complejo anti-LOXL2 inmovilizado / LOXL2 se puede detectar utilizando un segundo (no inmovilizado) anticuerpo LOXL2-específico. El segundo anticuerpo-LOXL2 específico puede ser marcado (etiquetado) de manera detectable, o se puede detectar utilizando un anticuerpo secundario marcado de forma detectable.

[00113] Por lo tanto, en algunas realizaciones, un método de la invención de detección de LOXL2 circulante en un individuo implica: a) poner en contacto una muestra líquida obtenida del individuo con un primer anticuerpo específico para LOXL2, de tal manera que el primer anticuerpo y el LOXL2 forman un complejo; b) poner en contacto el primer complejo de anticuerpo LOXL2 / LOXL2 con un segundo

anticuerpo específico para LOXL2, y c) detectar la unión del segundo anticuerpo al primer complejo de anticuerpo LOXL2 / LOXL2.

[00114] El soporte insoluble puede ser uno o más pocillos de una placa de múltiples pocillos, una tira de prueba, un formato de varilla de nivel, y similares. En cualquiera de los formatos de ensayo descritos anteriormente, uno o más pasos de lavado pueden llevarse a cabo para eliminar los componentes no unidos.

[00115] Un método de ensayo de la presente descripción puede detectar un nivel patológico de LOXL2 circulante en un individuo. Por ejemplo, un método de ensayo de la invención puede implicar: a) poner en contacto una muestra líquida obtenida de un individuo con un anticuerpo específico para LOXL2; b) detectar la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, y c) comparar el nivel detectado con el valor normal del control. Un nivel detectado que es mayor que el valor normal del control es indicativo de patología (por ejemplo, cáncer o fibrosis).

Valores Control

[00116] Niveles de LOXL2 en una muestra líquida obtenida a partir de un sujeto de prueba pueden ser comparados con valor(es) normales o rangos de valores control normales. El valor control puede estar basado en niveles de LOXL2 en muestras comparables (por ejemplo, muestra de sangre, plasma, o suero, u otro líquido biológico) obtenido a partir de una población control, por ejemplo, la población general o una población seleccionada de seres humanos. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar conformada de sujetos aparentemente sanos, por ejemplo, individuos que no tienen síntomas o signos previos de fibrosis o cáncer. Los sujetos aparentemente sanos no exhiben síntomas de la enfermedad. En otras palabras, tales individuos, si son examinados por un profesional médico, pueden ser caracterizados como sanos y libres de síntomas de enfermedad.

[00117] El valor control puede tomar una variedad de formas. El valor control puede ser un único valor de corte, tal como la mediana o media. Un valor control normal puede ser un rango de control.

[00118] En algunos casos, el control, valor normal está por debajo del límite de detección de un método de ensayo en un sujeto, por ejemplo, un valor normal puede ser menor a aproximadamente 175 pg/ml, menor a aproximadamente 150 pg/ml, menor que aproximadamente 100 pg/ml, menor que aproximadamente 75 pg/ml, menor que aproximadamente 50 pg/ml, o menor que aproximadamente 40 pg/ml.

Los sujetos de prueba

[00119] Como se señaló anteriormente, una muestra líquida obtenida de un individuo se prueba utilizando un ensayo de sujetos LOXL2. Los individuos que son adecuados para probar un ensayo dado incluyen, pero no están limitados a, las personas que aún no han sido diagnosticados con una enfermedad, sino que se presentan con síntomas y / o quejas de un médico (por ejemplo, los individuos con un trastorno no diagnosticado o enfermedad), los individuos que han sido diagnosticados con cáncer; individuos con sospecha de cáncer, pero que aún no han sido diagnosticados con cáncer; personas aparentemente sanas y que son sometidos a un cribado de rutina, los individuos que han sido diagnosticados de fibrosis; individuos con sospecha de fibrosis, pero que aún no han sido diagnosticados con fibrosis; individuos que han sido diagnosticados con el virus de la hepatitis C (VHC), tales como la hepatitis C crónica, o un virus de la hepatitis B (VHB), como la crónica VHB (CHB), y las personas que están en tratamiento por un cáncer o una enfermedad fibrótica.

Los pacientes oncológicos

[00120] Los individuos que son adecuados para probar el uso de un ensayo de sujetos LOXL2 incluyen individuos que han sido diagnosticados de cáncer incluyen los individuos que tienen un tumor benigno, los individuos que tienen un tumor primario, los individuos que tienen la metástasis del tumor, y los individuos que tienen un tipo de tumor no sólido de cáncer. Los individuos que son adecuados para probar el uso de un ensayo de sujetos LOXL2 incluyen individuos que tienen un cáncer, pero que aún no han sido diagnosticados con cáncer. Por lo tanto, los individuos que son adecuados para el ensayo de sujetos LOXL2 incluyen individuos que tienen una amplia variedad de cánceres, incluyendo carcinomas, sarcomas, leucemias, y linfomas.

[00121] Los carcinomas incluyen, pero no se limitan a, carcinoma esofágico, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células basales (una forma de cáncer de piel), carcinoma de células escamosas (diversos tejidos), carcinoma de vejiga, incluyendo carcinoma de células transicionales (un neoplasma maligno de la vejiga), carcinoma broncogénico, carcinoma de colon, carcinoma colorrectal, carcinoma gástrico, carcinoma de pulmón, incluyendo carcinoma de células pequeñas y no pequeñas de carcinoma de células de pulmón, carcinoma de la corteza suprarrenal, carcinoma de tiroides, carcinoma pancreático, carcinoma de mama, carcinoma de ovario, carcinoma de próstata, adenocarcinoma, sudor carcinoma de la glándula, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, cistoadenocarcinoma, carcinoma

medular, carcinoma de células renales, carcinoma ductal in situ o carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, carcinoma de cuello uterino, carcinoma de útero, carcinoma testicular, el carcinoma osteogénico, carcinoma epitelial, y el carcinoma nasofaríngeo, etc.

[00122] Los sarcomas incluyen, pero no están limitados a, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, cordoma, sarcoma osteogénico, osteosarcoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, sarcoma de Ewing, el leiomiosarcoma, rhabdomyosarcoma, y otros sarcomas de tejidos blandos.

[00123] Los tumores sólidos incluyen, pero no se limitan a, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma.

[00124] Las leucemias incluyen, pero no se limitan a, a) síndromes mieloproliferativos crónicos (trastornos neoplásicos de células madre hematopoyéticas multipotenciales); b) leucemias mielógenas agudas (transformación neoplásica de una célula madre hematopoyéticas multipotencial o una célula hematopoyética de potencial de linaje restringido; c) crónica leucemias linfocíticas (CLL; proliferación clonal de linfocitos pequeños inmunológicamente inmaduros y funcionalmente incompetentes), incluyendo CLL de células B, leucemia de células T prolinfocítica CLL, y leucemia de células pilosas, y d) leucemias linfoblásticas agudas (caracterizadas por la acumulación de linfoblastos). Los linfomas incluyen, pero no se limitan a, linfomas de células B (por ejemplo, linfoma de Burkitt); linfoma de Hodgkin, y similares.

[00125] Los tumores benignos incluyen, por ejemplo, hemangiomas, adenoma hepatocelular, hemangioma cavernoso, hiperplasia nodular focal, neuromas acústicos, neurofibroma, adenoma hepático, cistoma conducto biliar, fibroma, lipomas, leiomiomas, mesoteliomas, teratomas, mixomas, hiperplasia nodular regenerativa, tracomias y piógeno granulomas.

[00126] Los tumores primarios y metastásicos incluyen, por ejemplo, cáncer de pulmón (incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma bronquioloalveolar, Carcinoma de células no pequeñas, carcinoma de células pequeñas, mesotelioma); cáncer de mama (incluyendo, pero no limitado a, carcinoma ductal, carcinoma lobular, cáncer de mama inflamatorio; carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso); cáncer

colorrectal (incluyendo, pero no limitado a, cáncer de colon, cáncer de recto); cáncer anal, cáncer de próstata;; cáncer de páncreas (incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma de células de los islotes, tumores neuroendocrinos) carcinoma de ovario (incluyendo, pero no limitado a, carcinoma epitelial de ovario o de la superficie del tumor epitelial-estromal incluyendo tumor seroso, endometrioide del tumor y cistoadenocarcinoma mucinoso, Tumor estromal de los cordones sexuales); hígado y carcinoma de conducto biliar (incluyendo, pero no limitado a, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, hemangioma); Carcinoma de esófago (incluyendo, pero no limitado a, el adenocarcinoma de esófago y carcinoma de células escamosas); linfoma de no Hodgkin; carcinoma de vejiga; carcinoma del útero (incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinoma de endometrio, carcinoma seroso papilar uterino, carcinoma uterino de células claras, sarcomas uterinos y leiomiosarcomas, tumores de Muller mixtos); glioma, glioblastoma, meduloblastoma, y otros tumores del cerebro; cánceres de riñón (incluyendo, pero no limitados a, carcinoma de células renales, carcinoma de células claras, tumor de Wilm); cáncer de la cabeza y el cuello (incluyendo, pero no limitado a, carcinomas de células escamosas); cáncer del estómago (incluyendo, pero no limitado a, adenocarcinoma de estómago, tumor del estroma gastrointestinal), mieloma múltiple, cáncer testicular, tumor de células germinales; tumor neuroendocrino; cáncer de cuello uterino; carcinoides del tracto gastrointestinal, de mama, y otros órganos, y el carcinoma de células en anillo de sello.

[00127] En algunos casos, un paciente oncológico es el que actualmente está en fase de tratamiento para el cáncer. En algunos casos, el tratamiento comprende la administración de un agente que inhibe la actividad enzimática de un polipéptido LOXL2. Los agentes que inhiben la actividad enzimática LOXL2 incluyen un inhibidor alostérico de la actividad enzimática LOXL2. En algunos casos, el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2 que se une a un epítipo dentro de un dominio de LOXL2 "SRCR3-4". Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad enzimática LOXL2, y que se une a un epítipo dentro de un dominio SRCR3-4, son AB0023 y AB0024; véase, por ejemplo, EE.UU. 2009/0053224.

Epitelio-mesenquimal transición

Los individuos que son adecuados para probar el uso de un método de ensayo incluyen individuos en los que se ha llevado a cabo la transición epitelio-mesenquimal (EMT) de

las células epiteliales. Los individuos que son adecuados para probar el uso de un método de ensayo incluyen individuos en los que se ha producido la activación de desmoplasia y fibroblastos (que se consideran factores en la generación de un microambiente patológico de los tumores y enfermedad fibrótica). Estos individuos pueden tener células precancerosas y / o estar en una etapa temprana del desarrollo del cáncer.

Fibrosis

[00128] Los individuos que son adecuados para probar el uso de un método de ensayo LOXL2 incluyen a individuos que han sido diagnosticados de fibrosis (una enfermedad fibrótica), por ejemplo, la fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, la fibrosis cardíaca, u otro tipo de fibrosis. Los individuos que son adecuados para probar el uso de un método de ensayo LOXL2 incluyen individuos que tienen una enfermedad fibrótica (por ejemplo, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, la fibrosis cardíaca, u otro tipo de fibrosis), pero que aún no han sido diagnosticados como que tienen la enfermedad fibrótica.

[00129] En algunos casos, un sujeto de prueba adecuado tiene una forma avanzada de la fibrosis, pero todavía podría ser adecuado para el tratamiento con un régimen de tratamiento para la fibrosis. Por ejemplo, un sujeto de prueba adecuado incluye un tema con (no en etapa terminal) fibrosis activa. En algunos casos, un sujeto de prueba adecuado es aquel que tiene fibrosis, y que podría anticiparse a experimentar la progresión rápida de la enfermedad.

[00130] En algunos casos, una persona en la que se va a probar el uso de un ensayo de LOXL2 es la que actualmente está en tratamiento para una enfermedad fibrótica. En algunos casos, el tratamiento comprende la administración de un agente que inhibe la actividad enzimática de un polipéptido LOXL2. Los agentes que inhiben la actividad enzimática LOXL2 incluyen un inhibidor alostérico de la actividad enzimática LOXL2. En algunos casos, el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2 que se une a un epítipo dentro de un dominio de LOXL2 "SRCR3-4". Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad enzimática LOXL2, y que se une a un epítipo dentro de un dominio SRCR3-4, son AB0023 y AB0024; véase, por ejemplo, EE.UU. 2009/0053224.

La fibrosis hepática

[00131] La fibrosis del hígado está implicada en la patología de numerosas enfermedades hepáticas. La fibrosis puede ocurrir como una complicación de la hemocromatosis, enfermedad de Wilson, el alcoholismo, la esquistosomiasis, la hepatitis viral, la obstrucción de las vías biliares, la exposición a toxinas, y los trastornos metabólicos. Si no se controla, la fibrosis hepática progresa a cirrosis (definida por la presencia de nódulos encapsulados), insuficiencia hepática y la muerte.

[00132] La fibrosis hepática incluye, pero no se limita a, la cirrosis, y condiciones asociadas tales como la hepatitis viral crónica, la enfermedad no alcohólica del hígado graso (hígado graso no alcohólico), esteatohepatitis no alcohólica (ASH), esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), cirrosis biliar primaria (PBC), cirrosis biliar, colangitis esclerosante primaria, y la hepatitis autoinmune.

[00133] Los daños crónicos en el hígado a partir de fuentes tales como los parásitos y las infecciones virales (por ejemplo, virus de la hepatitis B (VHB), el VHC, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la esquistosomiasis) o el estrés a largo plazo por el consumo de alcohol por lo general resulta en la remodelación del hígado, presumiblemente para encapsular el área dañada y proteger el tejido hepático restante de los daños. (Li y Friedman, *Gastroenterol. Hepatol.* 14:618-633; 1999). Resultados de la fibrosis hepática en los cambios de la matriz extracelular, incluyendo 3-10 veces el aumento en el contenido total de colágeno y el reemplazo de la membrana basal de baja densidad con matriz de alta densidad, que perjudican la función metabólica y la síntesis de los hepatocitos, las células estrelladas hepáticas y células endoteliales. (Girogescu, M., *No invasiva de marcadores bioquímicos de la fibrosis hepática*, J. Gastrointestin. . Liver Dis, 15 (2): 149-159 (2006)).

[00134] Existe un número de sistemas de puntuación estandarizado que proporcionan una evaluación cuantitativa del grado y la gravedad de la fibrosis hepática. Estos incluyen el METAVIR, Knodell, Scheuer, Ludwig, y sistemas de puntuación Ishak. Los individuos con fibrosis hepática incluyen individuos con cualquier grado o la gravedad de la fibrosis hepática, sobre la base de cualquiera de los sistemas de puntuación Ishak, METAVIR, de Knodell, Scheuer, y Ludwig.

[00135] El sistema de puntuación METAVIR se basa en un análisis de las diversas características de una biopsia del hígado, incluyendo la fibrosis (fibrosis portal, fibrosis centrolobulillar y cirrosis); necrosis (poco sistemática y lobular necrosis, retracción acidófilo y degeneración en globo), inflamación (inflamación del tracto

portal, agregados linfoides portales, y la distribución de la inflamación portal), los cambios de las vías biliares, y el índice de Knodell (puntuaciones de necrosis periportal, necrosis lobular, inflamación portal, la fibrosis y la actividad general de la enfermedad). Las definiciones de cada etapa del sistema METAVIR son las siguientes: Puntuación: 0, sin fibrosis; score: 1, la ampliación estrellada del tracto portal, pero sin formación de septos; score: 2, la ampliación del espacio porta con la rara formación de septos; puntuación: 3, numerosos septos sin cirrosis, y puntaje: 4, cirrosis.

[00136] Sistema de puntuación de Knodell, también llamado el Índice de Actividad de Histología, clasifica las muestras basándose en los resultados en cuatro categorías de rasgos histológicos: I. periportal y / o necrosis puente; II. Degeneración intralobular y necrosis focal; III. Inflamación portal, y IV. Fibrosis. En el sistema de estadificación de Knodell, las puntuaciones son las siguientes: Puntuación: 0, sin fibrosis; score: 1, fibrosis leve (expansión fibrosa portal); score: 2, fibrosis moderada; score: 3, fibrosis severa (fibrosis en puente), y la puntuación : 4, cirrosis. Cuanto más alto sea el puntaje, más grave es el daño a los tejidos del hígado. Knodell (1981) Hepatol. 1:431.

[00137] Las puntuaciones del sistema de puntuación Scheuer, son las siguientes: Puntuación: 0, sin fibrosis; score: 1, tractos agrandados, fibróticos portales; Puntuación: 2, periportales o septos portal-portal, pero la arquitectura intacta; score: 3, fibrosis con distorsión de la arquitectura, pero no cirrosis obvia; score: cirrosis 4, probable o definitiva. Scheuer (1991) J. Hepatol. 13:372.

[00138] El sistema de puntuación de Ishak se describe en Ishak (1995) J. Hepatol. 22:696-699. Etapa 0, No fibrosis; Etapa 1, la expansión fibrosa de algunas áreas del portal, con o sin septos fibrosos corto, etapa 2, la expansión fibrosa de la mayoría de las áreas del portal, con o sin septos fibrosos corto, etapa 3, la expansión fibrosa de la mayoría de las áreas del portal con portal ocasional a portal (P-P) de conexión; etapa 4, la expansión fibrosa de las áreas del portal con puente marcada (P-P), así como el portal central (P-C); etapa 5, Marcado puente (P- -P y / o P-C) con nódulos ocasionales (cirrosis incompleta); fase 6, la cirrosis, probable o definitiva.

Fibrosis renal

[00139] Al igual que la fibrosis hepática, la fibrosis renal puede ser el resultado de diversas enfermedades y del daño a los riñones. Ejemplos de tales enfermedades y los daños incluyen la enfermedad renal crónica, síndrome metabólico, reflujo vesicoureteral, la fibrosis renal tubulointersticial, la diabetes (incluyendo nefropatía

diabética), y nefritis glomerular resultante (GN), incluyendo, pero no limitado a, glomeruloesclerosis segmentaria focal y glomerulonefritis membranosa, GN mesangiocapilar.

[00140] Se ha convertido en reconocido que el síndrome metabólico es un conjunto de anormalidades incluyendo características diabéticas tales como resistencia a la insulina, así como la obesidad central o visceral y la hipertensión. En casi todos los casos, la desregulación de los resultados de glucosa en la estimulación de la liberación de citocinas y la regulación positiva de la deposición de matriz extracelular. Los factores adicionales que contribuyen a la enfermedad renal crónica, la diabetes, el síndrome metabólico y la nefritis glomerular incluyen hiperlipidemia, hipertensión y proteinuria, todo lo cual resulta en un mayor daño a los riñones y estimular aún más la deposición de la matriz extracelular. Por lo tanto, independientemente de la causa primaria, los daños a los riñones pueden resultar en la fibrosis renal y la pérdida concomitante de la función renal. (Schena, F. y Gesualdo, L., *patógenos Mecanismos de la nefropatía diabética*, *J. Am. Soc. Nephrol*, 16: S30-33 (2005); Whaley-Connell, A., y Sembrador, JR, *enfermedad renal crónica y el síndrome cardiometabólico*, *J. Clin. Hypert*, 8 (8): 546-48 (2006)).

La fibrosis pulmonar

[00141] La fibrosis del pulmón incluye muchos síndromes y enfermedades. Enfermedades incluyen por ejemplo la fibrosis pulmonar idiopática (IPF), neumonía intersticial idiopática y síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA). La fibrosis pulmonar también incluye, pero no se limita a, la alveolitis fibrosante criptogénica, la neumonía intersticial fibrosante crónica, enfermedad pulmonar intersticial (ILD), y la enfermedad difusa del parénquima pulmonar (DPLD).

[00142] La patogénesis de la mayoría de las fibrosis pulmonares, incluyendo las enfermedades mencionadas anteriormente no son bien entendidas, sin embargo todas se caracterizan por una afluencia de células inflamatorias y un aumento posterior en la síntesis y deposición de matriz extracelular rica en colágeno. (Chua et al., *Am. J. Respir. Celular. Mol. Biol.*, 33:9-13 (2005); Tzortzaki et al, *J. Histochem. Y Cytochem*, 54 (6): 693-700 (2006); Armstrong et al, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 160: 1910-1915 (1999)).

[00143] IPF se caracteriza por la inflamación, y, finalmente, la fibrosis, de tejido pulmonar; aunque estos dos síntomas también pueden disociarse. La causa de la FPI es desconocida, ya que puede surgir ya sea de un trastorno autoinmune o como resultado

de la infección. Los síntomas de la IPF incluyen disnea (*es decir*, Falta de aire) que se convierte en el síntoma principal a medida que la enfermedad progresa, y tos seca. La muerte puede ser el resultado de la hipoxemia, insuficiencia cardíaca derecha, infarto de miocardio, embolia pulmonar, derrame cerebral o infección pulmonar, todo lo cual puede ser causado por la enfermedad.

[00144] En algunos casos, una persona en la que se va a probar el uso de un ensayo para sujetos LOXL2 es aquel que está actualmente en tratamiento para la FPI. En algunos casos, el tratamiento comprende la administración de un agente que inhibe la actividad enzimática de un polipéptido LOXL2. Los agentes que inhiben la actividad enzimática LOXL2 incluyen un inhibidor alostérico de la actividad enzimática LOXL2. En algunos casos, el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2 que se une a un epítipo dentro de un dominio de LOXL2 "SRCR3-4". Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad enzimática LOXL2, y que se une a un epítipo dentro de un dominio SRCR3-4, son AB0023 y AB0024; véase, por ejemplo, EE.UU. 2009/0053224.

La mielofibrosis

[00145] Procesos patogénicos en la mielofibrosis primaria implican un trastorno ponderado mieloproliferativo clonal de megacariocitos primario y una reacción estromal paraneoplásico que incluye fibrosis de médula ósea, osteoesclerosis, la angiogénesis, y la hematopoyesis extramedular. La reacción de la médula ósea incluye el exceso de deposición de proteínas de la matriz extracelular tales como colágeno fibrilar, hipocelularidad, la activación y el reclutamiento de fibroblastos de médula ósea, de citoquinas y factor de crecimiento de la producción excesiva y otros cambios que resultan en una reducción de la capacidad hematopoyética. Mielofibrosis secundaria puede ser el resultado de la policitemia vera rubra o trombocitosis esencial.

Individuos sometidos a tratamiento

[00146] En algunos casos, una persona que va a probar el uso de un ensayo para sujetos LOXL2 es la que actualmente está en tratamiento para una enfermedad fibrótica o por un cáncer. En algunos casos, el tratamiento comprende la administración de un agente que inhibe la actividad enzimática de un polipéptido LOXL2. Los agentes que inhiben la actividad enzimática LOXL2 incluyen un inhibidor alostérico de la actividad enzimática LOXL2. En algunos casos, el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2 que se

une a un epítopo dentro de un dominio SRCR3-4 de LOXL2. Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad enzimática LOXL2, y que se une a un epítopo dentro de un dominio SRCR3-4, son AB0023 y AB0024; véase, por ejemplo, EE.UU. 2009/0053224.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

[00147] La presente descripción proporciona varios métodos de diagnóstico para enfermedades y condiciones asociadas con LOXL2, incluyendo enfermedades y condiciones asociadas con o caracterizadas por niveles elevados de LOXL2, tales como LOXL2 distribuido elevado. Por ejemplo, se proporcionan métodos para determinar si un individuo tiene una enfermedad caracterizada por el elevado LOXL2 circulante. También se proporcionan métodos para evaluar la actividad o gravedad de una enfermedad o condición. Los métodos de diagnóstico generalmente implican la detección de un nivel de circulación LOXL2 en el individuo, usando un método de ensayo LOXL2, como se describió anteriormente. Las enfermedades caracterizadas por elevado LOXL2 circulantes incluyen el cáncer y fibrosis.

[00148] El nivel de LOXL2 en una muestra dada puede expresarse en términos de concentración, en peso, o de otra lectura de un ensayo de detección como se describe en el presente documento. En un aspecto, un nivel de LOXL2 que es mayor que un nivel de control normal o de otro nivel de referencia que circula indica que el individuo tiene una enfermedad caracterizada por elevado LOXL2 circulante. Por ejemplo, un nivel de LOXL2 que es al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 25%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, o más de 50% circulantes, más alto que un control normal u otro nivel de referencia, puede indicar que la persona tiene una enfermedad que se caracteriza por niveles circulantes de LOXL2 elevados. Como otro ejemplo, un nivel de circulación LOXL2 que es mayor de aproximadamente 40 pg/ml, más de aproximadamente 50 pg/ml, más de aproximadamente 75 pg/ml, más de aproximadamente 100 pg/ml, más de aproximadamente 150 pg/ml, mayor de aproximadamente 175 pg/ml, más de aproximadamente 200 pg/ml, más de aproximadamente 250 pg/ml, más de aproximadamente 300 pg/ml, más de aproximadamente 350 pg/ml, más de aproximadamente 400 pg/ml, más de aproximadamente 450 pg/ml, más de aproximadamente 500 pg/ml, más de aproximadamente 550 pg/ml, más de aproximadamente 600 pg/ml, más de aproximadamente 650 pg/ml, más de aproximadamente 700 pg/ml, más de aproximadamente 750 pg/ml, o mayor de aproximadamente 800 pg/ml, pueden indicar

que el individuo tiene una enfermedad caracterizada por elevado LOXL2 circulante, y / o dar información de pronóstico o predictivo sobre la enfermedad o condición, tal como mediante la indicación de la enfermedad activa o un nivel particular de actividad. En algunos casos, el nivel indica la fibrogénesis activa en el sujeto. Tal como se usa aquí, los términos "nivel normal de control", y "nivel de referencia", en el contexto de LOXL2, se refieren al nivel de LOXL2 a la que el nivel LOXL2 en una muestra, *por ejemplo*, Una muestra de prueba, se compara. En un ejemplo, el control normal o nivel de referencia es un nivel observado generalmente en una muestra de un individuo sano, tal como un individuo que no tiene la enfermedad o condición sujeta, *por ejemplo*, Enfermedad o afección asociada-LOXL2. En otro ejemplo, se trata de un nivel observado en un individuo que tiene una enfermedad o condición asociada-LOXL2, tales como un individuo con la enfermedad menos activa, un pronóstico relativamente mejor, o de las posibilidades más favorables asociadas a un resultado particular, punto final, o evento, tales como la supervivencia o la capacidad de respuesta al tratamiento. Por ejemplo, la referencia o nivel de control normal puede ser un nivel observado en un punto de tiempo particular, tal como un nivel de línea de base, en una muestra de un individuo que en última instancia mostró un resultado favorable, punto final, o evento. En otro ejemplo, el nivel de control o de referencia normal es un nivel observado en una muestra tomada del mismo individuo, en un punto de tiempo diferente en comparación con la muestra que se está ensayando, por ejemplo, un nivel de línea de base, antes del tratamiento, o de un nivel anterior en la progresión de la enfermedad o antes de que se detecta la enfermedad. En otro ejemplo, el nivel normal o de referencia es un nivel estándar, tal como un nivel en una muestra preparada para tener una concentración de LOXL2 pre-definida o simplemente un nivel pre-definido. Como se usa aquí, "línea de base" se refiere a una cantidad, nivel, o la medición de una variable en particular en un punto en el tiempo que es anterior a un evento o período determinado, tal como un punto en el tiempo antes del tratamiento o antes del comienzo de una progresión de la enfermedad de monitoreo estudio. Por lo tanto, en un aspecto, la referencia o nivel de control normal de LOXL2 es un nivel de línea de base, tales como un nivel de línea de base del mismo individuo o de otro individuo.

Los valores de control

[00149] Los niveles de LOXL2 en una muestra líquida obtenida de un sujeto de prueba se pueden comparar con un valor normal de control (s) o el rango de valores de control normales. El valor de control se puede basar en los niveles de LOXL2 en

muestras comparables (por ejemplo, sangre, plasma, o muestra de suero, u otra muestra biológica líquida) obtenido de una población de control, por ejemplo, la población en general o una población seleccionada de sujetos humanos. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar compuesta de sujetos aparentemente sanos, por ejemplo, las personas que no han tenido previamente algún signo o síntoma de fibrosis o cáncer. No se descarta que individuos aparentemente sanos también, en general presenten síntomas de la enfermedad. En otras palabras, estas personas, en caso de ser examinados por un profesional de la medicina, se caracterizan por ser sanos y libres de síntomas de la enfermedad. Por otra parte, los valores catastrales se pueden comparar con otros valores de referencia, como un promedio, media, o el valor o valores observados para una población de sujetos que tienen una enfermedad o afección particular promedio. Por ejemplo, un valor como referencia se puede utilizar en comparación con los niveles evaluados para individuos particulares que a continuación se determinan que, por ejemplo, tienen la enfermedad más activa en comparación con la cohorte total de pacientes de los que se obtuvo el valor de referencia.

[00150] El valor de control puede tomar una variedad de formas. El valor de control puede ser un solo valor de corte, tales como la mediana o la media. Un valor normal de control puede ser un rango de control normal.

Los individuos que se probarán

[00151] Los sujetos de prueba incluyen los enumerados anteriormente. Los individuos que son adecuados para probar el uso de un ensayo de sujetos incluyen, pero no están limitados a, las personas que aún no han sido diagnosticadas con una enfermedad, sino que se presentan con síntomas y / o quejas donde un médico (por ejemplo, los individuos con un trastorno no diagnosticado o enfermedad), los individuos que han sido diagnosticados con cáncer; individuos con sospecha de cáncer, pero que aún no han sido diagnosticados con cáncer; personas aparentemente sanas y que son sometidos a cribado de rutina, los individuos que han sido diagnosticados de fibrosis; individuos con sospecha de fibrosis, pero que aún no han sido diagnosticados con fibrosis; individuos que han sido diagnosticados con el virus de la hepatitis C (VHC) o hepatitis B virus (VHB) (y opcionalmente también con diagnóstico de infección por el VHC o el VHB daño hepático asociado a la infección), y las personas que están en tratamiento por un cáncer o una enfermedad fibrótica.

[00152] En algunos casos, la persona a ser probada es un individuo con un trastorno no diagnosticado o enfermedad, por ejemplo, un individuo que se presenta con

síntomas y / o quejas. Un método de diagnóstico puede ser utilizado para determinar si tal individuo podría tener una enfermedad fibrótica o un cáncer. Un método de diagnóstico dado puede ser parte del diagnóstico diferencial, y en algunos casos puede ser utilizado en conjunción con una o más pruebas de diagnóstico, por ejemplo, para confirmar o descartar un diagnóstico.

Generación de un informe

[00153] Un método de diagnóstico dado puede incluir la generación de un informe que proporciona una indicación en cuanto a si un individuo es probable que tenga una enfermedad fibrótica o un cáncer. Tal informe puede incluir información tal como una recomendación sobre la evaluación adicional; una recomendación sobre el tratamiento terapéutico de drogas, y similares.

[00154] Un informe dado puede incluir, además, uno o más de: 1) la información del proveedor de servicios, 2) datos de los pacientes, y 3) los datos sobre el nivel de LOXL2; 4) el seguimiento de las recomendaciones de evaluación, y 5) el tratamiento terapéutico de drogas, y 6) otras características .

Una evaluación más profunda

[00155] Sobre la base de la detección de un nivel de LOXL2, y / o en base a un informe (como se describió anteriormente), un médico u otro personal médico calificado puede determinar si se requiere una evaluación adicional del sujeto de prueba (el paciente). Evaluaciones posteriores pueden incluir, por ejemplo, pruebas de función pulmonar (por ejemplo, los que se sospeche la fibrosis pulmonar), pruebas de función hepática (por ejemplo, los que se sospeche la fibrosis hepática), y diversas pruebas para el cáncer, que las pruebas pueden variar, dependiendo del tipo de cáncer sospecha.

[00156] Como un ejemplo, cuando se sospecha que un individuo sufre de un cáncer, se pueden llevar a cabo cualquiera de una variedad de pruebas para el cáncer, de estas pruebas se incluyen, por ejemplo, análisis histoquímicos de una biopsia de tejido para determinar la presencia de células cancerosas, las pruebas para la presencia de un antígeno asociado a un tumor, y similares.

[00157] Como otro ejemplo, cuando se sospecha que un individuo tiene un trastorno fibrótico pulmonar, se puede evaluar al individuo para buscar los síntomas de la enfermedad pulmonar fibrótica. Los síntomas de un trastorno fibrótico pulmonar pueden incluir, pero no se limitan a, disminución del peso corporal, el aumento de peso del pulmón, fibrosis pulmonar, la arquitectura de pulmón patológico (*por ejemplo*, Pulmón "nido de abeja"), aumento de la puntuación de Ashcroft, el aumento de los

niveles de colágeno pulmonar, aumento del número de CD45 + / + células de colágeno, la proliferación de neumocitos y la expansión y aumento del número de leucocitos en el líquido de lavado broncoalveolar (BAL). Los síntomas también pueden incluir, por ejemplo, aumento de los niveles pulmonares de una o más de las siguientes moléculas: LOXL2, α -actina de músculo liso (α -SMA), factor de crecimiento transformante β -1 (TGF-1), factor derivado del estroma-1 (SDF-1) (*por ejemplo*, SDF-1 α), endotelina-1 (ET-1) y fosforilado SMAD2.

[00158] Como un ejemplo adicional, donde se sospecha que un individuo puede tener la fibrosis hepática, el individuo se puede evaluar para los marcadores de la función hepática. Las funciones del hígado incluyen, pero no se limitan a, la síntesis de proteínas tales como proteínas séricas (por ejemplo, albúmina, factores de coagulación, fosfatasa alcalina, aminotransferasas (por ejemplo, alanina transaminasa, aspartato transaminasa), 5'-nucleosidasa, γ -glutaminyltranspeptidase, etc.), síntesis de bilirrubina, síntesis de colesterol y síntesis de ácidos biliares; una función metabólica hepática, incluyendo, pero no limitado a, metabolismo de los carbohidratos, metabolismo de aminoácidos y amoníaco, el metabolismo hormonal, y metabolismo de los lípidos; desintoxicación de fármacos exógenos; la función hemodinámica, incluyendo la hemodinámica esplácnica y portal, y similares. Por ejemplo, se miden los niveles de alanina aminotransferasa (ALT), utilizando ensayos estándar. En general, un nivel de ALT de menos de aproximadamente 45 unidades internacionales se considera normal. Niveles elevados de ALT pueden indicar función hepática comprometida. Pruebas cuantitativas de la reserva funcional hepática también se pueden utilizar para evaluar la función del hígado, donde tales pruebas incluyen, por ejemplo, el despacho de indocianina verde (ICG), la capacidad de eliminación de la galactosa (GEC), prueba de aliento aminopirina (ABT), el aclaramiento de antipirina, monoetilglicina-xilidida (MEG-X) de espacio, y el aclaramiento de la cafeína.

Terapia

[00159] Sobre la base de la detección de un nivel de LOXL2, y / o en base a un informe (como se describió anteriormente), un médico u otro personal médico calificado puede determinar si se recomienda el tratamiento farmacológico terapéutico apropiado, por ejemplo, para tratar una enfermedad fibrótica, para tratar un cáncer, etc.

[00160] Por ejemplo, un individuo que se ha determinado que tienen un cáncer en etapa temprana, a partir de los niveles circulantes de LOXL2 y, opcionalmente, en una evaluación adicional (por ejemplo, análisis histoquímico de una biopsia de tejido), se

puede iniciar en un régimen de medicamentos de quimioterapia de cáncer y / o pueden ser tratados con la terapia de radiación y / o puede someterse a la eliminación quirúrgica del cáncer.

[00161] Agentes quimioterapéuticos contra el cáncer ("agentes quimioterapéuticos") incluyen fármacos citotóxicos y citostáticos. Quimioterapéuticos pueden incluir aquellos que tienen otros efectos sobre las células tales como la reversión del estado transformado a un estado diferenciado o aquellos que inhiben la replicación celular. Los ejemplos de agentes citotóxicos conocidos figuran, por ejemplo, en Goodman et al., "Las bases farmacológicas de la terapéutica", sexta edición, AB Gilman et al., Eds. / Macmillan Publishing Co. Nueva York, 1980. Estos incluyen los taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel; de nitrógeno tales como mecloretamina, melfalán, mostaza de uracilo y clorambucilo; derivados de etilenimina, tales como tiotepa; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán; nitrosoureas, tales como lomustina, semustina y estreptozocina; triazenos, tales como dacarbazina; análogos de ácido fólico, tales como metotrexato; análogos de pirimidina, tales como fluorouracilo, citarabina y azaribina; análogos de la purina tales como mercaptopurina, y tioguanina; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina; antibióticos, tales como dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, y mitomicina; complejos metálicos, tales como complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino; urea sustituida, tales como hidroxiurea, derivados de metilhidrazina como la procarbazina; supresores adrenocorticales, tales como el mitotano; hormonas y antagonistas, tales como adrenocortisteroids (prednisona), progestinas (caproato de hidroxiprogesterona, acetato y acetato de megestrol), estrógenos (dietilestilbestrol y etinil estradiol) y andrógenos (propionato de testosterona y fluoximesterona).

[00162] Como otro ejemplo, un individuo que se ha determinado que tiene IPF, por ejemplo, con base en los niveles circulantes de LOXL2 y, opcionalmente, en una evaluación adicional (por ejemplo, pruebas de función pulmonar), puede ser tratado con un tratamiento farmacéutico para la FPI y / u otro tratamiento para IPF. El tratamiento primario para la FPI es farmacéutico, los fármacos más comunes utilizados para el tratamiento de IPF son los corticosteroides (*por ejemplo*, prednisona), penicilamina, y varios neoplásicos (*anti-por ejemplo*, Ciclofosfamida, azatiporene, clorambucilo, vincristina y colchicina). Otros tratamientos incluyen la administración de oxígeno y, en casos extremos, el trasplante de pulmón.

[00163] Como un ejemplo adicional, un individuo para el que se ha determinado que tiene fibrosis hepática, sobre la base de los niveles circulantes de LOXL2 y, opcionalmente, en una evaluación adicional (por ejemplo, funciones hepáticas pruebas; pruebas para la infección con el VHC, VHB, etc.), puede ser tratado con, por ejemplo, un agente anti-viral, por ejemplo, un agente adecuado para el tratamiento de una infección por VHC o VHB u otra infección por virus de la hepatitis. Por ejemplo, una infección por VHC puede ser tratado con un alfa-interferón (IFN- α), viramidina, ribavirina, levovirina, un inhibidor de NS3 del VHC, un inhibidor de NS5B del VHC, o combinaciones de uno o más de los anteriores.

MÉTODOS PARA EL MONITOREO DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO

[00164] La presente descripción proporciona métodos para el seguimiento de la eficacia del tratamiento para el elevado LOXL2 circulante, el método generalmente implica la determinación de un nivel LOXL2 que circula en el individuo en un punto de tiempo, el uso de un ensayo LOXL2 dado. En un aspecto, un nivel de LOXL2 en la muestra que es menor que un nivel obtenido en un punto de tiempo antes de que el individuo enferme indica la eficacia del tratamiento. En otro aspecto, un nivel más bajo en comparación con un control o muestra de referencia indica la eficacia del tratamiento. En otro aspecto, el nivel de LOXL2, *por ejemplo*, un alto nivel de LOXL2, indica que una persona va a responder favorablemente al tratamiento, tales como un tratamiento de terapia blanco para LOXL2.

[00165] Por ejemplo, un nivel circulante de LOXL2 se determina en un primer punto de tiempo y en un segundo punto en el individuo, en el que el segundo punto de tiempo es más tarde que el punto de tiempo de la primera vez. El primer punto de tiempo puede ser antes del inicio del tratamiento, y el segundo punto de tiempo puede ser durante el tratamiento (por ejemplo, después de que haya comenzado un régimen de tratamiento). El primer punto de tiempo puede ser durante el tratamiento, y el segundo punto de tiempo puede ser en otro momento durante el tratamiento. El segundo punto de tiempo puede ser de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 año después de la primera punto de tiempo, por ejemplo, el segundo punto de tiempo puede ser de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas, de alrededor de 4 horas a aproximadamente 8 horas, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 16 horas, desde aproximadamente 16 horas a aproximadamente 24 horas, desde aproximadamente 24 horas a aproximadamente 36 horas, desde aproximadamente 36 horas a aproximadamente 72

horas, desde aproximadamente 72 horas a aproximadamente 4 días, de aproximadamente 4 días a aproximadamente 1 semana, desde aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 1 mes, desde alrededor de 1 mes a aproximadamente 3 meses, de aproximadamente 3 meses a aproximadamente 6 meses, o de aproximadamente 6 meses a alrededor de 1 año, o más de 1 año, después de que el primer punto de tiempo.

[00166] Por lo tanto, por ejemplo, en algunas realizaciones, un método de objeto para determinar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad caracterizada por la elevada concentración de LOXL2 en circulación: a) determinar el nivel circulante de LOXL2 en un individuo en un primer punto de tiempo (por determinar el nivel de LOXL2 en una muestra líquida obtenida de la persona en el punto de primera vez); b) determinar el nivel circulante de LOXL2 en el individuo en un segundo punto de tiempo (por determinar el nivel de LOXL2 en una muestra líquida obtenida de la persona en el segundo punto de tiempo), y comparar el nivel de LOXL2 de los primeros y segundos puntos de tiempo.

[00167] Si el nivel de LOXL2 que circula en el segundo punto de tiempo es menor que el nivel LOXL2 circulante en el primer punto, se puede concluir que el tratamiento para la enfermedad caracterizada por la elevada concentración circulante de LOXL2 fue eficaz, en estos casos, se puede hacer una recomendación sobre el hecho de continuar con el régimen de tratamiento. Si el nivel de LOXL2 que circula en el segundo punto de tiempo es mayor que el nivel LOXL2 circulante en el primer punto, se puede concluir que el tratamiento para la enfermedad caracterizada por la elevada concentración de LOXL2 circulante no fue eficaz, en estos casos, puede hacerse una recomendación para interrumpir el régimen de tratamiento, para aumentar la dosis de un fármaco utilizado en el régimen de tratamiento, para aumentar la frecuencia de dosificación, o para administrar un régimen de tratamiento alternativo. Si el nivel de LOXL2 que circula en el segundo punto de tiempo no es significativamente diferente que el nivel de LOXL2 circulante en el primer punto, se puede concluir que el tratamiento para la enfermedad caracterizada por la elevada concentración circulante de LOXL2 no fue eficaz, o que el régimen de tratamiento debe ser alterado; en estos casos, una recomendación puede ser el hecho de interrumpir el régimen de tratamiento, para aumentar la dosis de un fármaco utilizado en el régimen de tratamiento, para aumentar la frecuencia de dosificación, o para administrar un régimen de tratamiento alternativo.

Los sujetos de prueba

[00168] Un método dado cuyo objetivo es la supervisión de la eficacia del tratamiento puede ser utilizado para probar cualquiera dentro de una variedad de personas, incluyendo, por ejemplo, las personas que han sido diagnosticadas con cáncer y que se someten a tratamiento para este, individuos que han sido diagnosticados de fibrosis y que están experimentando tratamiento para la fibrosis; individuos que han sido diagnosticados con una infección por el VHC o el VHB y que están recibiendo tratamiento para la infección por el VHC o el VHB; individuos que han sido diagnosticados con el VHC o el daño hepático asociado a la infección por VHB, y que están bajo tratamiento para la infección por VHC o VHB y / o el daño hepático, y similares.

[00169] En algunos casos, una persona que va a probar el uso de un ensayo LOXL2 dado es aquella que se encuentra actualmente en tratamiento por un cáncer. La quimioterapia del cáncer puede ser cualquiera de una variedad de agentes citotóxicos. Tales agentes citotóxicos incluyen los taxanos, tales como paclitaxel y docetaxel; de nitrógeno tales como mecloretamina, melfalán, mostaza de uracilo y clorambucilo; derivados de etilenimina, tales como tiotepa; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán; nitrosoureas, tales como lomustina, semustina y estreptozocina; triazenos, tales como dacarbazina; análogos de ácido fólico, tales como metotrexato; análogos de pirimidina, tales como fluorouracilo, citarabina y azaribina; análogos de la purina tales como mercaptopurina, y tioguanina; alcaloides de la vinca, tales como vinblastina y vincristina; antibióticos, tales como dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, y mitomicina; complejos metálicos, tales como complejos de coordinación de platino, tales como cisplatino; urea sustituida, tales como hidroxiiurea, derivados de metilhidrazina como la procarbazina; supresores adrenocorticales, tales como el mitotano; hormonas y antagonistas, tales como adrenocortisteroids (prednisona), progestinas (caproato de hidroxiprogesterona, acetato y acetato de megestrol), estrógenos (dietilestilbestrol y etinil estradiol) y andrógenos (propionato de testosterona y fluoximesterona).

[00170] En algunos casos, el tratamiento del cáncer comprende la administración de un agente que inhibe la actividad enzimática de un polipéptido LOXL2. Los agentes que inhiben la actividad enzimática LOXL2 incluyen un inhibidor alostérico de la actividad enzimática LOXL2. En algunos casos, el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2 que se

une a un epítopo dentro de un dominio de LOXL2 "SRCR3-4". Los ejemplos no limitantes de un anticuerpo monoclonal que inhibe la actividad enzimática LOXL2, y que se une a un epítopo dentro de un dominio SRCR3-4, son AB0023 y AB0024; véase, por ejemplo, EE.UU. 2009/0053224.

[00171] Como otro ejemplo, un individuo que experimenta el tratamiento de la fibrosis hepática, o que está en tratamiento para una enfermedad que puede resultar en fibrosis del hígado, es adecuado para probar el uso de un método dado. Como un ejemplo, un individuo que experimenta el tratamiento individual para una infección por VHC es adecuado para probar el uso de un método en cuestión. Por ejemplo, una infección por VHC puede ser tratado con IFN- α , viramidina, ribavirina, levovirina, un inhibidor de NS3 del VHC, un inhibidor de NS5B del VHC, o combinaciones de uno o más de los anteriores.

[00172] Como otro ejemplo, un individuo que experimenta el tratamiento para la FPI es adecuado para probar el uso de un método dado. Los fármacos utilizados habitualmente para el tratamiento de IPF incluyen, por ejemplo, corticosteroides (*por ejemplo*, prednisona), penicilamina, y varios neoplásicos (*anti-por ejemplo*, Ciclofosfamida, azathioporene, clorambucilo, vincristina y colchicina).

Los valores de control

[00173] Los niveles de LOXL2 en una muestra líquida obtenida de un sujeto de prueba se pueden comparar con un valor normal de control (s) o el rango de valores de control normales u otros valores de referencia como se describe en el presente documento. El valor de control se puede basar en los niveles de LOXL2 en muestras comparables (por ejemplo, sangre, plasma, o muestra de suero, u otra muestra biológica líquida) obtenido de una población de control, por ejemplo, la población en general o una población seleccionada de sujetos humanos. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar compuesta de sujetos aparentemente sanos, por ejemplo, las personas que no han tenido previamente algún signo o síntoma de fibrosis o cáncer. Individuos aparentemente sanos también, en general no presentan síntomas de la enfermedad. En otras palabras, estas personas, en caso examinado por un profesional de la medicina, se caracterizan por ser sanos y libres de síntomas de la enfermedad.

[00174] El valor de control puede tomar una variedad de formas. El valor de control puede ser un solo valor de corte, tales como la mediana o la media. Un valor normal de control puede ser un rango de control normal. En algunos casos, el control, el valor normal está por debajo del límite de detección de un método de ensayo de la

invención, por ejemplo, menos de aproximadamente 175 pg/ml menos de aproximadamente 150 pg/ml, menos de aproximadamente 125 pg/ml, menos de aproximadamente 100 pg/ml, menos de aproximadamente 75 pg/ml, menos de aproximadamente 50 pg/ml, o menos de aproximadamente 40 pg/ml.

MÉTODOS DE PRONÓSTICO

[00175] También se proporcionan varios métodos de pronóstico y predictivos. Por ejemplo, la presente descripción proporciona la determinación de la probabilidad de que un individuo que tiene una enfermedad fibrótica exhibirá una respuesta clínica beneficiosa a un tratamiento para la enfermedad fibrótica. En otro ejemplo, el método determina la probabilidad o el riesgo de una salida de la enfermedad en particular o de punto final o la capacidad de respuesta al tratamiento. El método generalmente implica la detección de un nivel circulante de LOXL2, tales como en una muestra líquida obtenida del individuo, utilizando un ensayo dado para LOXL2. En un aspecto, un nivel de LOXL2 que es mayor que un control normal u otro nivel de referencia indica que el individuo tiene una mayor probabilidad de mostrar una respuesta clínica beneficiosa a un tratamiento para la enfermedad fibrótica. En otro aspecto, un nivel relativamente bajo indica una probabilidad relativamente baja o el riesgo de desarrollar un determinado resultado de la enfermedad o de punto final, u otra información pronóstica. Del mismo modo, los niveles de LOXL2 comparativamente altos pueden indicar un peor pronóstico, como el aumento en el riesgo o la probabilidad de desarrollar una enfermedad o condición particular de salida o de llegar a un punto final determinado. Enfermedades fibróticas incluyen fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis cardíaca, y mielofibrosis, como se describió anteriormente. En algunos casos, por ejemplo, donde los niveles circulantes LOXL2 indican que es probable que el sujeto exhiba una respuesta clínica beneficiosa a un tratamiento para la enfermedad fibrótica, un método en cuestión implica además el tratamiento del individuo para la enfermedad fibrótica.

[00176] Los individuos que son adecuados para probar el uso de un método de ensayo de la invención incluyen los individuos que se han diagnosticado como teniendo la fibrosis, por ejemplo, la fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, mielofibrosis, la fibrosis cardíaca, u otro tipo de fibrosis. La fibrosis hepática incluye, pero no se limita a, la cirrosis, y condiciones asociadas tales como la hepatitis viral crónica (resultante de, por ejemplo, VHC o VHB), hígado graso no alcohólico, ASH, EHNA, PBC, cirrosis biliar, colangitis esclerosante primaria, y la hepatitis autoinmune. La fibrosis renal puede resultar de una variedad de enfermedades y daños, donde los

ejemplos de tales enfermedades y los daños incluyen la enfermedad renal crónica, síndrome metabólico, reflujo vesicoureteral, la fibrosis renal tubulointersticial, la diabetes (incluyendo nefropatía diabética), y nefritis glomerular resultante (GN), incluyendo, pero no limitado a, glomeruloesclerosis segmentaria focal y glomerulonefritis membranosa, GN mesangiocapilar. Fibrosis pulmonar incluye muchos síndromes y enfermedades, donde las enfermedades ejemplares incluyen IPF, neumonía intersticial idiopática, y el SDRA. La fibrosis pulmonar también incluye, pero no se limita a, la alveolitis fibrosante criptogénica, la neumonía intersticial fibrosante crónica, ILD, y DPLD.

[00177] En algunos casos, un sujeto de prueba adecuado tiene una forma avanzada de la fibrosis, pero todavía podría ser adecuado para el tratamiento con un régimen de tratamiento para la fibrosis. Por ejemplo, un sujeto de prueba adecuado incluye un tema con (no en etapa terminal) fibrosis activa. En algunos casos, un sujeto de prueba adecuado es aquel que tiene fibrosis, y que podría anticiparse a experimentar la progresión rápida de la enfermedad. Como un ejemplo, un individuo puede tener una fase avanzada, por ejemplo, METAVIR F4, de la fibrosis hepática; un individuo con fibrosis METAVIR F4 y un LOXL2 positivo (por ejemplo, mayor que los niveles normales de LOXL2 en muestra de líquido, tal como se determina usando un sujeto LOXL2 ensayo) todavía puede ser un candidato para el tratamiento de la fibrosis. Un paciente con fibrosis hepática METAVIR F4 con un LOXL 2 negativo (por ejemplo, los niveles normales de LOXL2 en muestra de líquido, tal como se determina usando un ensayo dado para LOXL2) no puede ser considerado como un candidato para el tratamiento de la fibrosis. Como otro ejemplo, un individuo con elevado LOXL2 (por ejemplo, mayor que los niveles normales de LOXL2 en muestra de líquido, tal como se determina usando un ensayo LOXL2) que tiene una etapa temprana de la fibrosis hepática (por ejemplo, METAVIR F1 o F2) puede ser considerado como un candidato para el tratamiento de la fibrosis.

Los valores de control

[00178] Los niveles de LOXL2 en una muestra líquida obtenida de un sujeto de prueba se pueden comparar con un valor normal de control (s) o el rango de valores de control normales. El valor de control se puede basar en los niveles de LOXL2 en muestras comparables (por ejemplo, sangre, plasma, o muestra de suero, u otra muestra biológica líquida) obtenidas de una población control, por ejemplo, la población en general o una población seleccionada de sujetos humanos. Por ejemplo, la población

seleccionada puede estar compuesta de sujetos aparentemente sanos, por ejemplo, las personas que no han tenido previamente algún signo o síntoma de fibrosis. Individuos aparentemente sanos también, en general no son contrarios a presentar síntomas de la enfermedad. En otras palabras, estas personas, en caso de ser examinadas por un profesional de la medicina, se caracterizan por ser sanos y libres de síntomas de la enfermedad.

[00179] El valor de control puede tomar una variedad de formas. El valor de control puede ser un solo valor de corte, tales como la mediana o la media. Un valor normal de control puede ser un rango de control normal. En algunos casos, el control, el valor normal está por debajo del límite de detección de un método de ensayo de la invención, por ejemplo, menos de aproximadamente 175 pg/ml, menos de aproximadamente 150 pg/ml, menos de aproximadamente 125 pg/ml, menos de aproximadamente 100 pg/ml, menos de aproximadamente 75 pg/ml, menos de aproximadamente 50 pg/ml, o menos de aproximadamente 40 pg/ml.

Generación de un informe

[00180] La probabilidad de que un paciente va a exhibir una respuesta clínica beneficiosa para el tratamiento de una enfermedad fibrótica se evalúa mediante la determinación del nivel circulante de LOXL2. La probabilidad de exhibir una respuesta clínica beneficiosa para el tratamiento de una enfermedad fibrótica del paciente se proporciona en un informe. El informe puede incluir además información sobre la probabilidad de la respuesta del paciente. Por ejemplo, un método puede incluir además una etapa de generación o la salida de un informe con los resultados de una evaluación de la probabilidad de respuesta del sujeto, este informe se puede proporcionar en forma de un medio electrónico (por ejemplo, una pantalla electrónica en un monitor de ordenador), o en la forma de un medio tangible (por ejemplo, un informe impreso sobre papel u otro medio tangible).

[00181] Un "informe", tal como se describe en este documento, es un documento electrónico o tangible que incluye elementos de informe que proporcionan información de interés en relación con una evaluación de la probabilidad y sus resultados. Un informe dado incluye al menos una evaluación de la probabilidad, por ejemplo, una indicación de la probabilidad de que un paciente que tiene una enfermedad fibrótica exhibirá una respuesta clínica beneficiosa a un tratamiento para la enfermedad fibrótica. Un informe dado puede ser generado electrónicamente en forma completa o parcial. Un informe dado puede incluir además uno o más de: 1) información sobre la instalación de

pruebas; 2) información de proveedor de servicios; 3) los datos del paciente; 4) de datos de muestra; 5) un informe interpretativo, que puede incluir diversa información incluyendo: a) indicación; b) los datos de prueba, por ejemplo, que circula nivel LOXL2, y 6) otras características.

Métodos IPF de Prognosis y predictivos

[00182] En algunas realizaciones, se proporcionan métodos de diagnóstico, pronóstico y predictivos para la fibrosis pulmonar idiopática (FPI). Como se muestra en los ejemplos del presente documento, se detecta el aumento de expresión de LOXL2 en los sueros de pacientes de FPI en comparación con muestras de control normales; adicionalmente, el aumento de los niveles circulantes de LOXL2 indican un fenotipo activo FPI y un mayor riesgo de diversos resultados de enfermedades. La expresión LOXL2 más alta también es detectada en el tejido pulmonar de pacientes de FPI. En consecuencia, se proporcionan procedimientos que utilizan LOXL2 como un marcador de la enfermedad IPF, tales como un marcador de actividad de la enfermedad FPI o del fenotipo FPI activo. Por lo tanto, en algunas realizaciones de los métodos proporcionados, LOXL2 se utiliza como un marcador de diagnóstico, pronóstico, y / o predictivo para la FPI. En un aspecto, los niveles de LOXL2 se utilizan para evaluar la fibrogénesis y / o varias etapas IPF, la gravedad, o resultados, tales como la probabilidad de resultados de enfermedades particulares o la capacidad de respuesta al tratamiento.

[00183] En otro aspecto, los niveles de LOXL2 son indicativos de la enfermedad activa o un nivel de actividad de la enfermedad. En otro aspecto, los niveles de LOXL2, típicamente los niveles de suero, que son más altos en comparación con un control u otra muestra de referencia indican un riesgo de desarrollar un resultado de la enfermedad en particular o desarrollar un resultado de la enfermedad en particular en un periodo de tiempo particular. En otros aspectos, los niveles de LOXL2 indican la probabilidad de que un paciente responderá a un tratamiento en particular o da información con respecto a la capacidad de respuesta a un tratamiento continuo, tales como el tratamiento con un inhibidor de LOXL2 u otro tratamiento. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos incluyen además la iniciación, interrupción, o la alteración de un enfoque de tratamiento de la enfermedad, basado en la predicción o niveles LOXL2 detectados.

[00184] Los resultados de la enfermedad ejemplares que son evaluados o predichos utilizando los métodos incluyen la progresión de la enfermedad IPF (un punto

final compuesto definido como uno de los siguientes: la mortalidad por cualquier causa), pobre supervivencia libre de progresión (PFS), hospitalización respiratoria, disminución de la función pulmonar, por ejemplo, disminución categórica de la función pulmonar (que puede ser definida como una disminución del 10% de la capacidad vital forzada (CVF) con una disminución del 5% en la capacidad de difusión de monóxido de carbono (CDCO) o una disminución del 15% de la CDCO con una disminución del 5% de la CVF), y la muerte.

[00185] Los métodos implican generalmente la obtención de una muestra del paciente y / o determinar un nivel LOXL2 en la muestra (por ejemplo, utilizando los métodos descritos en el presente documento) y la realización de varios análisis estadísticos sobre la base de esta y otra información. En un ejemplo, se determina si el paciente o una muestra tiene un nivel alto o bajo de LOXL2, por ejemplo, un nivel LOXL2 bajo o alto que circula o suero. Esta información se puede determinar, por ejemplo, de los niveles LOXL2 de dicotomización basados en una distribución de los niveles LOXL2 determinados en una población determinada, como una colección de muestras, que designan los puntos de corte para los niveles "bajos" y "altos" de LOXL2. Por ejemplo, un nivel alto de LOXL2 puede considerarse un nivel al menos o por encima de una concentración particular en una muestra dada, tal como mayor que o aproximadamente 800 pico gramos (pg.) LOXL2 por mililitro (ml) de los sueros. Por otra parte, un nivel sérico LOXL2 alto puede definirse en base a una distribución de los niveles de las muestras dentro de una población o en base a un cambio de doblez particular en comparación con un control o muestra de referencia.

[00186] En algunos aspectos, los métodos se llevan a cabo mediante la determinación de los niveles de LOXL2 en relación con otras mediciones, tales como marcadores de la gravedad de la enfermedad o el estado funcional, por ejemplo, las mediciones de referencia de la FPI, tales como los reflexivos de la gravedad de FPI, tales como el porcentaje del valor teórico de la capacidad vital forzada (CVF), porcentaje de la capacidad de difusión del monóxido de carbono predicho (DLCO), la distancia recorrida en 6 minutos (6MWD), la presión media de la arteria pulmonar (PmAP), la saturación de oxígeno en reposo más bajo (SpO2), el índice fisiológico compuesto (IFC), la puntuación del St. George Respiratory Questionnaire (SGRQ), y la puntuación del Índice de Transición de Disnea (IDT), la capacidad de respuesta al tratamiento, y / u otros biomarcadores de la enfermedad o la gravedad de la enfermedad. Por lo tanto, en algunos aspectos de los modelos y métodos de predicción, LOXL2 es un

biomarcador de resultado de la enfermedad FPI integrado con medidas de gravedad de la enfermedad o el estado funcional y/u otros biomarcadores.

Análisis estadísticos de los métodos diagnósticos, pronósticos y predictivos

[00187] En algunos ejemplos, los análisis estadísticos se llevan a cabo sobre la base del nivel de LOXL2 y otras determinaciones. En un ejemplo, se evalúan los niveles de LOXL2, por ejemplo, utilizando histogramas estándar para evaluar los niveles no transformados o transformados mediante el $\log_{10}$ de LOXL2. Los análisis estadísticos pueden incluir la determinación de varios valores, como media, por ejemplo, la media geométrica, o valores de la mediana de los niveles de expresión LOXL2 y / o variables de referencia, para las muestras y / o pacientes individuales, y el cálculo de las desviaciones estándar y los cambios de doblez entre diferentes muestras o condiciones, y comparando los niveles de expresión y / u otras variables utilizando cualquiera de un número de pruebas bien conocidas, tales como t-test de Student, la cual, por ejemplo, se puede usar para comparar la distribución de las variables de referencia y los niveles de expresión LOXL2.

[00188] En algunos aspectos, la correlación de Pearson (CP) se utiliza para para la evaluación de las relaciones lineales (correlaciones) entre pares de valores (por ejemplo, mediante el cálculo de los coeficientes de CP), tal como entre los niveles de expresión LOXL2 y otras variables tales como la variable (s) IPF de referencia como se describe aquí. Tal análisis puede ser utilizado para la distribución separada linealmente en los patrones de expresión, mediante el cálculo de los coeficientes de los pares individuales de variables (trazada en los ejes x e y de las matrices individuales, como se muestra en el ejemplo 9).

Modelamiento predictivo

[00189] En algunas realizaciones, los métodos de predicción además comprenden el uso adicional de análisis estadístico y el uso de modelos y sistemas predictivos. En algunos aspectos se utilizan tales modelos y sistemas para predecir los resultados de la enfermedad, puntos finales, la capacidad de respuesta, y / o eventos, basados en los niveles LOXL2 y otra información típicamente, tales como: las variables indicativas de la gravedad de la enfermedad y otros biomarcadores. Por ejemplo, los modelos de supervivencia pueden ser usados para examinar la relación entre los niveles de LOXL2 y otras covariables y uno o más eventos, puntos finales o resultados, tales como resultados de la enfermedad: como, por ejemplo, el resultado (s) del FPI y capacidad de respuesta para uno o más tratamiento (s) Dichos modelos podrían ser utilizados para

predecir la probabilidad de que un paciente particular tendrá el evento, punto final o resultado, o que tal resultado ocurrirá dentro de un período determinado de tiempo.

[00190] En un tal ejemplo, el modelado de riesgos proporcionales Cox, por ejemplo, por etapas de modelado de riesgos proporcionales Cox, es llevado a cabo para examinar la relación entre los niveles de LOXL2 (y opcionalmente otras covariables, tales como variables FPI de referencia descritas en este documento y otras variables que podrían ser asociadas con resultados de la enfermedad, tales como biomarcadores de la enfermedad) y resultados, tales como resultados FPI. El uso de métodos estadísticos bien conocidos, los cocientes de riesgo (CR) son calculados, representando la relación entre la covarianza, por ejemplo, el nivel LOXL2, y el resultado sujeto, punto final o evento. Así, en algunos aspectos, los métodos proporcionados incluyen el uso de tales modelos para predecir los resultados, puntos finales y / o eventos, por ejemplo, resultados de la enfermedad de FPI, en pacientes individuales basados en los niveles LOXL2 y los valores de otras covariables. En un ejemplo, el modelo incluye los niveles LOXL2 (por ejemplo, la presencia o la falta de niveles LOXL2 "elevados"), 6MWD, y/o CPI.

[00191] Los resultados del IPF, eventos y puntos finales para su uso en tal modelado incluye puntos finales o eventos indicativos de progresión de la enfermedad o la gravedad tal como cualquier criterio de valoración típicamente especificado en los ensayos clínicos FPI o régimen de tratamiento, tales como la progresión de la enfermedad FPI, disminución de la función pulmonar, hospitalización respiratoria, y la muerte. En algunos aspectos, la progresión de la enfermedad representa un criterio de valoración compuesto definido como uno de los siguientes: la mortalidad por cualquier causa, la hospitalización respiratoria, o una disminución categórica de la función pulmonar, definida como una disminución del 10 % de la capacidad vital forzada (CVF) con una disminución del 5 % en la capacidad de difusión para el monóxido de carbono (CD_{CO}) o una disminución del 15 % de la CD_{CO} con una disminución del 5 % de la CVF). Los puntos finales de la función pulmonar se pueden determinar usando pruebas de función pulmonar. En algunos ejemplos, se utilizan al menos dos pruebas, llevadas a cabo por lo menos a 4 semanas de diferencia. Otros puntos finales son todas las causas de mortalidad, la supervivencia libre del trasplante, y la muerte. El resultado puede ser definido como el tiempo que transcurre antes de que se alcanza cada criterio de valoración.

[00192] Las curvas características de funcionamiento del receptor (CFR) se pueden utilizar para evaluar la sensibilidad frente a la especificidad de los sistemas. El área bajo la Curva (ABC) se calcula utilizando métodos bien conocidos.

[00193] En algunos ejemplos de los modelos de predicción, LOXL2 se asocia significativamente con uno o más resultados o eventos, tales como la progresión de la enfermedad, por ejemplo, en un intervalo particular, de confianza (IC) y nivel de confianza, tal como un intervalo de confianza del 95 %, por ejemplo, sobre la base de un valor P menor que una cantidad umbral particular, por ejemplo, 0,05 . La razón de riesgo se puede utilizar para determinar el doblez del cambio en el riesgo de un resultado en particular, para una covariable determinada, tal como los niveles LOXL2 elevados. En algunos aspectos, un nivel LOXL2 dado está asociado, por ejemplo, estadísticamente asociado de manera significativa, con al menos un riesgo de 2 dobleces, 3 dobleces, 4 dobleces, 5 dobleces, 6 dobleces, o de 7 dobleces en el desarrollo de un determinado resultado, tal como la progresión de la enfermedad, la hospitalización, la disminución de la función pulmonar, u otro resultado como se describe en el presente documento. El doblez de cambio en el riesgo, por ejemplo, se puede expresar en términos de comparación con un sujeto normal, tal como uno que no tiene un nivel de LOXL2 elevado o uno que tiene un nivel LOXL2 " bajo". En un ejemplo, los niveles de LOXL2, por ejemplo, niveles LOXL2 "altos", se asociaron de forma estadísticamente significativa con el resultado, por ejemplo, la progresión de la enfermedad, cuando otras covariables se incluyen en el modelo, como 6MWD y el CPI.

KITS Y DISPOSITIVOS DE ENSAYO

[00194] La presente descripción proporciona kits y dispositivos de ensayo para llevar a cabo un ensayo de sujeto para hacer circular LOXL2.

[00195] En algunas formas de realización, un kit de la invención incluye: a) un primer anticuerpo específico para LOXL2, y b) un segundo anticuerpo específico para LOXL2. En algunos casos, el primer anticuerpo es un anticuerpo específico-LOXL2 policlonal, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo específico-LOXL2 monoclonal. En otros casos, el primer anticuerpo es un anticuerpo específico-LOXL2 monoclonal, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo específico-LOXL2 monoclonal. En otros casos, el primer anticuerpo es anticuerpo específico-LOXL2 policlonal, y el segundo anticuerpo es un anticuerpo específico-LOXL2 policlonal. El primer y/o el segundo anticuerpo en algunos casos comprenderán un marcador detectable.

[00196] El primer anticuerpo en algunas realizaciones será inmovilizado en un soporte insoluble. Alternativamente, se proporciona un soporte insoluble con el kit, y el usuario efectuará la inmovilización del primer anticuerpo sobre el soporte insoluble. Por lo tanto, en algunos casos, un kit sujeto incluye: a) un primer anticuerpo específico para LOXL2; b) un segundo anticuerpo específico para LOXL2, y c) un soporte insoluble. El soporte insoluble se puede proporcionar en cualquiera de una variedad de materiales y formatos, como se describe anteriormente. Por ejemplo, en algunos casos, el soporte insoluble es una placa de múltiples pocillos de plástico, una tira de prueba, o una varilla de prueba.

[00197] Como se señaló anteriormente, en algunos casos, ni el primero ni el segundo anticuerpo comprenden un marcador detectable. En estos casos, un tercer anticuerpo que comprende un marcador detectable, y que se une al segundo anticuerpo, se puede proporcionar; un anticuerpo tal se conoce generalmente como un anticuerpo secundario. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un agente quimio luminiscente, una etiqueta de partículas, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, o un radioisótopo. Por lo tanto, en algunas formas de realización, un kit de sujeto comprende : a) un primer anticuerpo específico para LOXL2; b) un segundo anticuerpo específico para LOXL2, y c) un tercer anticuerpo, donde la tercera anticuerpo comprende un marcador detectable, y se une a la segunda anticuerpo . En algunos casos, un kit sujeto comprende : a) un primer anticuerpo específico para LOXL2; b) un segundo anticuerpo específico para LOXL2, c) un tercer anticuerpo, donde la tercera anticuerpo comprende un marcador detectable, y se une al segundo anticuerpo; y d) un soporte insoluble . El soporte insoluble se puede proporcionar en cualquiera de una variedad de materiales y formatos, como se describe anteriormente. Por ejemplo, en algunos casos, el soporte insoluble es una placa de plástico de múltiples pocillos, una tira de prueba, o una varilla de prueba.

[00198] Un kit sujeto puede incluir además LOXL2 purificado, para su uso en la generación de una curva estándar.

[00199] Un kit sujeto puede incluir además uno o más componentes adicionales, por ejemplo, un tampón, un inhibidor de la proteasa; un marcador detectable; reactivos de lavado; agentes de bloqueo; etc. Los diversos componentes del kit pueden estar presentes en recipientes separados o ciertos componentes compatibles pueden ser pre-combinados en un solo recipiente, según se desee.

[00200] Además de los componentes mencionados anteriormente-, un kit sujeto puede incluir instrucciones para usar los componentes del kit para practicar un método sujeto. Las instrucciones para la práctica de un método sujeto se registran, en general en un medio de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones se pueden imprimir sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Como tales, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un folleto de información, en el etiquetado del envase del kit o sus componentes (es decir, asociado con el empaçado o el subempaquetado), etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un archivo de almacenamiento electrónico de datos presentes en un medio adecuado de almacenamiento legible por un ordenador, por ejemplo Compact Disc-memoria de sólo lectura (CD-ROM), discos versátiles digitales (DVD), un disquete, etc. Aún en otras realizaciones, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero los medios para la obtención de las instrucciones de una fuente remota, por ejemplo, a través de Internet, se proporcionan. Un ejemplo de esta forma de realización es un kit que incluye una dirección web en la que las instrucciones se pueden ver y / o de la cual las instrucciones se pueden descargar. Al igual que con las instrucciones, estos medio para la obtención de las instrucciones se registran en un sustrato adecuado.

Dispositivo de Ensayo

[00201] La presente descripción proporciona además un dispositivo de ensayo para su uso en la detección de LOXL2 en una muestra biológica líquida obtenida de un individuo. El dispositivo puede incluir una matriz que define una trayectoria de flujo axial.

[00202] La matriz puede comprender: i) una zona de recepción de muestra en un extremo aguas arriba de la trayectoria de flujo que recibe la muestra de líquido, ii) una o más zonas de ensayo posicionados dentro de la trayectoria de flujo y aguas abajo de la zona de recepción de muestra, cada una o más zonas de ensayo comprenden inmovilizados en él un anticuerpo específico para LOXL2 en cada una de las zonas de ensayo, para formar un complejo anti-LOXL2/LOXL2 inmovilizado, y iii) una o más zonas de control situadas dentro de la trayectoria de flujo y aguas debajo de la zona de recepción de la muestra, donde las una o más zonas de control pueden incluir controles positivos y / o negativos. Las zonas de ensayo y las zonas de control se pueden colocar en un formato alterno dentro de la trayectoria de flujo comenzando con una zona de ensayo situada aguas arriba de cualquier zona de control.

[00203] La matriz puede comprender : i) una zona de recepción de muestra en un extremo aguas arriba de la trayectoria de flujo que recibe la muestra de líquido, ii) una o más zonas de ensayo posicionadas dentro de la trayectoria de flujo y aguas abajo de la zona de recepción de muestra, cada uno o más zonas de ensayo comprenden un anticuerpo específico para LOXL2 en cada una de las zonas de ensayo, para formar un complejo anti-LOXL2/LOXL2, y iii) una o más zonas de control situados dentro de la trayectoria de flujo y aguas abajo de la zona de recepción de muestra, donde una o más zonas de control pueden incluir controles positivos y / o negativos . Las zonas de ensayo y las zonas de control se pueden colocar en un formato alterno dentro de la trayectoria de flujo que comienza con una zona de ensayo situado aguas arriba de cualquier zona de control. En algunas formas de realización, el anticuerpo específico para LOXL2 no está inmovilizado, y, cuando el anticuerpo anti-LOXL2 une cualquier LOXL2 presente en la muestra, el complejo anticuerpo anti- LOXL2 /LOXL2 es movilizable. Por ejemplo, el complejo anticuerpo anti- LOXL2 /LOXL2 formado en una primera zona de ensayo puede ser movilizado de manera que entra en una segunda zona de ensayo que comprende un anticuerpo anti-LOXL2 inmovilizado, donde el complejo anticuerpo anti-LOXL2 /LOXL2 se une al anticuerpo anti LOXL2 inmovilizado, formando un complejo anticuerpo anti- LOXL2 /LOXL2 inmovilizado.

[00204] En el uso de un dispositivo de ensayo de este tipo, en algunas realizaciones, un anticuerpo marcado específico para LOXL2 puede primero ser mezclado con una muestra de líquido antes de aplicar la muestra líquida a la zona de recepción de muestra del dispositivo, donde dicho mezclado resulta en un complejo anticuerpo marcado/LOXL2 . En estas realizaciones, la muestra líquida que comprende el complejo anticuerpo marcado/LOXL2 se aplica a la zona de recepción de muestra del dispositivo de ensayo. La muestra de líquido fluye a lo largo del dispositivo hasta que la muestra del líquido alcanza una zona de ensayo. El anticuerpo presente en la zona de prueba se une al LOXL2 presente en el complejo anticuerpo marcado/LOXL2, y luego se puede detectar.

[00205] El dispositivo de ensayo puede incluir además una zona de etiqueta que comprende un anticuerpo marcado específico para LOXL2, en el que el anticuerpo marcado es capaz de unirse al LOXL2 presente en un complejo LOXL2 inmovilizado /anticuerpo anti-LOXL2, para formar un complejo LOXL2 marcado/anticuerpo anti-LOXL2, donde el anticuerpo marcado es movilizable en presencia de la muestra de líquido. En el uso de un dispositivo de ensayo de este tipo, una muestra de líquido la

cual podría comprender LOXL2 se aplica a la zona de recepción de muestra del dispositivo; el anticuerpo anti-LOXL2 presente en la zona de la etiqueta se une al LOXL2, formando un complejo anticuerpo marcado/LOXL2, que, como el anticuerpo marcado, es movilizable, y el complejo anticuerpo marcado/LOXL2 fluye solamente por el dispositivo hasta que la muestra del líquido alcanza una zona de ensayo. El anticuerpo anti-LOXL2 presente en la zona de prueba se une al LOXL2 presente en el complejo anticuerpo marcado /LOXL2, y luego se puede detectar.

[00206] Alternativamente, el dispositivo de ensayo puede incluir una zona de marcado que comprende un anticuerpo específico para un anticuerpo anti-LOXL2, en el que el anticuerpo marcado se une a cualquiera de los complejos anticuerpo anti-LOXL2 /LOXL2 formados en la zona (s) de prueba. En algunos casos, el anticuerpo marcado es movilizable.

[00207] El anticuerpo marcado puede comprender un marcador tal como un agente químico luminiscente, una etiqueta de partículas, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, o un radioisótopo.

[00208] las zonas de control incluyen zonas de control positivas y zonas de control negativas.

[00209] La matriz es generalmente un soporte insoluble, donde soportes insolubles adecuados incluyen, pero no se limitan a, di fluoruro de polivinilo (PVDF), celulosa, nitrocelulosa, nylon, y similares. La matriz puede ser flexible, o puede ser relativamente inflexible. La matriz se puede colocar dentro de un alojamiento que comprende un soporte y, opcionalmente, una cubierta, en el que el alojamiento contiene una abertura de aplicación y uno o más puertos de observación. El dispositivo de ensayo puede estar en cualquiera de una variedad de formatos, por ejemplo, una tira de prueba, una tira reactiva; etc.

EJEMPLOS

[00210] Los siguientes ejemplos no están destinados a limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención, ni tienen la intención de representar que los experimentos siguientes son todos o los únicos experimentos realizados. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero algunos errores y desviaciones experimentales deben ser tomados en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las

partes son partes en peso, peso molecular es peso molecular promedio, la temperatura es en grados Celsius, y la presión es la atmosférica o próxima a esta. Las abreviaturas estándar se pueden utilizar, por ejemplo; pb, par (es) base; kb, kilo base (s), pl, pico litro (s), s o seg, segundo (s); min, minuto (s); h o hr, hora (s), aa, aminoácido (s); kb, kilobases (s), pb, par (es) base; nt, nucleótido (s), i.m., intramuscular (mente); ip, intraperitoneal (mente); sc, subcutánea (mente), y similares.

Ejemplo 1: Inmunoensayo para la detección de LOXL2 en muestras de suero o plasma humano

MATERIALES Y MÉTODOS

Anticuerpos

[00211] El anticuerpo policlonal de conejo ("conejo A") se planteó contra de la proteína recombinante purificada LOXL2 de larga duración; este anticuerpo reconoce múltiples epítomos en todos los dominios de la LOXL2. El anticuerpo monoclonal de ratón, AB0030, se une al dominio catalítico de LOXL2 y reconoce tanto la proteína LOXL2 de longitud completa y la proteína madura LOXL2 (que se escinde entre dominios SRCR2 y SRCR3).

Inmunoensayo LOXL2 en la plataforma de MSD

[00212] Las placas de electrodos estándar sin recubrir en un solo punto de Descubrimiento de Meso escala (MSD) (cat # L15XA-3) se recubrieron durante la noche a 4 ° C con un volumen de 30µl de una solución de conejo 3µg/de anticuerpo policlonal LOXL2-antihumano conejo formulado en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después del recubrimiento, los pocillos de las placas se bloquearon mediante la adición de una solución de 5 % (w / v) Bloqueador A (MSD Cat # R93AA-1) en PBS. Después de la etapa de bloqueo, las placas se lavaron 3 veces en PBS que contiene 0,05 %- detergente no iónico Tween 20, usando un lavador de placas automatizado. Las muestras humanas para ser sometidas a ensayo (suero o plasma) se prepararon por dilución de ellas por separado 1:04 en PBS (1 parte de suero, 3 partes de PBS). Las muestras fueron luego añadidas a cada pocillo de la placa. Las muestras se incubaron con agitación rotatoria (300-600rpm) durante 2-3 horas a temperatura de ambiente. Después de la unión de la muestra, las placas fueron lavadas nuevamente 3 veces en PBS conteniendo 0.05 % de detergente Tween-20, usando un lavador de placas automatizado.

[00213] El anticuerpo primario, AB0030, es un anticuerpo monoclonal de ratón anti- LOXL2 humano que se une al dominio catalítico de LOXL2. Una solución del $\mu\text{g/ml}$ de AB0030 en 2% (p/v) de Bloqueador A en PBS fue agregado a cada pocillo, y las placas fueron luego incubadas con agitación rotatoria (300-600rpm) por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de la unión de AB0030, las placas fueron lavadas de nuevo 3 veces en PBS conteniendo detergente 0.05% Tween-20, usando un lavador de placas automatizado.

[00214] El anticuerpo secundario es una molécula IgG de cabra anti ratón conjugada con colorante SulfoTag (MSD Cat # R32AC-5). Una solución de anticuerpo secundario $1\mu\text{g/ml}$ en 2% (w / v) Bloqueador A en PBS se añadió a cada pocillo, y las placas se incubaron con agitación rotatoria (300-600rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la unión anticuerpo secundario, las placas se lavaron 3 veces en PBS que contiene 0,05% de detergente Tween-20, usando un lavador de placas automatizado.

[00215] El tampón T de lectura 1x con agentes tensioactivos (MSD Cat # R92TC-2) se añadió a cada pocillo, seguido de la medición inmediata de la placa en el instrumento MSD SectorImager 2400.

[00216] A las muestras de prueba humanas se les dio un valor cuantitativo relativo de LOXL2 por comparación con la curva del calibrador en la misma placa de ensayo, compuesto de proteína purificada recombinante humana LOXL2 (R & D Systems) añadido en concentraciones conocidas de suero o plasma humano agrupado de normal y saludable donantes. La Curva de calibrador apropiada y la interpolación de la muestra desconocida se llevaron a cabo usando técnicas estándar.

Inmunoensayo LOXL2 utilizando el formato estándar

[00217] Se utilizaron placas de múltiples pocillos altamente vinculantes Costar 3922. El Anticuerpo policlonal de conejo (Ab) (conejo " A") se diluyó a $0.625\mu\text{g} / \text{ml}$ en tampón de recubrimiento CB2 (Tecnologías inmunoquímicas CB2 (6248)). Policlonal diluido Ab se añadió a los pocillos de la placa en un volumen de $50\mu\text{l} / \text{pocillo}$, y las placas se mantuvieron a 4°C durante la noche. Después de recubrir los pocillos con el anticuerpo policlonal, los pocillos se bloquearon con $200\mu\text{l} / \text{pocillo}$ de solución de bloqueo BB1 (inmunoquímica Tecnologías producto # 640) durante 1-3 horas a temperatura ambiente (RT). Después del bloqueo, las placas se lavaron 3 veces con $200\mu\text{l}$ por pocillo de PBS -T (PBS que contenía 0,05 % de Tween 20).

[00218] 25 µl de diluyente Hispec (AbD Serotec BUF049B) se añadió a cada pocillo. Después se añadió un volumen igual de suero de ensayo a cada pocillo, y las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de dejar que las muestras de suero se unan a las placas se lavaron tres veces.

[00219] El anticuerpo primario Hispec (AB0030) se diluyó a 5 µg / ml en PBS-T + 0,5 % de albúmina de suero bovino (BSA); 50 µl de anticuerpo primario diluido se añadió a cada pocillo. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora, después se lavaron tres veces con PBS -T. El anticuerpo secundario (per oxidasa de rábano picante (HRP) conjugada con anticuerpo de cabra anti-ratón, de la inmunoinvestigación de Jackson, 0,8 mg) se diluyó 1:10.000 en PBS-T + 0,5 % de BSA; 50 µl de anticuerpo secundario diluido se añadió a cada pocillo. Las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante una hora, después se lavaron tres veces con PBS -T.

Ejemplo 2: Suero LOXL2 medición para la estimación de la fibrosis hepática en pacientes con hepatitis crónica C virus (HCV)

[00220] Análisis de los tejidos hepáticos fibróticos mediante técnicas de inmunohistoquímica (IHC) revelaron la expresión LOXL2 localizada en la interfaz fibrogénica compuesta de fibroblastos, neovasculatura, células inflamatorias y hepatocitos, lo que sugiere que LOXL2 se asocia con la enfermedad fibrogénica activa. Para explorar más lejos la relación del suero LOXL2 con la enfermedad del hígado fibrótico, se usó una ELISA específica-LOXL 2tal como la descrita en el Ejemplo 1. Las muestras de suero, junto con las biopsias de hígado, se obtuvieron de 87 pacientes con infección crónica por el VHC. Los niveles séricos de LOXL2 y de los biomarcadores establecidos ácido hialurónico (HA) y el inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP1) se midieron por inmunoensayo, y la etapa histológica de la fibrosis hepática se evaluó para cada biopsia utilizando el sistema de puntuación de Ishak. Por otra parte, también se recogieron y evaluaron los niveles séricos LOXL2 muestras de suero de más de 30 donantes sanos. La correlación entre los biomarcadores séricos y la puntuación de fibrosis se estudió mediante la prueba de ANOVA, así como la prueba de Mann - Whitney para muestras agrupadas por puntuación de fibrosis.

RESULTADOS

[00221] Los resultados se muestran en las Figuras 1 y 2. La proteína LOXL2 se detectó en el suero de 83 % de los pacientes con infección crónica por el VHC, pero no

se detectó en el suero de los donantes sanos normales. Hubo una correlación positiva entre los niveles séricos de HA, TIMP1 y LOXL2 y estadio de fibrosis. Los resultados de suero fueron consistentes con el análisis IHC, que reveló altos niveles de proteína LOXL2 en áreas de fibrosis activa, en comparación con niveles bajos o no detectables en muestras de individuos no infectados o sanos.

Ejemplo 3: Suero LOXL2 en pacientes con FPI

[00222] Las muestras de suero de 15 pacientes con diagnóstico de fibrosis pulmonar idiopática (IPF) se probaron para LOXL2. Los resultados se muestran en la Figura 3. Se muestran los números de identificación de pacientes individuales. Diez de los 15 pacientes dieron positivo, y el otros 5 estaban por debajo del límite de detección y se reportan como "no detectados". Sujetos normales en edad de casamiento también fueron probados, todos fueron negativos ("no detectado", por debajo del límite de detección) para suero LOXL2.

Ejemplo 4: Suero LOXL2 en pacientes oncológicos

[00223] Se estudiaron [00223] Ocho pacientes de cáncer que son tratados con anticuerpo anti-LOXL2 (AB0024) para el cáncer. La identificación del paciente ("Pt ID"); diagnóstico de cáncer; nivel de dosis de anticuerpo anti-LOXL2; tiempo hasta la progresión, y la expresión LOXL2, como se examina por inmunohistoquímica en una muestra (~ 5 micras) de tejido fijado aislado a partir del tumor primario original o una muestra relacionada, se proporcionan en la Tabla 1, abajo.

Tabla 1

Pt ID	Diagnóstico	Nivel de dosificación (mpk)	Tiempo para la progresión	Expresión LOXL2
001	Células renales	1	44 días	Vascular
002	Colorectal	1	Estable (7 meses)	Desmoplástico positivo
003	endometrial mullerian mixta	1	57 días	Mínimo, no desmoplástico
004	Mama	3	38 días	Mínimo, irregular
005	Colorectal	3	56 días	Desmoplástico positivo
006	Melanoma	3	42 días	Positivo
007	Colon SC	10	57 días	
008	Próstata	10	30 días	Desmoplástico positivo

Pt ID	Diagnóstico	Nivel de dosificación (mpk)	Tiempo para la progresión	Expresión LOXL2
009	De ovario/mama	10	51 días	Débil, no desmoplástico

[00224] Las muestras de sangre se obtuvieron en el día 1 en el que el tratamiento anti-LOXL2 comenzó (muestra tomada antes del tratamiento anti- LOXL2), y en los días 29 y 57 siguientes al comienzo del tratamiento anti-LOXL2.

RESULTADOS

[00225] LOXL2 se detectó en el plasma de 8 de 8 pacientes, y en muestras de suero de 5 de 8 pacientes, en todos los puntos de tiempo disponibles. La administración de AB0024 no aclaró o enmascaró la señal LOXL2.

Ejemplo 5: La Expresión LOXL2 en el tejido hepático de pacientes con infección crónica por el VHC, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) 1, y esteatohepatitis no alcohólica (ASH) tinción inmunohistoquímica (IHC) demostraron la expresión LOXL2 en los tejidos del hígado de un paciente con infección crónica por el VHC. Las muestras congeladas de tejido humano se obtuvieron de Cureline (Burlingame, CA) y Asterand (Detroit, MI) y secciones seriadas que fueron teñidas con anti-LOXL2.

RESULTADOS

[00226] Los resultados de secciones obtenidas de un paciente con infección crónica por el VHC se muestran en la Figura 6, que muestra la LOXL2 de la proteína en el tejido hepático de este paciente. En el panel izquierdo de la Figura 6 (5x aumento del objetivo), las flechas negras indican áreas de expansión fibrosa en regiones portal y extensiones. Las flechas blancas indican áreas de corto de septos fibrosos que rodean los lóbulos hepáticos. El panel derecho de la figura 6 (aumento de 40x objetivo) muestra inmunoreactividad LOXL2, observada en los septos fibrosos (S) en la interfase con hepatocitos (H), en el espacio perisinusoidal (flechas), y en los miofibroblastos en el parénquima del hígado (flechas). Los resultados muestran que en este estudio, LOXL2 se expresó en los tejidos del hígado de los pacientes con infección crónica por el VHC, y que la expresión es medible por formas de realización de los ensayos proporcionados. En otro estudio de IHC, una fuerte localización de expresión LOXL2 en el tejido hepático en el interfaz activa la enfermedad en la EHNA, la fibrosis asociada al VHC, y cenizas, pero no en hígado sano (datos no mostrados).

Ejemplo 6 : Normas de calibrador para inmunoensayo LOXL2 en matriz de suero humano

[00227] utilizando el inmunoensayo LOXL2 descrito en el Ejemplo 1 (inmunoensayo de sándwich desarrollado en la plataforma de mesoescala), LOXL2 no se detectó en el suero de individuos sanos . Para crear una curva de calibrado, se añadió proteína recombinante purificada LOXL2 de longitud completa en una mezcla de sueros humano normal, seguido por dilución en serie en el suero.

RESULTADOS

[00228] Los resultados se muestran en la Figura 7. Cada punto de datos representa la media de 3 pocillos replicados; las curvas para 4 placas independientes se muestran.

[00229] La Tabla 2 muestra las características de los patrones de calibrador de matriz de suero humano. En la Tabla 2, el límite inferior de detección (LLOD) es la media + 2,5 * desviación estándar de los pocillos de blanco (valores primas, extrapolado); El límite inferior de cuantificación (LLOQ) es el estándar del calibrador más baja con error relativo < 30 % y un coeficiente de variación < 30 % para las mediciones en bruto. El Intra -ensayo y la precisión inter-ensayo se determinó utilizando muestras reales.

Tabla 2: Inmunoensayo LOXL2: características de los patrones de calibrador de matriz de suero humano

Características de ensayo	Resultado
Exactitud (error relativo)	<15%
Precisión intra ensayo	3.5%
Precisión inter ensayo	15.5%
Recubrimiento después del ciclo de congelación/descongelación	70% para un ciclo, >70% para 2 o más ciclos
Límite mínimo de detección	150-200 pg/ml
Límite mínimo de cuantificación	180-550 pg/ml
Límite máximo de cuantificación	No determinado

Ejemplo 7: El aumento de los niveles séricos LOXL2 en sujetos con cirrosis hepática, en comparación con aquellos con leve a moderada fibrosis hepática

[00230] Las muestras de suero del paciente se recogieron veinte-seis adultos con hepatitis C crónica que participaron en el grupo de placebo de un estudio clínico. Los sujetos fueron agrupados por puntajes de fibrosis Ishak (1-3: leve a moderada fibrosis; 5-6: cirrosis). Las características demográficas de los sujetos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Características demográficas de los sujetos con VHC

Característica	Puntuación de Ishak 1-3 (n=14)	Puntuación de Ishak 5-6 (n=12)	Total (n=26)		
Edad	53 (50.5, 56.0)	55 (47.8, 55.0)	53.5 (49.3, 55.8)		
Sexo					
Masculino	9 (64.3%)	9 (75.0%)	18 (69.2%)		
Femenino	5 (35.7%)	3 (25.0%)	8 (30.8%)		
Raza					
Blanca	11 (78.6%)	10 (83.3%)	21 (80.8%)		
Negra	3 (21.4%)	2 (16.7%)	5 (19.2%)		
Puntuación de fibrosis Ishak de referencia (n)					
F1	F2	F3	F4	F1	F2
3	6	5	0	3	6

* La mediana y el rango intercuartil (25%, 75%) reportados

[00231] Las muestras de suero fueron tomadas en seis puntos de tiempo, con relación a la línea de base estudio : semana 4, 8, 16, 24, 26, y 30 . Las Biopsias hepáticas pareadas (de detección y 24 semanas) fueron evaluadas por un patólogo central en forma ciega. Ver Manns M, Palmer R, Flisiak E, et al., J Hepatología. 2011, 54 Suplemento 1: S55-S56. El suero LOXL2 se midió utilizando el inmunoensayo LOXL2 descrito en el Ejemplo 1 (Inmunoensayo de sándwich desarrollado en la plataforma de Descubrimiento de Mesoescala).

[00232] Para el análisis estadístico, los sujetos fueron agrupados por puntajes de fibrosis Ishak (1-3: leve a moderada fibrosis; 5-6: cirrosis). No se observó ninguna persona en el estudio que tenga una línea de base del índice de fibrosis de Ishak de 4. Las muestras de suero con LOXL2 detectable por debajo del límite inferior de cuantificación del ensayo (LLOQ) se establecieron para el LLOQ. Las diferencias en los niveles de biomarcadores fueron resumidas descriptiva y gráficamente. Los Intervalos de confianza del 95 % (IC) se construyeron a través de 10.000 arranques de la mediana utilizando el muestreo con reemplazo con los tamaños de las muestras observadas por grupo. Los Valores P se calcularon utilizando pruebas de suma de rango Wilcoxon al comparar los grupos dentro de un punto de tiempo y mediante un modelo lineal de medidas repetidas con un efecto aleatorio dentro de la materia cuando se comparan los grupos en todos los puntos temporales.

RESULTADOS

[00233] La figura 8 muestra los niveles séricos LOXL2 mediante la referencia agrupada de la puntuación de fibrosis Ishak y el tiempo. Cada panel muestra, para el punto de tiempo indicado (semanas 4, 8, 16, 24, 26, 30), la concentración LOXL2 (pg / ml) para dos grupos de pacientes, agrupados de acuerdo con la puntuación de Fibrosis de Ishak (1-3 y 5-6, respectivamente) . Tres valores atípicos (concentración LOXL2 = 5529, 6621, 8845 pg / ml), con concentración LOXL2 fuera de los rangos provenían todos del mismo sujeto, que tiene un índice de fibrosis de Ishak de 5.

[00234] La Figura 9 muestra la mediana dentro de la materia de los niveles séricos LOXL2, calculado como la mediana la concentración sérica LOXL2 durante semanas 4-30, para los dos grupos de pacientes, agrupados de acuerdo con la puntuación de Fibrosis de Ishak (1-3 y 5-6, respectivamente) . El promedio dentro del coeficiente del sujeto de variación fue del 22%.

[00235] La figura 10 muestra la concentración media de suero LOXL2 (pg / ml) en el tiempo (semanas), mediante el índice de fibrosis de Ishak, con intervalos de confianza del 95%. Sólo un sujeto tenía un cambio mayor que o igual a 2 en la puntuación de la fibrosis de Ishak sobre las 25-28 semanas entre las biopsias de estudio.

[00236] La Tabla 4 muestra la mediana de concentración LOXL2 (pg / mL) para cada punto de tiempo, con valores P que muestran significación estadística del aumento en sujetos con cirrosis hepática en comparación con aquellos con insuficiencia renal leve a moderada fibrosis hepática.

Tabla 4: Significancia estadística de los niveles séricos LOXL2 de acuerdo con la fibrosis agrupada

Punto de tiempo	Median de la Conc. de LOXL2 (pg/ml)		Valor-P
	Ishak F1-F3	Ishak F5-F6	
Semana 4	641	1684	0.0149
Semana 8	786	1700	0.0091
Semana 16	814	1457	0.0407
Semana 24	881	1616	0.0596
Semana 26	865	1763	0.0716
Semana 30	711	1118	0.5890
Total	810	1591	0.0275

[00237] Estos resultados confirman la capacidad de una realización de inmunoensayos proporcionadas para medir las concentraciones séricas de proteína LOXL2. Los resultados también demuestran que en este estudio, los niveles de proteína LOXL2 de suero aumentaron significativamente en sujetos con cirrosis hepática, en

72

comparación con aquellos con leve a moderada fibrosis hepática, y que el aumento es mensurable en el suero utilizando formas de realización de los ensayos proporcionados.

Ejemplo 8: Los niveles séricos LOXL2 correlacionados con los niveles de ácido hialurónico TIMP1 en suero en sujetos con infección crónica por el VHC

[00238] El inmunoensayo y el análisis estadístico se llevaron a cabo como en el Ejemplo 7. Además, el ácido hialurónico (HA) y TIMP1 se midieron usando kits de inmunoensayo comerciales. La asociación entre los biomarcadores (LOXL2 y HA o TIMP1) se evaluaron a través de rangos de Spearman de correlación.

RESULTADOS

[00239] La figura 11 muestra la mediana dentro de los niveles de LOXL2 del sujeto vs niveles de ácido hialurónico (HA) (panel izquierdo) y tejido inhibidor de metaloproteinasas-1 (TIMP1) (panel derecho), para los sujetos que tienen los índices Ishak indicados (1-6). La expresión de mediana intra-sujetos se calculó como mediana de expresión desde más de 4 hasta 30 semanas. La curva se construyó utilizando localmente ponderada suavizado gráfico de dispersión.

[00240] Estos resultados demuestran que en este estudio, los niveles de LOXL2 en suero se correlacionaron con los niveles de HA en suero y TIMP1, según se mide usando una realización del inmunoensayo proporcionado.

Ejemplo 9: Los niveles de referencia LOXL2 en pacientes con FPI

A. Pacientes ARTEMIS-IPF

[00241] Las muestras de suero se obtuvieron de los sujetos participantes en el ensayo de ARTEMIS-IPF. Este fue un estudio doble ciego, ensayo controlado por eventos aleatorizado, controlado con placebo. Los sujetos fueron asignados al azar en una proporción de 2:1 para recibir ambrisentan, un antagonista selectivo del receptor de ETA, o placebo. Este estudio se terminó antes de tiempo; 660 sujetos fueron estudiados.

[00242] Se recogieron las variables de referencia reflejo de la gravedad de la FPI y el estado funcional. Las variables de referencia incluyen porcentaje del valor de la capacidad vital forzada (FVC), porcentaje predicho de la capacidad de difusión del monóxido de carbono (DLCO), la distancia recorrida en 6 minutos (6MWD), la presión media de la arteria pulmonar (PAPm), la saturación de oxígeno en reposo más bajo (SpO2), el índice compuesto fisiológico (IPC), la puntuación del St. George Respiratory Questionnaire (SGRQ), y la puntuación del índice de disnea de transición (TDI). La

PAPm se obtuvo a través de un cateterismo cardíaco derecho, lo que se requería de todos los sujetos de estudio al inicio del estudio. El IPC es un modelo multidimensional validado incorporando FVC, el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) y DLCO para estimar el grado de fibrosis visto en una tomografía computarizada del tórax del paciente. El criterio de valoración principal fue el tiempo hasta la progresión de la enfermedad de la FPI, un criterio de valoración compuesto definido como uno de los siguientes: la mortalidad por cualquier causa, la hospitalización respiratoria o una disminución categórica de la función pulmonar, definida como una disminución del 10% en la capacidad vital forzada (FVC) con una disminución del 5% en la capacidad de difusión de monóxido de carbono (DLCO) o una disminución del 15% de la DLCO con una disminución del 5% de la FVC. Los puntos finales de función del pulmón fueron confirmados por dos pruebas de función pulmonar realizadas al menos con 4 semanas de diferencia.

[00243] Los niveles basales de LOXL2 se cuantificaron por triplicado utilizando un inmunoensayo desarrollado en la plataforma de descubrimiento MesoEscala utilizando los anticuerpos anti-LOXL2 descritos en el Ejemplo 1.

[00244] Se utilizaron histogramas estándar para evaluar los niveles no transformados y transformados mediante el $\log_{10}x$ de línea de base LOXL2. Se utilizó la prueba T de Student para comparar la distribución de las variables iniciales. Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para examinar la relación entre los niveles de referencia LOXL2 y variables de referencia. El modelo Cox por pasos de riesgos proporcionales se utilizó para examinar la relación entre los niveles de referencia LOXL2 y resultados del IPF. Curvas de funcionamiento del receptor se utilizaron para estimar el área bajo la curva.

Resultados

[00245] Las muestras de suero de 69 sujetos en la cohorte por intención de tratar, estaban disponibles para el análisis. En comparación con los 423 sujetos de ARTEMIS-IPF para el que no había muestras de suero disponibles, no hubo diferencias estadísticamente significativas en las medidas iniciales de gravedad de IPF o el estado funcional (Tabla 5). Sin embargo, entre los 69 sujetos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en las medidas iniciales de gravedad de la FPI y el estado funcional al comparar el ambrisentan y los grupos de tratamiento con placebo (Tabla 6). Los sujetos en el grupo de ambrisentan tuvieron menor DLCO basal ($p = 0,035$), SGRQ inferior basal 6MWD ($p = 0,004$), el aumento de la PAP media basal ($p = 0,016$), el

aumento del IPC de referencia ($p = 0,05$) y una mayor línea de base ($p = 0,011$). El nivel LOXL2 basal medio fue mayor en los sujetos ambrisentan ($p = 0,026$).

[00246] Análisis de la distribución de los niveles de línea de base LOXL2 mostró 8 sujetos que tuvieron niveles LOXL2 de menos de aproximadamente 88 pg / ml, 34 sujetos que tienen niveles LOXL2 de aproximadamente 88 a aproximadamente 440 pg / ml, y 28 sujetos que tienen niveles LOXL2 de más de aproximadamente 440 pg / ml. La mediana del nivel LOXL2 fue de aproximadamente 325 pg / ml con un rango intercuartil de aproximadamente 147 pg / ml a aproximadamente 770 pg / ml, y mínimo de aproximadamente 18 pg / ml y máximo de aproximadamente 5400 pg / ml.

[00247] Con base en el coeficiente de correlación de Pearson, la correlación fue débil entre los niveles basales LOXL2 y estas medidas iniciales de gravedad de la FPI y el estado funcional. La figura 12 muestra el gráfico de dispersión en matrices que representa la relación entre los niveles de referencia LOXL2 y FVC, DLCO, 6MWD, CPI, SGRQ y TDI. Las correlaciones entre LOXL2 y medidas de la gravedad inicial se destacaron dentro de las cajas oscuras de la fila superior de los paneles (a) y (b). Los coeficientes de correlación entre LOXL2 y las medidas de severidad de referencia individuales fueron los siguientes: -0,21 (FCV), -0,11 (DLCO), 0,03 (6MWD), 0,10 (PAPm), -0,07 (SpO2), 0,14 (IPC), 0,06 (SGRQ) y -0,05 (TDI). Mientras que la transformación mediante el $\log_{10}x$ de los niveles de referencia LOXL2 normalizó la distribución, la correlación entre las medidas LOXL2 y de línea de base de la gravedad de la FPI y el estado funcional se mantuvo débil (Figura 12b).

[00248] Dado que la mayoría de los niveles basales LOXL2 eran menos de aproximadamente 800 pg / ml, los niveles de referencia LOXL2 se dicotomizaron como ≤ 800 pg / ml ("bajo") versus > 800 pg / ml ("alto") para el resto del análisis. De los 28 sujetos que tenían niveles basales LOXL2 de más de alrededor de 440 pg / ml, 12 tenían bajos niveles basales LOXL2 de alrededor 440 a 800 pg / ml y se agruparon en el grupo de baja, y 16 tenían niveles basales LOXL2 de más de 800pg / ml y se agruparon en el grupo alto.

[00249] La comparación de la progresión de la enfermedad entre grupos de nivel de línea de base "bajos" y "altos" de LOXL2 se muestra en la Figura 13. Debido a que sólo hubo dos pacientes que tienen líneas de niveles basales de LOXL2 "alto" en el grupo placebo (ninguno de los cuales tenía ningún evento), la Figura 13 compara sólo "bajos" y "altos" niveles de referencia LOXL2 en el grupo de ambrisentan. Los resultados indicaron que el alto nivel de la línea de base LOXL2 se asoció con más

eventos de progresión de la enfermedad (Figura 13a) y que los altos niveles de referencia LOXL2 se asociaron con más eventos pulmonares declives de la función (Figura 13b), más hospitalizaciones respiratorias (Figura 13c) y más muertes (Figura 13d).

[00250] Además, como se muestra en la Tabla 7, el modelo Cox de riesgos proporcionales indica que la presencia de un alto nivel de línea de base LOXL2 se asoció con un aumento de 5 veces en el riesgo de progresión de la enfermedad (tasa de riesgo [HR] 4,95, 95% intervalo de confianza [IC] 1,52 -16,18, $p = 0,008$), un aumento de 7 veces en el riesgo de deterioro de la función pulmonar (HR 7,36, IC del 95%: 1,16 = 46,74, $p = 0,034$) y un aumento de 5 veces en el riesgo de hospitalización respiratoria (HR 4,85, IC del 95% 1,09 a 21,68, $p = 0,039$). Todos estos modelos estadísticos se ajustaron para la asignación del tratamiento y línea de base 6MWD y puntuación del IPC. Los altos niveles LOXL2 basales no se asociaron significativamente con un aumento significativo en el riesgo de muerte (HR 1,59, IC del 95%: 0,24 a 10,53, $p = 0,633$).

[00251] También se analizaron muestras para los niveles de MMP7, ICAM1, IL8, VCAM1, y la S100A12. Ninguna de estas proteínas se asoció significativamente con los resultados del tratamiento. Los resultados mostraron que los niveles de línea de base altos de LOXL2 se asociaron con un aumento de 5-7 veces en el riesgo de progresión de la enfermedad IPF, pero no a la muerte.

[00252] Tabla 5. Comparación de la gravedad inicial de la PFI y el estado funcional de acuerdo con la disponibilidad de suero en Artemis-PFI

Mediciones Basales de la Severidad de PFI	Sin suero N=423	Suero N=69	Valor P
Media% FVC (SD)	69 (14)	70 (12)	0.649
Media % DLCO (SD)	43 (14)	42 (11)	0.487
Media 6MWD m (SD)	416 (120)	399 (116)	0.256
Media PAP mmHg (SD)	20 (7)	20 (6)	0.920
Media SpO2 % más bajo (SD)	88 (6)	88 (6)	0.825
Media CPI (SD)	52 (11)	53 (9)	0.784
Media SGRQ (SD)	39 (20)	38 (18)	0.605
Media TDI (SD)	7 (2)	8 (2)	0.588

[00253] Tabla 6. Comparación de la gravedad inicial de la PFI y el estado funcional de acuerdo a la asignación del tratamiento en Artemis-PFI entre los sujetos con suero de inicio de estudio disponibles

Mediciones Basales de la Severidad de PFI	Ambrisentan N=49	Placebo N=20	Valor P
Media % FVC (SD)	68 (12)	73 (12)	0.128
Media % DLCO (SD)	40 (11)	47 (9)	0.035
Media 6MWD m (SD)	373 (109)	461 (110)	0.004
Media PAP mmHg (SD)	22 (6)	18 (5)	0.016
Media de SpO ₂ % más bajo (SD)	87 (6)	87 (5)	0.166
Media CPI (SD)	54 (9)	49 (8)	0.050
Media SGRQ (SD)	42 (19)	29 (15)	0.011
Media TDI (SD)	7 (2)	8 (2)	0.083
Media LOXL2 (SD)	903 (1172)	295 (288)	0.026

[00254] Tabla 7. Niveles al inicio del estudio de LOXL2 en sujetos con PFI y su relación con los criterios de valoración del estudio.

Criterios de Valoración	# de Eventos		Tasa de Peligro (IC al 95%) para alto LOXL2	Valor P
	Bajo LOXL2	Alto LOXL2		
Progresión de la enfermedad	10	8	4.95 (1.52-16.18)	0.008
Declive de la función pulmonar	5	4	7.36 (1.16-46.74)	0.034
Hospitalización respiratoria	6	6	4.85 (1.09-21.68)	0.039
Muerte	5	4	1.59 (0.24-10.53)	0.633

B. Sujetos con PFI de la cohorte GAP

[00255] Los niveles séricos de LOXL2 se evaluaron en los sujetos en un segundo estudio prospectivo de seguimiento clínico de PFI, que evaluó la progresión de la enfermedad en 111 sujetos con PFI (considerados la cohorte GAP) que no tenían antecedentes de otras enfermedades pulmonares. Todos los individuos de esa cohorte GAP fueron diagnosticados con PFI según las directrices ATS/ERS, confirmado por biopsia pulmonar quirúrgica o hallazgos radiográficos de cambios en el patrón de panal de abeja subpleural, bronquiectasias de tracción y llenado alveolar mínimo en sujetos mayores de 55 años de edad y sin una etiología definida. Las pruebas de función pulmonar revelaron una capacidad vital forzada del 40-70% del valor esperado. Los sujetos fueron capaces de recibir toda la atención continua y el seguimiento en un centro clínico.

[00256] En la visita inicial, cada participante tuvo una extracción de sangre, pruebas de función pulmonar, test de marcha de 6 minutos (TC6), ecocardiograma y TC, y varios cuestionarios diseñados para medir cómo se sentía el sujeto. En las visitas de seguimiento en intervalos de 3-8 meses, se recogieron muestras de sangre y se repitieron las pruebas de función pulmonar, cuestionarios y TC6s. La mediana de CVF,

FEV1 y DLCO fueron $65.7 \pm 17.5\%$, $76.8 \pm 18.7\%$, y $47.3 \pm 17.9\%$ de los valores previstos, respectivamente.

[00257] Los niveles séricos basales de LOXL2 se cuantificaron como se describe anteriormente para los sujetos de Artemis-PFI. Se utilizaron histogramas estándar para evaluar los niveles séricos de LOXL2 al inicio del estudio en el formato de log natural. El LLOD de 180 pg/mL y el LLOQ de 440 pg/ml se determinaron experimentalmente.

[00258] Los niveles de LOXL2 para la cohorte GAP se normalizaron a los datos de ARTEMIS-PFI después de la transformación logarítmica natural utilizando un método de regresión. Los resultados se muestran en la Figura 14.

[00259] El tiempo para progresar hasta mortalidad por cualquier causa fue evaluado, con un trasplante de pulmón considerado como un evento de muerte (la mayoría de los sujetos con trasplante de pulmón murieron). Se aplicó un método de clasificación y de árboles de regresión (CART) como un enfoque imparcial para seleccionar el umbral óptimo o punto de corte para la dicotomización de los niveles séricos de LOXL2 al inicio del estudio En la cohorte de GAP, cuando Log (LOXL2) fue la única variable, el análisis CART seleccionó 440 pg/mL (6.08 en la escala de logaritmo natural) como el punto de corte.

[00260] La tabla 8A muestra las características basales y demográficas de los sujetos en la cohorte de GAP, y en la Tabla 8B se muestra la correlación entre los distintos valores al inicio del estudio esta cohorte.

[00261] **Tabla 8A: GAP Características Basales y Demográficas de la Cohorte**

Variable	N	Mean (Std)	Median (Min, Max)
Sexo	M: 74 (67%) F: 37 (33%)		
Edad (Años)	111	67 (9.3)	67 (3, 84)
FVC % Predicho	73	66 (18)	64 (34, 113)
FEV ₁ % Predicho	73	77 (19)	74 (37, 129)
DLCO % Predicho	73	48 (18)	46 (14, 109)
CPI	73	52 (13)	52 (12, 78)

Distancia de Caminata a los 6 minutos	17	912 (420)	890 (100, 1555)
LOXL2	111	1495 (2307)	717 (90, 15708)
LOG (LOXL2)	111	7 (1)	7 (5, 10)
LOG (LOXL2) *	111	6 (1)	6 (5, 9)

* LOXL2 normalizado a través de un método de regresión

[00262] **Tabla 8B: Correlación entre las variables al inicio del estudios**

	Edad	FVC % pred.	FEV1 % pred.	DLCO % pred.	CPI
Log LOXL2	-0.7	-0.03	-0.06	-0.28	-0.24
Edad		0.07	0.23	0.02.	0.05
FVC % pred.			0.93	0.38	-0.61
FEV1 % pred.				0.47	-0.60
DLCO % pred.					-0.95

[00263] La correlación entre los niveles LOXL2 dicotomizados y la mortalidad por cualquier causa fue evaluada usando el modelado proporcional de riesgos Cox y gráficos de supervivencia de Kaplan- Meier a los seis (6) meses, doce (12) meses, dieciocho (18) meses y veinticuatro (24) meses después del inicio del estudio . La correlación entre los niveles de LOXL2 al inicio del estudio y la hospitalización y disminución de la función pulmonar no se evaluó ya que no se disponía de datos.

[00264] El análisis de la distribución de los niveles de LOXL2 al inicio del estudio mostró una distribución sesgada hacia el espectro inferior, similar a la observada para la cohorte de ARTEMIS-PFI. El nivel de LOXL2 al inicio del estudio fue 716.5pg/mL (rango intercuartil 358.3 pg/mL, 1446.6 pg/mL). La correlación fue débil entre LOXL2 y los datos demográficos de referencia y los indicadores clínicos al inicio del estudio de la gravedad de PFI (coeficientes de correlación para edad de -0.07, CVF - 0.03, DLCO -0.28). Indicadores clínicos adicionales de gravedad de la enfermedad no estuvieron disponibles para el análisis.

[00265] Los resultados mostraron que un nivel umbral de LOXL2 en suero de 440 pg/mL al inicio del estudio se correlacionó con el riesgo de mortalidad por cualquier causa. La presencia de un nivel LOXL2 al inicio del estudio superior a 440 pg/mL en el suero se asocia con más muertes a los 12, 18, y 24 meses después del inicio del estudio. (Figura 15 A y B).

[00266] El modelado de riesgos proporcionales Cox (las covariables incluyeron la edad y el sexo) sugiere que la presencia de un nivel LOXL2 al inicio del estudio superior a 440 pg/mL se asoció con un aumento de 2.3 veces el riesgo de muerte a los 12, 18, y 24 meses después del inicio del estudio (ver Tabla 9A y B).

[00267] **Tabla 9A: Tasas de eventos y cocientes de riesgos para los sujetos con bajos (≤ 440 pg/mL) versus (>440 pg/mL) niveles de LOXL2 al inicio del estudio, a los 6, 12, 18, y 24 meses después del inicio del estudio en la cohorte de GAP.**

Tiempo luego del Basal	Tasa de evento		Tasa de Riesgo* (IC al 95%)	Valor P
	Bajo LOXL2	Alto LOXL2		
6 meses	5/52 (10%)	10/59 (17%)	1.76 (0.60, 5.22)	0.3051
12 meses	10/52 (19%)	23/59 (39%)	2.27 (1.05, 6.98)	0.0319
18 meses	12/52 (23%)	26/59 (44%)	2.22 (1.12, 4.43)	0.0231
24 meses	14/52 (27%)	30/59 (51%)	2.31(1.22, 4.37)	0.0105

*Los modelos incluyen la edad y el sexo como covariables

[00268] **Tabla 9B: Tasas de eventos y cocientes de riesgos para los sujetos con bajos (≤ 440 pg/mL) versus altos (>440 pg/mL) niveles de LOXL2 al inicio del estudio, a los 6, 12, 18, y 24 meses después del inicio del estudio en la cohorte de GAP.**

Tiempo luego del Basal	Tasa de evento		Tasa de Riesgo (IC al 95%)	Valor P
	Bajo LOXL2	Alto LOXL2		
6 meses	2/36 (6%)	3/13 (23%)	5.08 (0.85, 30.47)	0.0756
12 meses	5/36 (14%)	3/13 (23%)	1.90 (0.45, 7.99)	0.3796
18 meses	5/36 (14%)	3/13 (23%)	1.90 (0.45, 7.99)	0.3796
24 meses	5/36 (14%)	4/13 (31%)	2.11(0.54, 8.24)	0.2846

[00269] Para un subconjunto de sujetos, se recogieron muestras de suero adicionales de forma prospectiva. Durante la duración del estudio, dos (2) muestras fueron recolectadas de 60 sujetos, tres (3) muestras fueron recolectadas de 42 sujetos, cuatro (4) muestras se recolectaron de 31 sujetos, cinco (5) muestras se recolectaron de 17 sujetos, seis (6) muestras se recolectaron de 12 sujetos, siete (7) muestras se

recolectaron de siete (7) sujetos, y ocho (8) muestras se recolectaron de dos (2) sujetos. Ninguna de las muestras se recolectaron en asociación con una exacerbación aguda.

[00270] El modelado de riesgos proporcionales multivariado Cox (con covariables incluyendo la edad y el sexo), incorporando los niveles LOXL2 en cada una de las muestras como una variable continua en función del tiempo, para evaluar la relación entre los niveles séricos de LOXL2 y la mortalidad por cualquier causa. Los niveles séricos de LOXL2 medidos con el tiempo se asociaron con el riesgo de mortalidad ($p = 0.003$). En la cohorte de GAP, por cada aumento de 2.7 veces en el nivel de LOXL2 de suero recolectado en cualquier momento durante el estudio, el riesgo para la mortalidad aumentó en 1.63 veces (intervalo de confianza al 95% de 1.19 a 2.25).

[00271] La Tabla 10 muestra los resultados de un análisis multivariado con niveles séricos de LOXL2 en distintos momentos después del inicio del estudio.

[00272] **Tabla 10: Análisis multivariado según los niveles bajos (<440 pg/mL) versus altos (>440 pg/mL) de niveles séricos LOXL2 a los 6, 12, 18 y 24 meses después del inicio del estudio.**

Variable de Respuesta	Termino del Modelo	Tasa de Riesgo (CI al 95%)	valor P
Tiempo de muerte a los 6 meses	Log LOXL2 ($\leq$ o > 6.08)	1.8 (0.6, 5.2)	0.305
	Sexo	*0.5 (0.1, 1.8)	0.299
	Edad (Continuo)	1.0 (1.0, 1.1)	0.931
Tiempo de muerte a los 12 meses	Log LOXL2 ($\leq$ o > 6.08)	2.3 (1.1, 7.0)	0.032
	Sexo	*0.4 (0.2, 0.9)	0.037
	Edad (Continuo)	1.0 (1.0, 1.0)	0.647
Tiempo de muerte a los 18 meses	Log LOXL2 ($\leq$ o > 6.08)	2.2 (1.1, 4.4)	0.023
	Sexo	*0.5 (0.2, 1.0)	0.052
	Edad (Continuo)	1.0 (1.0, 1.0)	0.848
Tiempo de muerte a los 24 meses	Log LOXL2 ($\leq$ o > 6.08)	2.3 (1.2, 4.4)	0.011
	Sexo	*0.4 (0.2, 1.0)	0.026
	Edad (Continuo)	1.0 (1.0, 1.0)	0.808

*La relación de riesgo favorece a los sujetos mujeres

[00273] Los resultados de la cohorte de GAP fueron similares a los del estudio de ARTEMIS-PFI descrito anteriormente. Ambos estudios mostraron que un nivel de LOXL2 en suero al inicio del estudio que fue mayor que el nivel de umbral se asoció con un mayor riesgo de resultados negativos en los sujetos con PFI .

Ejemplo 10: Niveles LOXL2 en suero al inicio del estudio en sujetos con hepatitis B crónica (HBC)

[00274] Los niveles séricos de LOXL2 fueron evaluados en sujetos con hepatitis B crónica (HBC) y fibrosis hepática, tanto antes del tratamiento y después de 240 semanas de tratamiento con 300 mg de tenofovir disoproxil fumarato (TDF). Las biopsias hepáticas se tomaron de 348 sujetos humanos con HBC, antes del tratamiento y después de 240 semanas de tratamiento con TDF. Las biopsias fueron asignadas a puntuaciones por los patólogos utilizando la escala Ishak para la evaluación de la fibrosis. En el estudio, 96.3% de los sujetos mostró una mejora en, o ninguna progresión de, la fibrosis hepática. De los 96 sujetos que comenzaron el estudio con cirrosis comprobada por biopsia, el 74% tuvo una regresión de la cirrosis después de 240 semanas de tratamiento.

[00275] Los niveles séricos de LOXL2 fueron evaluados a posteriori por ELISA al inicio del estudio y en la semana 240 para 81 de los 348 sujetos, entre ellos varios sujetos exhibieron una mejora en la puntuación de la fibrosis. En la semana 240 después del tratamiento, 42 de estos 81 sujetos tuvieron regresión de la cirrosis, 16 tuvieron cirrosis persistente, 2 habían progresado a cirrosis en el transcurso del tratamiento, 18 sujetos fueron no cirróticos con ningún cambio en la fibrosis, y 3 fueron sujetos no cirróticos con al menos una reducción de 2 puntos en la fibrosis tal como se mide por Ishak.

[00276] Los niveles de LOXL2 en suero al inicio del estudio estuvieron elevados en el 91% de los 81 sujetos con HBC y en el 97% de los sujetos cirróticos. Como se muestra a continuación, los sujetos con cirrosis (puntuación Ishak de 5 o 6) tuvieron niveles medios de LOXL2 elevados en suero al inicio del estudio en comparación con los sujetos con fibrosis hepática menos grave. Esta observación es similar a los niveles séricos de LOXL2 observados en los sujetos con infección crónica por hepatitis C. Por otra parte, el estudio histológico mostró que la proteína LOXL2 se concentró en los sitios de la fibrogénesis activa (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que los sujetos con cirrosis todavía están experimentando fibrogénesis activa en el hígado. Además, en el transcurso de 240 semanas de tratamiento, el 72% de los 60 sujetos con cirrosis al inicio del estudio mostró una regresión o la mejora de su puntuación de fibrosis de Ishak. Además, estos sujetos tuvieron un nivel medio de LOXL2 en suero más bajo en la semana 240 en comparación con el valor al inicio del estudio. Los resultados sugieren que tanto la fibrosis como la fibrogénesis en general se redujeron con un tratamiento anti-viral.

[00277] La Figura 16A muestra que los niveles LOXL2 en suero (pg/mL) se correlacionaron con la puntuación de fibrosis, y las figuras 16B y 16C muestran que los niveles séricos de LOXL2 al inicio del estudio (pg/mL) se correlacionó con la puntuación al inicio del estudio del índice de fibrosis de Ishak. A 240 semanas después del tratamiento, los niveles séricos de LOXL2 se habían reducido y ya no se correlacionaron con la puntuación de fibrosis de Ishak. Véase también la Tabla 11.

[00278] **Tabla 11: Media de niveles de LOXL2 en suero en comparación con la Etapa de Ishak Etapa al inicio del estudio y 240 semanas después de iniciar el tratamiento**

	N	Nivel basal	N	Semana 240
Todos los Sujetos (media de LOXL2 (pg/mL))	81	2678.6	81	748.9
Estado de Ishak 0-3 (media de LOXL2 (pg/mL))	18	510.2	56	746.8
Estado de Ishak 4-6 (media de LOXL2 (pg/mL))	63	3298.2	25	753.5

[00279] Como se muestra en la Figura 17, todos los sujetos que tienen una etapa de Ishak al inicio del estudio entre 1 y 3 tuvieron un nivel de LOXL2 en suero por debajo de 1500 pg/mL y 49% de los sujetos con una etapa de Ishak al inicio del estudio entre 4 y 6 tuvieron niveles de LOXL2 en suero por encima de 1500 pg/mL.

[00280] El 79% de los 81 sujetos experimentaron una reducción en los niveles séricos de LOXL2. El 11% de los sujetos (cada uno con un nivel al inicio del estudio por debajo del límite de cuantificación) no tuvo ningún cambio en los niveles de LOXL2.

[00281] La figura 18 muestra los niveles de LOXL2 (pg/mL) en suero al inicio del estudio y en la semana 240 para sujetos individuales en los siguientes grupos: sujetos con cirrosis persistente a la semana 240 (n = 16, Figura 18A); sujetos con reversión de la cirrosis a la semana 240 (n = 42, Figura 18B); sujetos no cirróticos que no experimentan un cambio en la etapa fibrótica (Ishak) a la semana 240 (n = 18, Figura 18C); sujetos que experimentaron una progresión a cirrosis en el transcurso de la estudio (Figura 18D); y sujetos no cirróticos con mayor que o igual a reducción de etapa 2 en la fibrosis a la semana 240 (Figura 18E).

[00282] La Tabla 12 compara los niveles de LOXL2 (pg/mL) en suero al inicio del estudio y a la semana 240 en sujetos con cirrosis persistente a la semana 240, sujetos con cirrosis revertida a la semana 240, y sujetos no cirróticos que no experimentaron

ningún cambio en el cambio fibrótico en el transcurso del estudio ("No Δ, no cirróticos").

[00283] **Tabla 12: Cambio en los niveles séricos de LOXL2 en diferentes grupos de sujetos con HBC**

	Cirrosis Persistente (n=16)		Cirrosis Revertida (n=42)		Sin Cirrosis, Sin Δ (n=18)	
	Basal	Sem 240	Basal	Sem 240	Basal	Sem 240
Media	9124.1	603.8	1355.0	922.6	798.4	436.8
Mediana	1863	LOQ	1073	< LOQ	< LOQ	< LOQ
< LoQ	2 (13%)	8 (50%)	4 (10%)	29 (69%)	10 (56%)	14 (78%)
< LoD	1 (6%)	2 (13%)	1 (2%)	13 (31%)	4 (22%)	8 (44%)
< 1000	5 (31%)	14 (88%)	20 (48%)	35 (83%)	13 (72%)	15 (83%)
> 3000	5 (31%)	0 (0%)	2 (5%)	3 (7%)	1 (6%)	0 (0%)
Disminuye		14 (88%)		37 (88%)		9 (50%)
Incrementa		0 (0%)		5 (12%)		2 (11%)

[00284] Como se muestra en la Tabla 12, el 88% de los sujetos con cirrosis tuvo una reducción en los niveles de LOXL2. Además, se determinó que los niveles séricos de LOXL2 al inicio del estudio eran los más altos en aquellos sujetos que en la semana 240 tenían cirrosis persistente.

[00285] La figura 19 muestra el porcentaje de sujetos cirróticos determinado a tener una mejoría histológica en la semana 240 ("Y") teniendo dados niveles séricos de LOXL2 al inicio del estudio (<1500,> 1500, 1500-3000, <3000 y > 3000 pg/mL) y el porcentaje de sujetos cirróticos determinados a no tener mejoría histológica en la semana 240 ("N") teniendo los mismos niveles dados de LOXL2 en suero al inicio del estudio. Como se muestra, los sujetos cirróticos con un nivel de LOXL2 en suero al inicio del estudio inferior a 1500 pg/mL tuvieron un 88% de posibilidades de regresión. Los sujetos cirróticos con un nivel de LOXL2 en suero al inicio del estudio entre 1500 pg/mL y 3000 pg/mL tuvieron una probabilidad del 70% de regresión, mientras que los sujetos cirróticos con un nivel sérico al inicio del estudio por encima de 3000 pg/mL tuvieron solamente una probabilidad del 29% de regresión. Por lo tanto, en los pacientes con cirrosis, los niveles séricos de LOXL2 al inicio del estudio por debajo de 1500 pg/mL se asociaron con una probabilidad del 88% de regresión, mientras que los niveles

séricos de LOXL2 al inicio del estudio por encima de 3000pg/mL se asociaron con una probabilidad del 29% de regresión.

[00286] Los niveles séricos de LOXL2 se correlacionaron más con la etapa de fibrosis de Ishak a la semana 240 que con el estadio de fibrosis al inicio del estudio. Esto sugiere que los niveles séricos de LOXL2 elevados reflejan la fibrogénesis activa.

[00287] Los resultados de este estudio demostraron que los niveles séricos de LOXL2 fueron elevados en pacientes con HBC y fueron más altos en los que tienen más fibrosis, lo que demuestra una correlación general entre LOXL2 en suero y la puntuación de fibrosis. Los niveles de LOXL2 en suero reflejan la enfermedad activa y la fibrogénesis activa (por ejemplo, dado que niveles al inicio del estudio más altos se asociaron con estadios de fibrosis más altas en la semana 240). El tratamiento de la HBC subyacente resultó en una disminución de LOXL2 en la mayoría de los pacientes, lo que sugiere regulación negativa de la fibrogénesis. Hubo una disminución de LOXL2 en suero después de 5 años, incluso en los pacientes con puntuaciones de fibrosis sin cambios que estaban clínicamente bien. Los resultados demuestran el nivel de LOXL2 en suero como un marcador de la enfermedad activa y LOXL2 alto es predictivo de la falta de regresión

[00288] Aunque la presente invención ha sido descrita con referencia a las personificaciones específicas de la misma, debe entenderse por los expertos en la técnica que varios cambios se pueden hacer y se pueden sustituir equivalentes sin apartarse del verdadero espíritu y alcance de la invención. Además, muchas modificaciones se pueden hacer para adaptar una situación, material, composición de materia, proceso, paso de proceso o pasos, al objetivo, espíritu y alcance de la presente invención. Todas estas modificaciones están destinadas a estar dentro del alcance de las reivindicaciones anexas al presente documento.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Un método para detectar, predecir, o monitorear una enfermedad o condición, en donde el método comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida a partir de un individuo con un anticuerpo específico para lisil oxidasa homologa 2 (LOXL2); y

b) detectar la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, para de este modo detectar el nivel de LOXL2 en la muestra líquida,

en donde el nivel detectado de LOXL2 indica la presencia o ausencia de la enfermedad o condición en el individuo o la probabilidad de una respuesta a un tratamiento para la enfermedad o condición del individuo.

2. Un método de pronóstico para una enfermedad o condición, en donde el método comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida a partir de un individuo que tiene la enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa homologa 2 (LOXL2); y

b) detectar la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de este modo el LOXL2 en la muestra líquida,

en donde el nivel de LOXL2 detectado indica la probabilidad de un resultado, evento, o criterio de valoración de una enfermedad o condición.

3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde:

El individuo está siendo sometido a un tratamiento para la enfermedad o condición; y

un nivel de LOXL2 detectado en el paso (b) que es menor que un determinado nivel en un momento anterior en el individuo indica la eficacia del tratamiento.

4. El método de la reivindicación 3, en donde el nivel determinado en un momento anterior es un nivel de pre-tratamiento.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la muestra líquida es sangre, una parte de la sangre, orina, saliva, esputo, o lavado broncoalveolar.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el anticuerpo específico para LOXL2 comprende un nivel detectable.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que además comprende la inmovilización del LOXL2 presente en la muestra líquida sobre un soporte insoluble, en donde el inmovilizante es puesta en contacto con la muestra líquida con un segundo anticuerpo específico para LOXL2 formar un segundo complejo anticuerpo-LOXL2, en donde el segundo anticuerpo está inmovilizado sobre el soporte insoluble.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la inmovilización se lleva a cabo antes de la etapa (a).

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el anticuerpo en el paso (a) es capaz de unirse a LOXL2 cuando el LOXL2 está enlazada a un agente que inhibe la actividad enzimática de LOXL2.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el agente es un inhibidor alostérico de la actividad enzimática de LOXL2.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal anti-LOXL2.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo monoclonal anti-LOXL2 se enlaza a un epítopo dentro del dominio SRCR3-4 de LOXL2.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-12, que además comprende:

c) comparar dicho nivel detectado con un valor normal control, en donde un nivel detectado que es mayor que un valor normal control es indicativo de la presencia

de la enfermedad o condición o una probabilidad de que el individuo responderá a un tratamiento para la enfermedad o condición.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en donde la enfermedad o condición es una enfermedad fibrótica o cáncer.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la enfermedad o condición es una enfermedad fibrótica y un nivel circulante de LOXL2 que es mayor que un nivel normal control indica que el individuo es probable que tenga una respuesta clínica beneficiosas a un tratamiento para la enfermedad fibrótica.

16. El método de la reivindicación 14 o reivindicación 15, en donde el enfermedad o condición es fibrosis pulmonar, fibrosis de hígado, fibrosis de riñón, fibrosis cardíaca, o mielofibrosis, cirrosis, hepatitis crónica viral, virus de la hepatitis C (HCV) o virus de la hepatitis B (HBV).

17. El método de la reivindicación 16, en donde el enfermedad o condición fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

18. El método de la reivindicación 17, en donde el nivel detectado indica la probabilidad de un resultado de la enfermedad IPF, criterio de valoración, o evento individual.

19. El método de la reivindicación 18, en donde el resultado de la enfermedad IPF, criterio de valoración, o evento es progresión de la enfermedad IPF, declive de la función pulmonar, respiratorio hospitalización, supervivencia libre de trasplante, muerte, o respuesta al tratamiento.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en donde el método además comprende detectar una medida de severidad de la enfermedad IPF o estado funcional del individuo, en donde la medida es seleccionada a partir del grupo que consiste de porcentaje de capacidad vital forzada predicha (FVC), porcentaje de capacidad de difusión de monóxido de carbono predicho (DL_{CO}), distancia de caminata de 6 minutos (6MWD), media de la presión arterial pulmonar (mPAP), saturación baja

de oxígeno en reposo (SpO₂), índice fisiológico compuesto (CPI), Puntuación en el Cuestionario Respiratorio de St. George (SGRQ), escore transición de Disnea (TDI), la capacidad de respuesta al tratamiento, y biomarcadores de la enfermedad IPF.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-20, que además comprende analizar el nivel de LOXL2 usando un modelo predictivo.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21, que además comprende iniciar, alterar, o interrumpir el tratamiento de la enfermedad o condición en el individuo.

23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-22, que además comprende someter al individuo a una o más pruebas de diagnóstico.

24. El método de la reivindicación 23, en donde la una o más pruebas de diagnóstico adicionales es una prueba de función pulmonar o una prueba de función hepática.

25. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, en donde el nivel detectado indica que el individuo tiene una enfermedad activa fibrótica o un estado avanzado de enfermedad fibrótica.

26. El método de la reivindicación 25, en donde el active enfermedad fibrótica es METAVIR F1 o fibrosis hepática F2, o la enfermedad fibrótica de estado avanzado es fibrosis hepática METAVIR F4.

27. Un dispositivo de ensayo para ser usado en la determinación del nivel de un polipéptido lisil oxidasa homolog 2 (LOXL2) en una muestra de líquido biológico obtenido a partir de un individuo, donde el dispositivo comprende: una matriz que define una vía axial de flujo, donde la matriz comprende:

i) una zona de recepción de muestra en un extremo corriente arriba de la trayectoria de flujo que recibe la muestra de fluido;

ii) una o más zonas de prueba posicionadas dentro de la vía de flujo y corriente abajo desde la zona de recepción de la muestra, en donde cada una de dichas una o más

zonas de recepción de muestra comprende un anticuerpo específico para LOXL2, en donde cada uno de dichos anticuerpos específicos para LOXL2 es capaz de unirse a un polipeptido LOXL2 presente en una muestra de líquido para formar un anticuerpo anti-LOXL2/complejo LOXL2; y

iii) una o más zonas de control posicionadas dentro de la vía de flujo y corriente abajo desde la zona de recepción de la muestras.

28. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 27, en donde, cuando la una o más zonas de prueba comprende al menos dos zonas de prueba, al menos una de la una o más zonas de control está posicionada entre las dos zonas de prueba.

29. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 28, en donde la al menos dos zonas de prueba y la al menos una zona de control están posicionadas en un formato alternado dentro de la vía de flujo comenzando con una zona de prueba posicionada corriente arriba de cualquier zona de control.

30. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 28 o 29, en donde uno o más de dichos anticuerpos anti-LOXL2 están inmovilizados en la matriz en la zona de prueba.

31. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 27-30, que además comprende una zona de etiquetado, que comprende un anticuerpo etiquetado específico para el anticuerpo específico para LOXL2, en donde:

El anticuerpo etiquetado es capaz de unirse a un anticuerpo anti-LOXL2 presente en un anticuerpo anti-LOXL2/ complejo LOXL2, para formar un anticuerpo anti-LOXL2 /LOXL2, etiquetado y

El anticuerpo etiquetado es se puede mover en presencia de la muestra l.

32. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 31, en donde el anticuerpo marcado comprende un componente marcado seleccionado a partir del grupo que consiste de un agente quimiolumincente, una partícula marcada, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

33. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 27-32, en donde la matriz está posicionada dentro de una carcasa que comprende un soporte y opcionalmente una tapa, en donde la carcasa contiene una abertura de aplicación y uno o más puertos de observación.

34. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-33, en donde el dispositivo es una tira de pruebas.

35. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-34, en donde el dispositivo es un dispositivo de ensayo de varilla reactiva.

36. Un kit para determinar el nivel de un polipéptido de lisil oxidasa homólogo 2 (LOXL2) en una muestra biológica obtenida de un individuo, donde el kit comprende:

- a) un primer anticuerpo específico para LOXL2; y
- b) un segundo anticuerpo específico para LOXL2.

37. El kit de la reivindicación 36, que además comprende LOXL2 purificado para ser usado en la generación de una curva estándar.

38. El kit de la reivindicación 36 o reivindicación 37, en donde al menos uno de dichos anticuerpos comprende un nivel detectable.

39. El kit de la reivindicación 38, en donde la etiqueta detectable comprende un agente quimioluminiscente, una partícula marcada, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-26, en donde el la puesta en contacto y la detección son llevadas a cabo usando el dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 27-35 o el kit de las reivindicaciones 36-39.

RESUMEN

La presente descripción proporciona un ensayo para detectar y/o cuantificar polipéptidos circulantes de lisil oxidasa-homólogo 2 (LOXL2) en un individuo. El ensayo es útil en aplicaciones de diagnóstico y prognosis, las cuales también son proveídas.

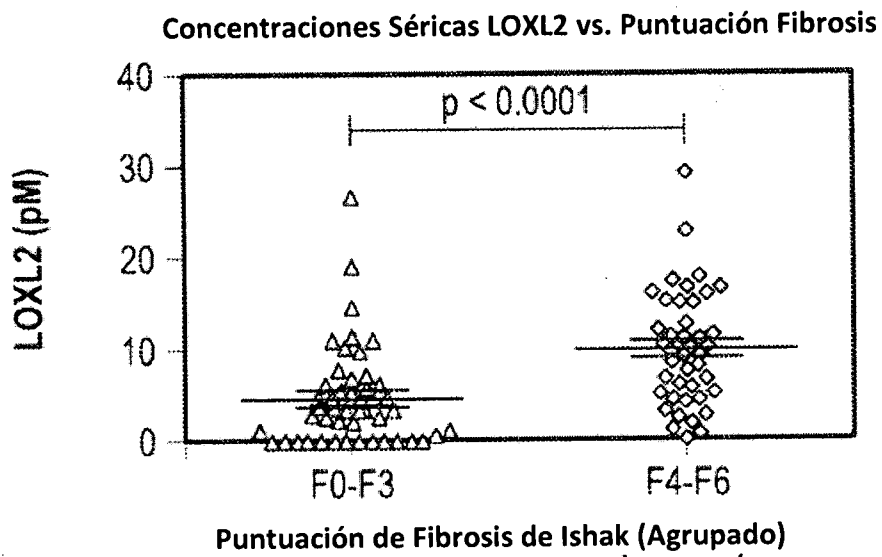


FIG. 1

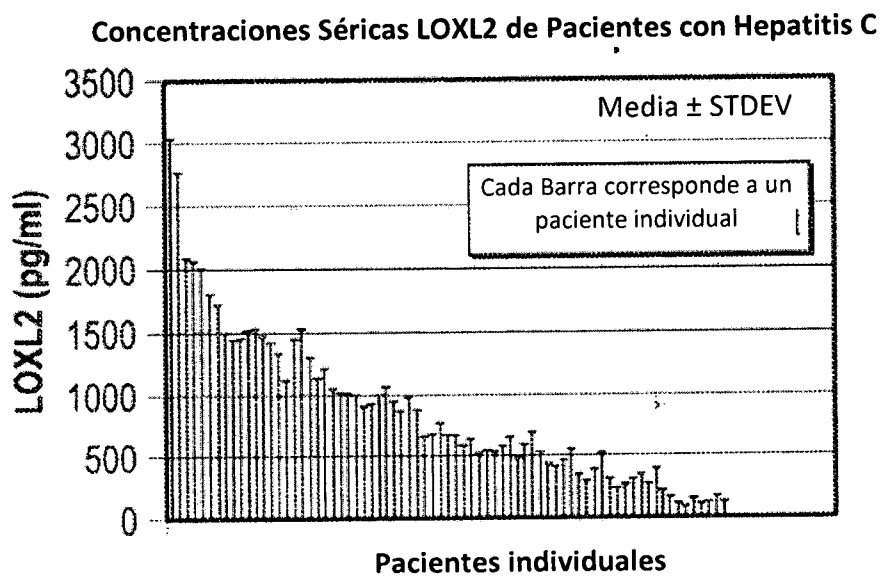


FIG. 2

94

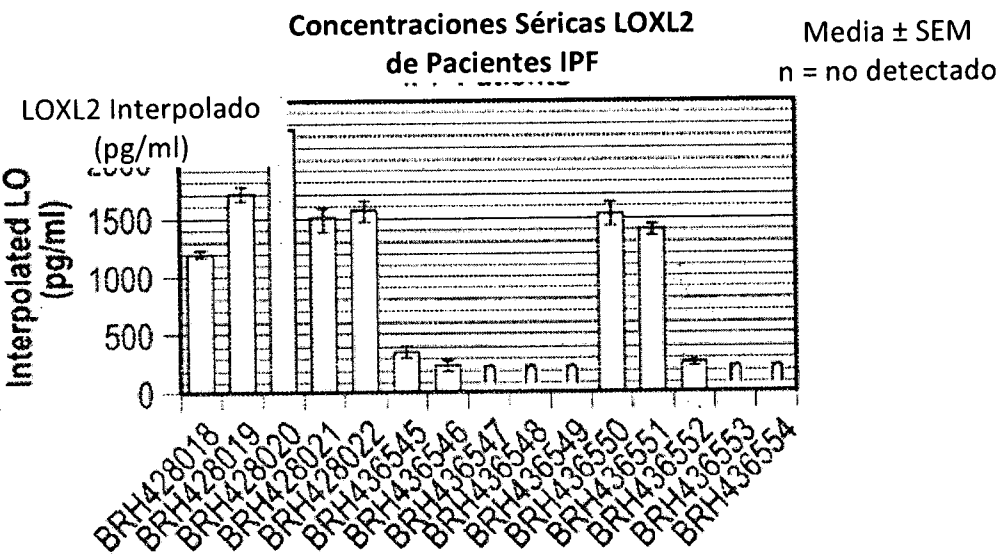


FIG. 3

MERPLCSHLC SCLAMLALLS PLSLAQYDSW PHYPEYEQP APEYHQPOAP ANVAKTQLRL 60
SIGNAL PEPTIDE
ACQKRKHSEG RVEVYYDGQW GTVCDDDFSI HAAHVVCREL GYVEAKSWTA SSSYGKGEGP 120
SRCR1
IWLDNLHCTG NEATLAacts NGWGVTDCKH TEDVGVVCSd KRIpgfkFDN SLINQIENLN 180
IQVEDIRIRA ILSTYRK RTP VMegYVEVKE GKTWKOICDK HWTAKNSRVV CGMFGFPGER 240
TYNTKVYKME ASRRKQRYWP FSMDCTGTEA HISSCKLGPO VSLDPMKNVT CENGLPAVVS 300
SRCR2
CVPGQVFSPD GPSRFRKAYK PEQPLVRLRG GAYIGEGRVE VLKNGEWGTV CDDKWDLVSA 360
SVVCRELGFG SAKEAVTGSR LGQGIGPIHL NEIQCTGNEK SIIDCKFNAE SQGCNHEEDA 420
SRCR3
GVRcntPAMG LQKKLRLNGG RNPYEGRVEV LVERNGSLVW GMVCGQNWGI VEAMVVCrQL 480
GLGFASNAFQ ETWYWHGDVN SNKVVMsGVK CSGTELSLAH CRHDGEDVAC POGGVQYgAG 540
SRCR4
VACSETAPDL VLNAEMVQOT TYLED RPMFM LQcAMEENCL SASAAQTDPT TGYRRLLRFS 600
CATALYTIC DOMAIN
SQIHNNGQSD FRPKNGRHAW IWHDCRH YH SMEVFTHYDL LNLNGTKVAE GHKASFCLED 660
TECEGDIOKN YECANEGDOG lTMGCWDMYR HDIDCOWVDI TDVPEGDYLE QVVINPNEEV 720
AESDYSNNIM KCRSRYDGHR lWMYNCHIGG SESEETEKKE RHESGLINNO LSPQ 774

SEQ ID NO:1

FIG. 4

*

H:	PDLVLNAEMV	QQTTYLED RP	MFMLQCAMEE	NCLSASAAQT	DPTTGYRRLL	RFSSQIHNNG
M:	PDLVLNAE <u>I</u> V	QQT <u>A</u> YLEDRP	M <u>S</u> LLQCAMEE	NCLSASAV <u>H</u> T	DPT <u>R</u> G <u>H</u> RRLL	RFSSQIHNNG
R:	PDLVLNAE <u>I</u> V	QQT <u>A</u> YLEDRP	M <u>A</u> LLQCAMEE	NCLSASAV <u>H</u> T	DPT <u>R</u> G <u>H</u> RRLL	RFSSQIHNNG
C:	PDLVLNAEMV	QQTTYLED RP	MFMLQCAMEE	NCLSASAAQT	<u>N</u> PPTGYRRLL	RFSSQIHNNG
H:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
M:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVF <u>T</u> <u>Y</u>	YDLL <u>S</u> LNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
R:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVF <u>T</u> <u>Y</u>	YDLL <u>S</u> LNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
C:	QSDFRPKNGR	HAWIWHDC HR	HYHSMEVFTH	YDLLNLNGTK	VAEGHKASFC	LEDTECEGDI
H:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	VDITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN
M:	QK <u>S</u> YECANFG	<u>E</u> QGITMGCWD	MYRHDIDCQW	<u>I</u> DITDVPPGD	YLFQVVINPN	<u>Y</u> EV <u>P</u> ESD <u>E</u> SN
R:	QK <u>S</u> YECANFG	<u>E</u> QGITMGCWD	MYRHDIDCQW	<u>I</u> DITDVPPGD	YLFQVVINPN	<u>Y</u> EV <u>P</u> ESD <u>E</u> SN
C:	QKNYECANFG	DQGITMGCWD	MYRHDIDCQW	<u>I</u> DITDVPPGD	YLFQVVINPN	FEVAESDYSN

*

H:	NIMKCRSRYD	GHRIWMYNCH	IGGSFSEETE	KKFEHFSGLL	NNQLSPQ	(SEQ ID NO:2)
M:	NIMKCRSRYD	G <u>Y</u> RIWMYNCH	<u>V</u> GGA <u>F</u> SEETE	<u>Q</u> KFEHFSGLL	NNQLS <u>V</u> Q	(SEQ ID NO:3)
R:	NIMKCRSRYD	G <u>Y</u> RIWMYNCH	<u>V</u> GGA <u>F</u> SEETE	<u>Q</u> KFEHFSGLL	NNQLS <u>V</u> Q	(SEQ ID NO:4)
C:	NIMKCRSRYD	GHRIWMYNCH	IGGSFSEETE	KKFEHFSGLL	NNQLSPQ	(SEQ ID NO:5)

4/24

FIG. 5

fb

Expresión de LOXL2 en Tejido Hepático de Humanos Fibróticos

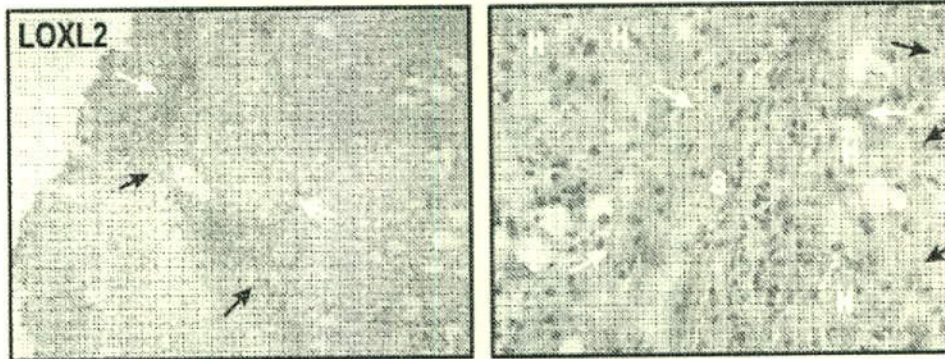


FIG. 6

Curvas Estándares de Calibración para Inmunoensayo de LOXL2

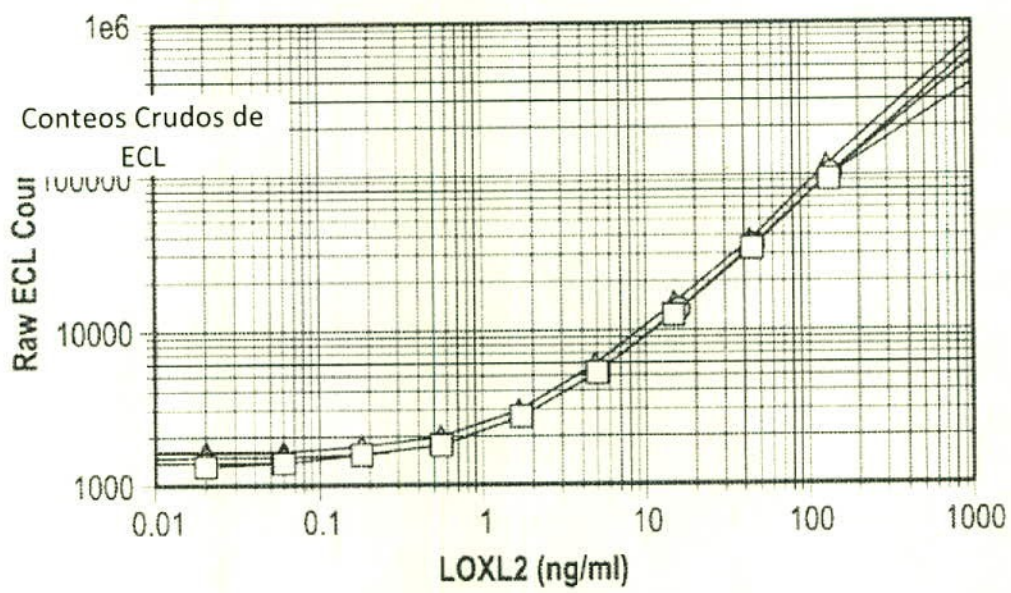


FIG. 7

Niveles séricos de LOXL2 por Nivel Basal Combinado de
Puntuación de Fibrosis de Ishak y Tiempo

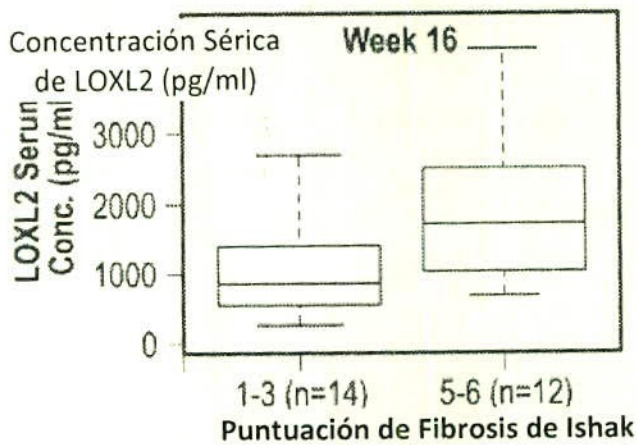
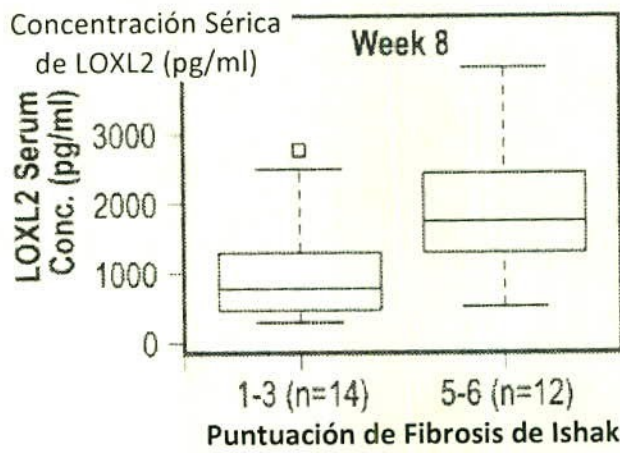
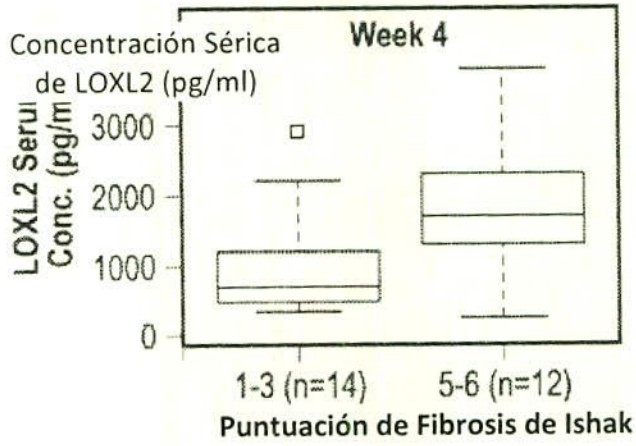


FIG. 8

Niveles séricos de LOXL2 por Nivel Basal Combinado de
Puntuación de Fibrosis de Ishak y Tiempo

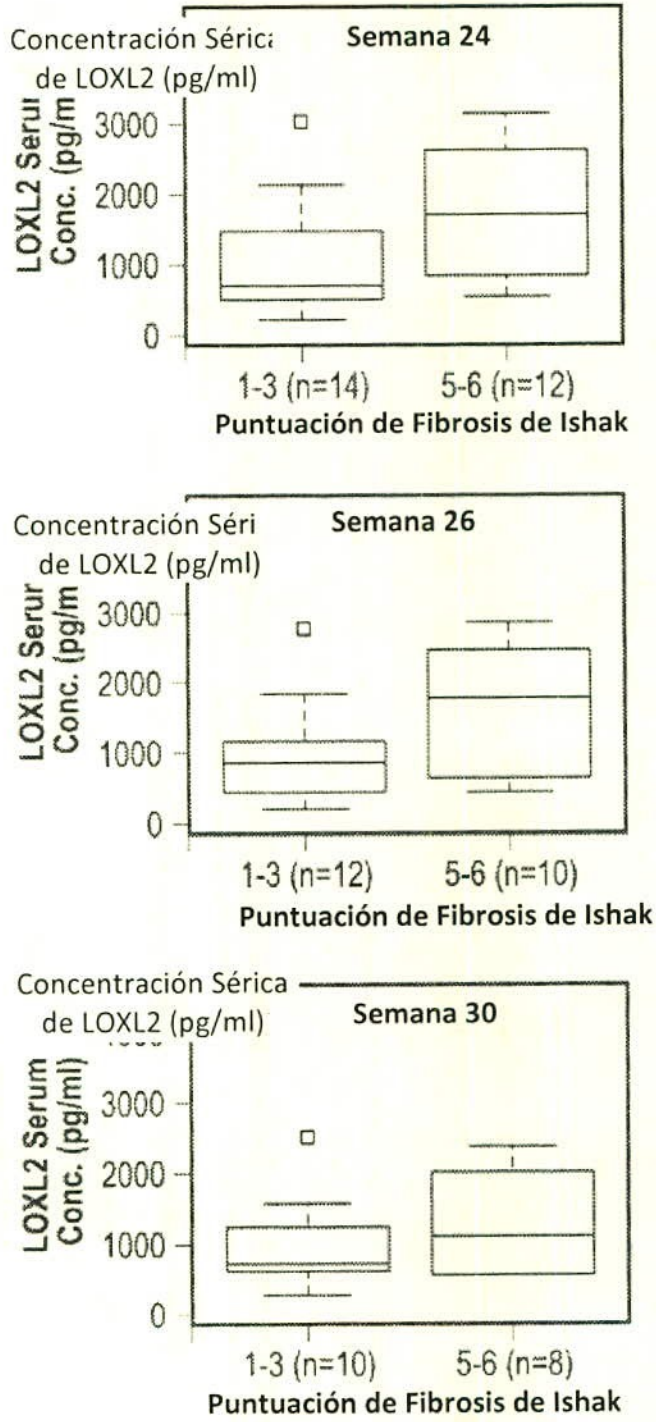


FIG. 8
(Continua)

100
7/24

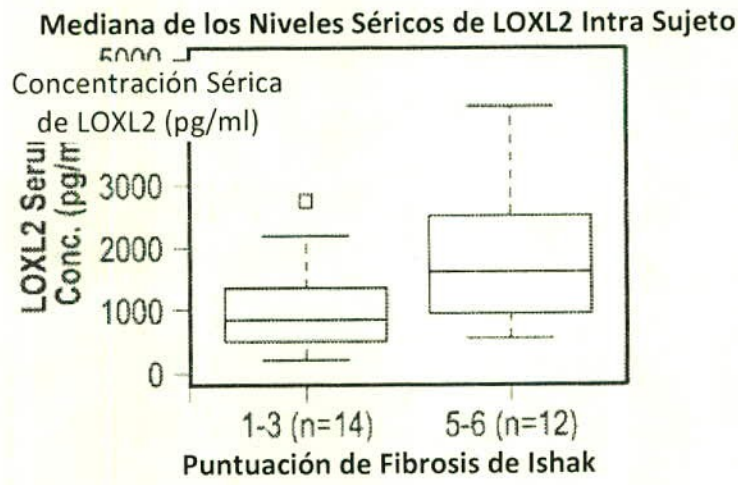


FIG. 9

Mediana de la Concentración Sérica a Través del Tiempo por Puntuación de Fibrosis de Ishak Basal Combinada. Con Intervalo de Confianza al 95%

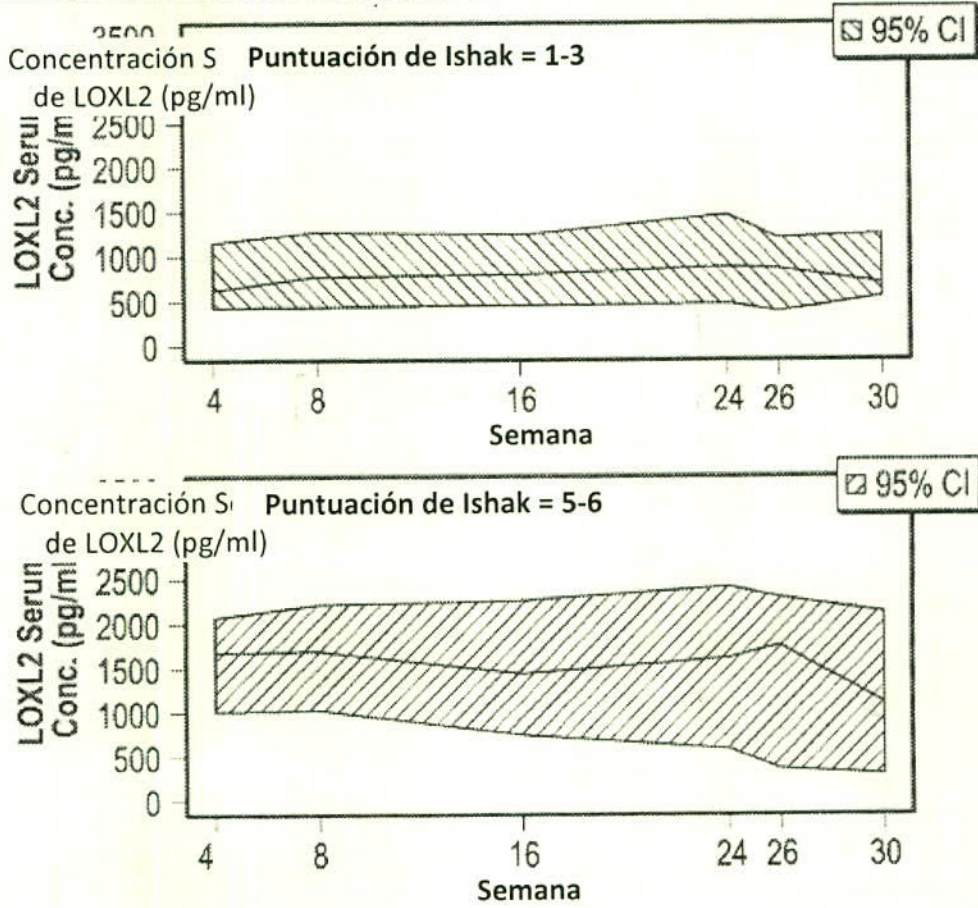


FIG. 10

Mediana de los niveles Intra-sujeto de LOXL2 vs HA y TIMP1

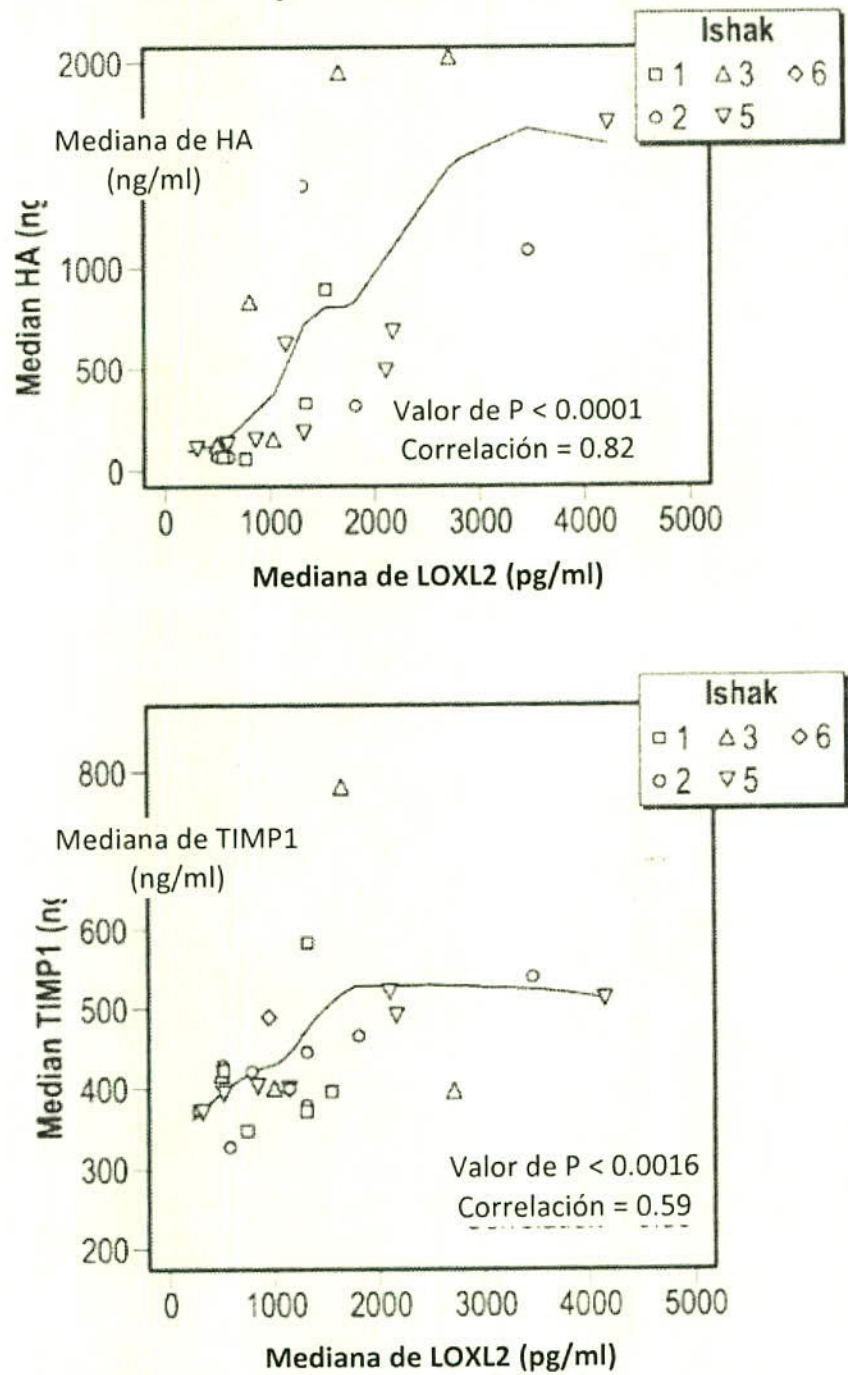


FIG. 11

Correlación Entre los Niveles Basales de LOXL2 y las Mediciones Basales de la Severidad de IPF y Estado Funcional

Matriz de Dispersión para los Datos de LOXL2

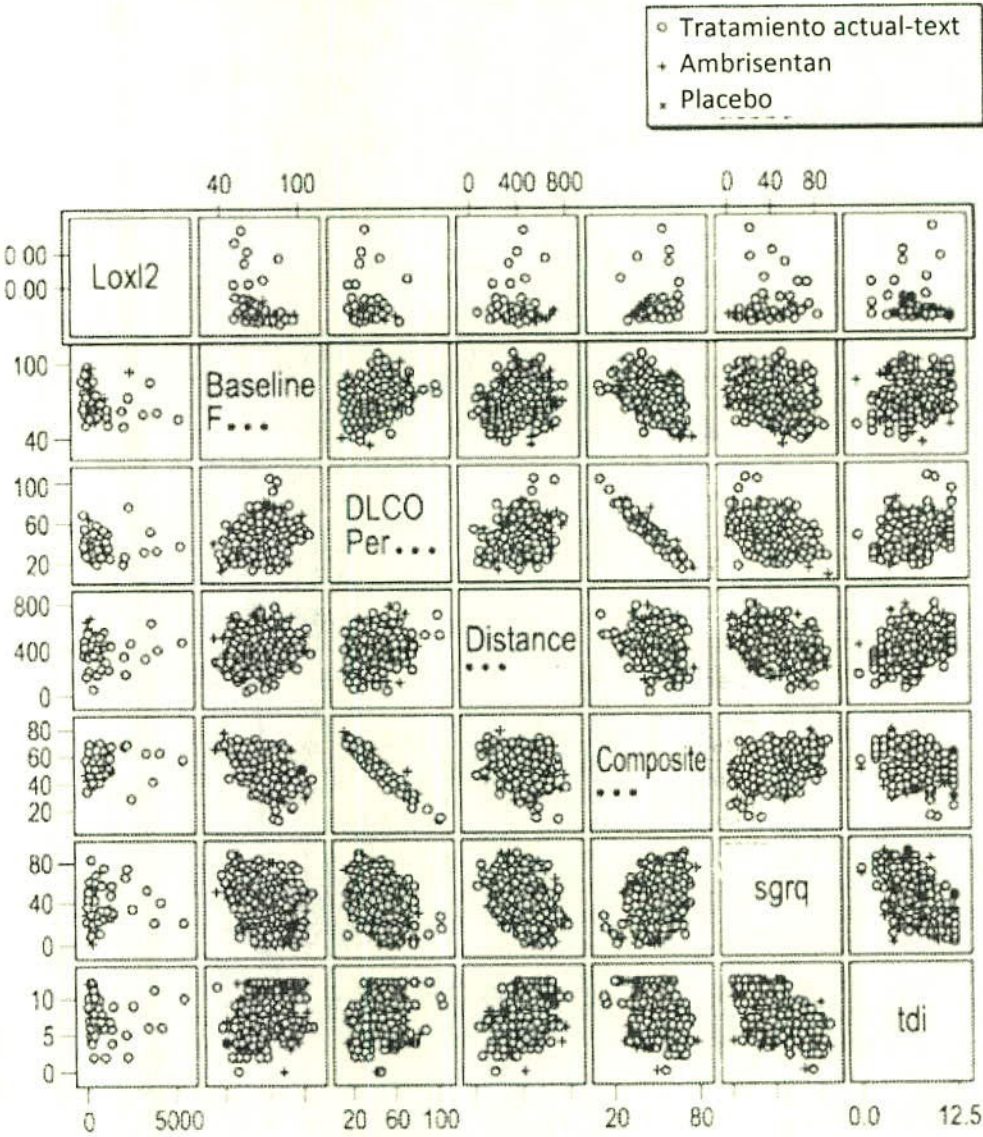


FIG. 12A

Correlación Entre los Niveles Basales de LOXL2 y las Mediciones Basales de la Severidad de IPF y Estado Funcional

Matriz de Dispersión para los Datos de LOXL2

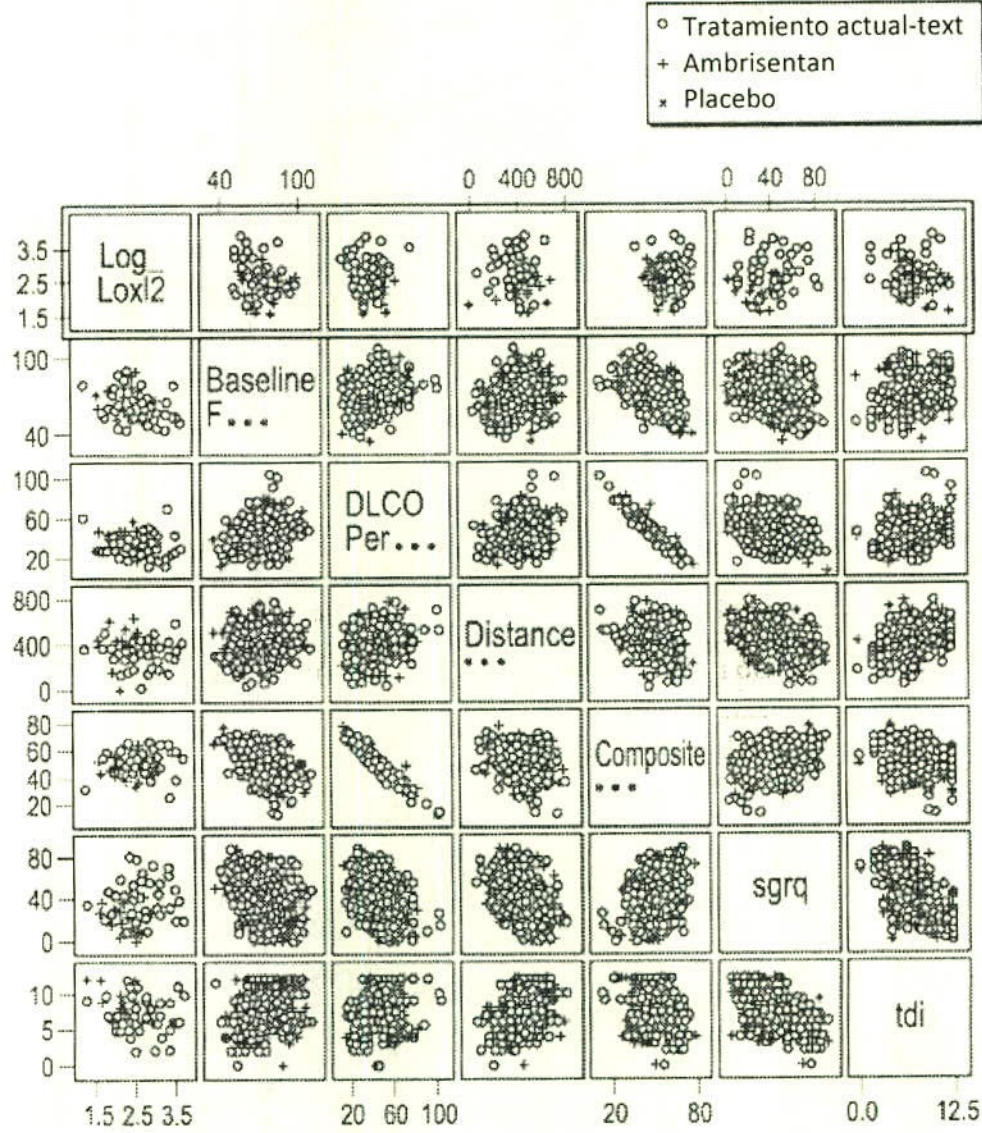


FIG. 12B

Curvas de Kaplan Meier que Comparan Niveles Altos y Bajos de LOXL2 para la Progresión de la Enfermedad (PFS) y sus Componentes: Declive de la Función Pulmonar, Respiratoria, Hospitalización y Muerte

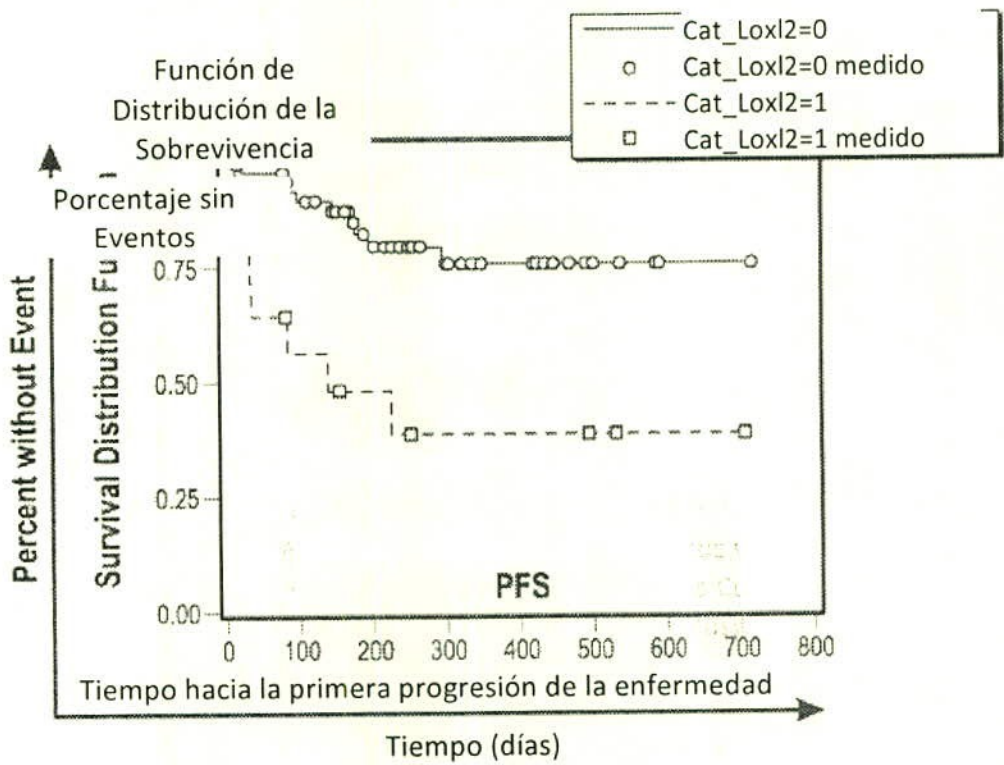


FIG. 13A

Curvas de Kaplan Meier que Comparan Niveles Altos y Bajos de LOXL2 para la Progresión de la Enfermedad (PFS) y sus Componentes: Declive de la Función Pulmonar, Respiratoria, Hospitalización y Muerte

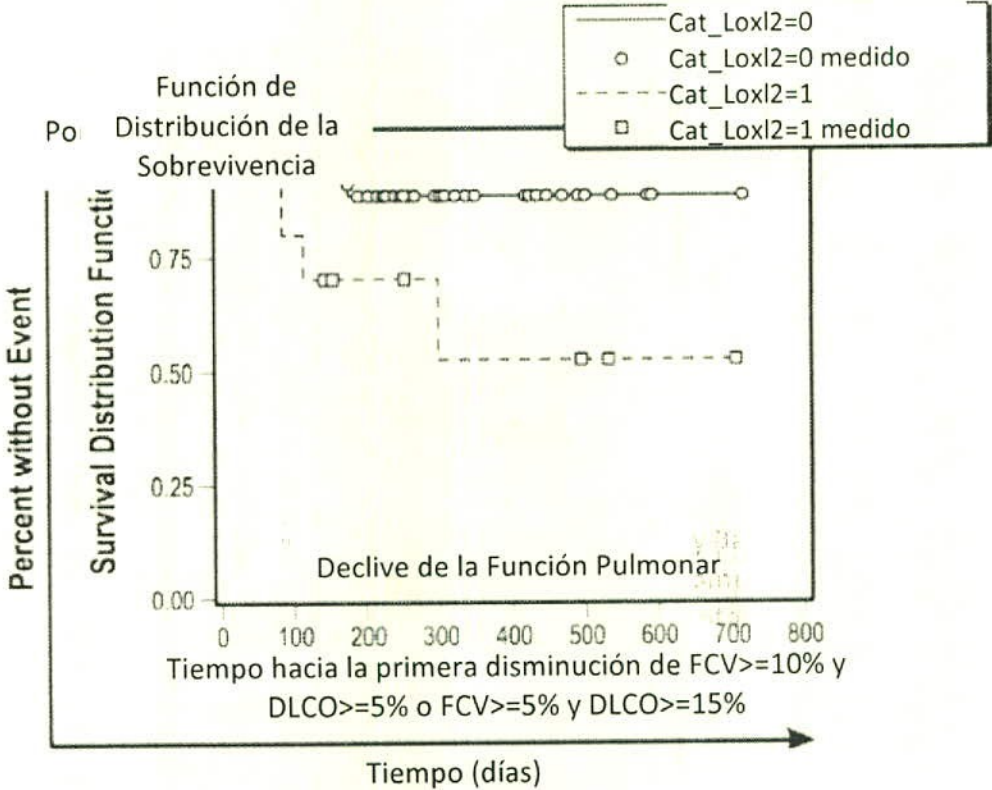


FIG. 13B

Curvas de Kaplan Meier que Comparan Niveles Altos y Bajos de LOXL2 para la Progresión de la Enfermedad (PFS) y sus Componentes: Declive de la Función Pulmonar, Respiratoria, Hospitalización y Muerte

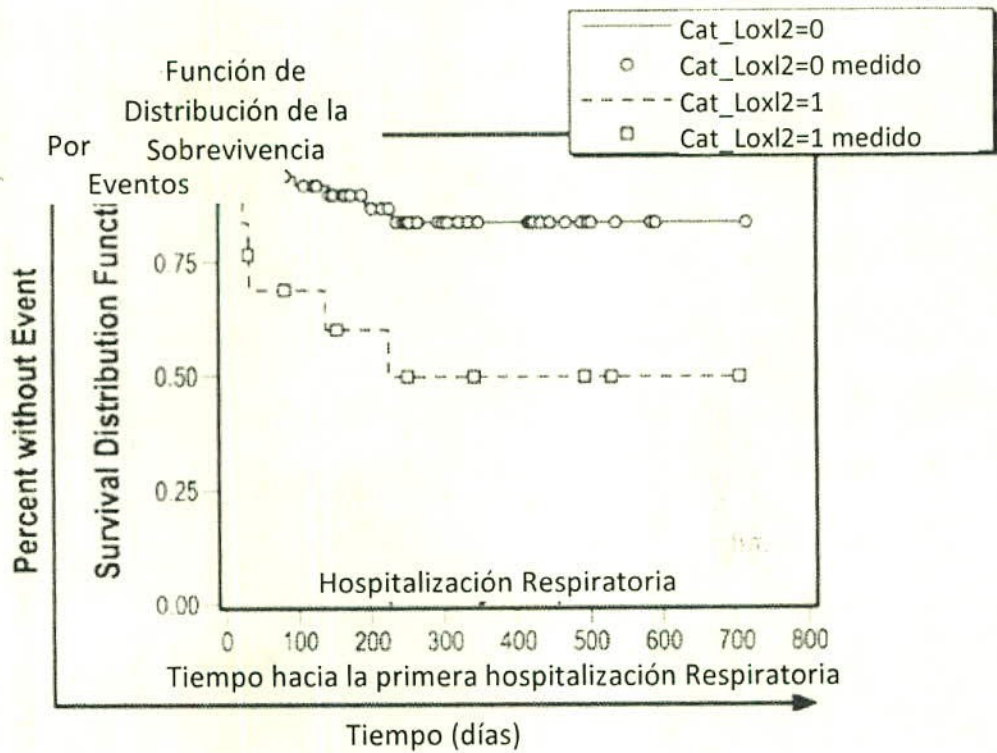


FIG. 13C

Curvas de Kaplan Meier que Comparan Niveles Altos y Bajos de LOXL2 para la Progresión de la Enfermedad (PFS) y sus Componentes: Declive de la Función Pulmonar, Respiratoria, Hospitalización y Muerte

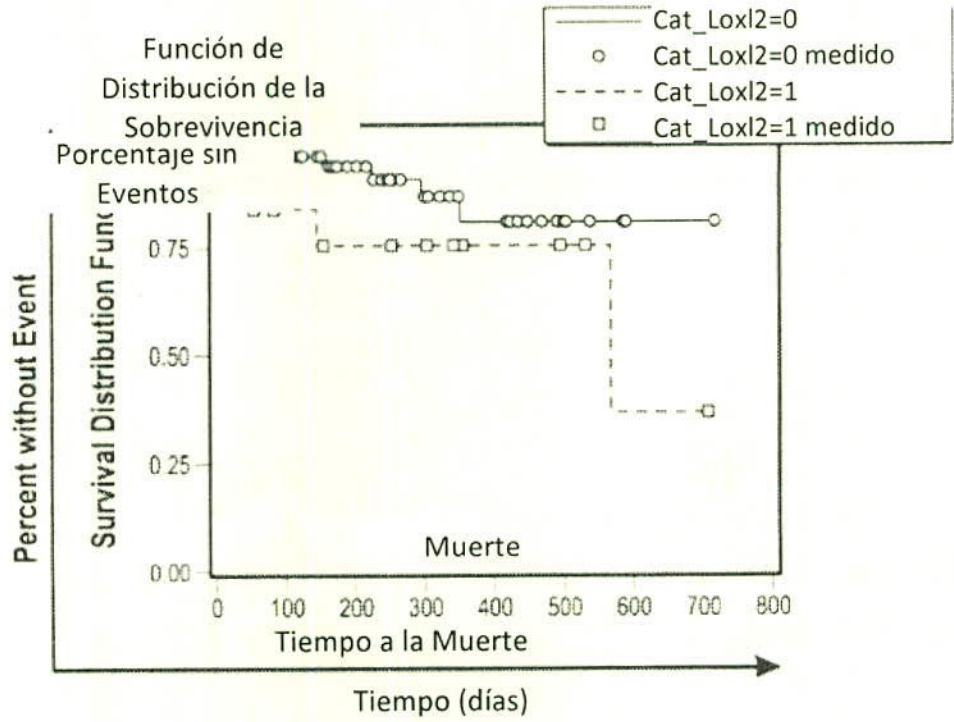


FIG. 13D

Comparación de la Distribución del Nivel Basal de LOXL2 Entre Cohortes de
Sujetos de ARTEMIS-IPF (Placebo y Sujetos Tratados con Ambrisentan
Combinado) y GAP

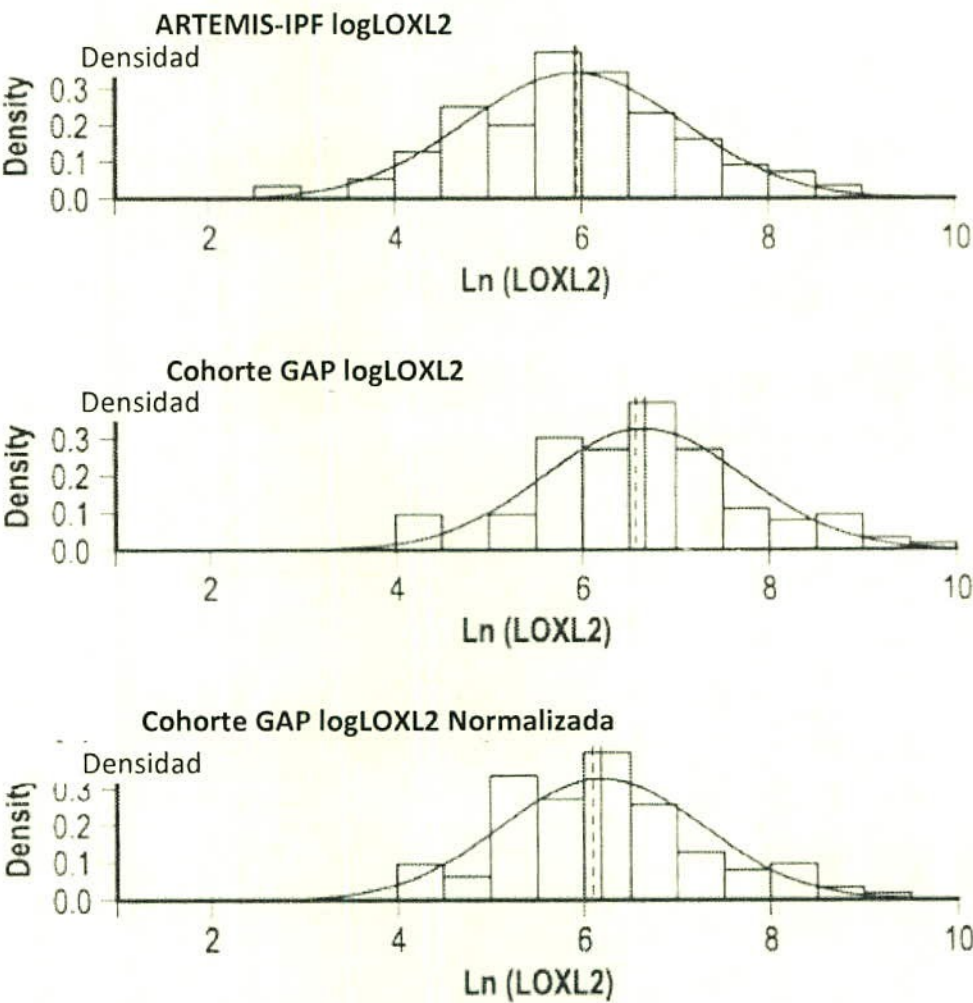


FIG. 14A

Comparación de la Distribución del Nivel Basal de LOXL2 Entre Cohortes de
Sujetos de ARTEMIS-IPF (Sujetos Tratados con Ambrisentan) y GAP

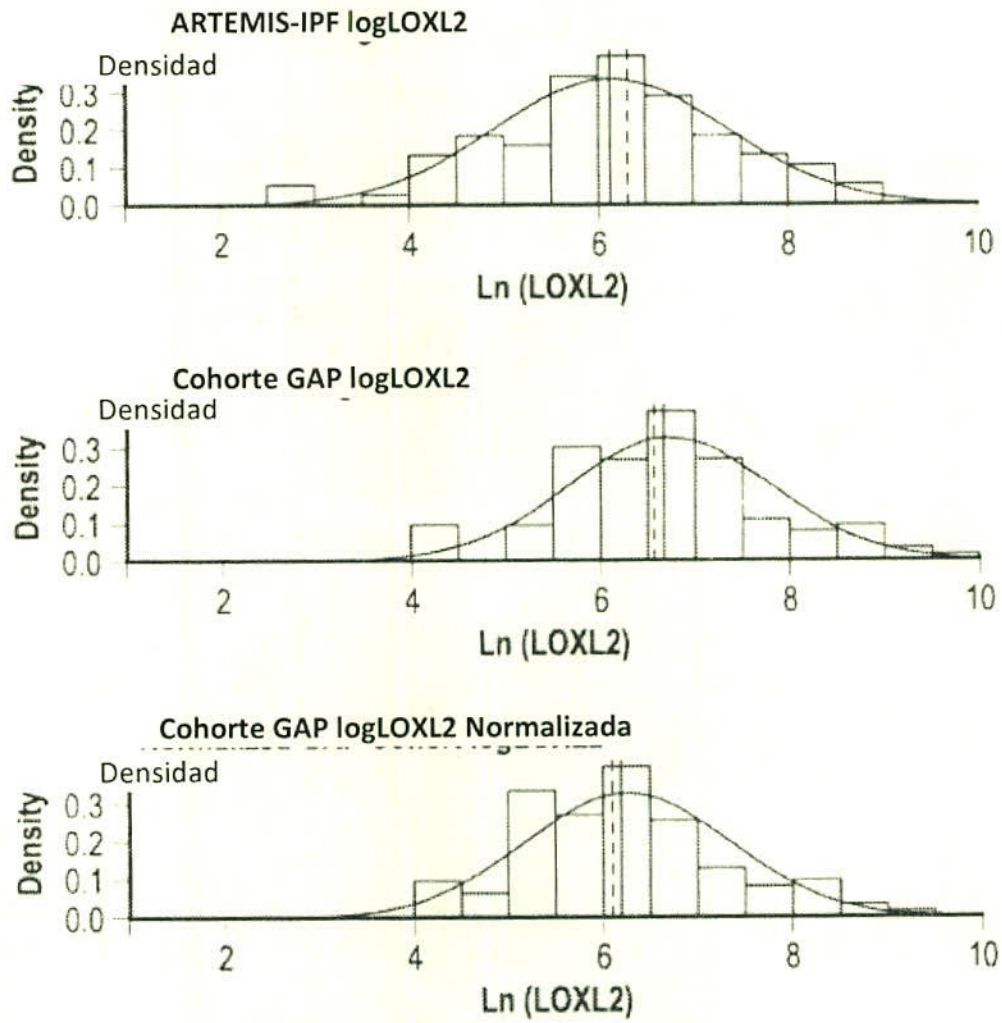


FIG. 14B

Todos los casos de mortalidad en las cohortes de sujetos GAP con niveles basales Séricos de LOXL2 Basales Bajos vs. Altos

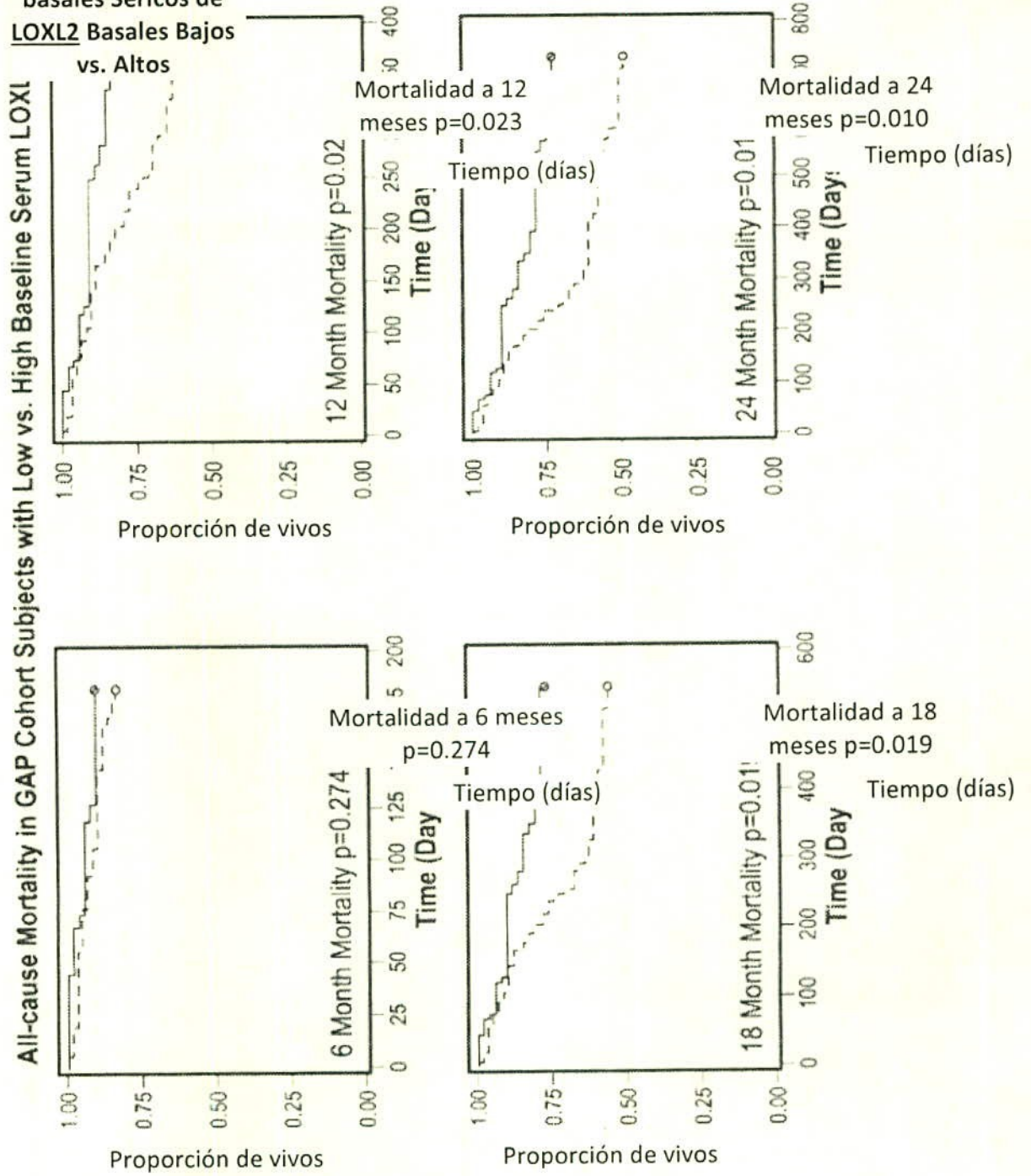
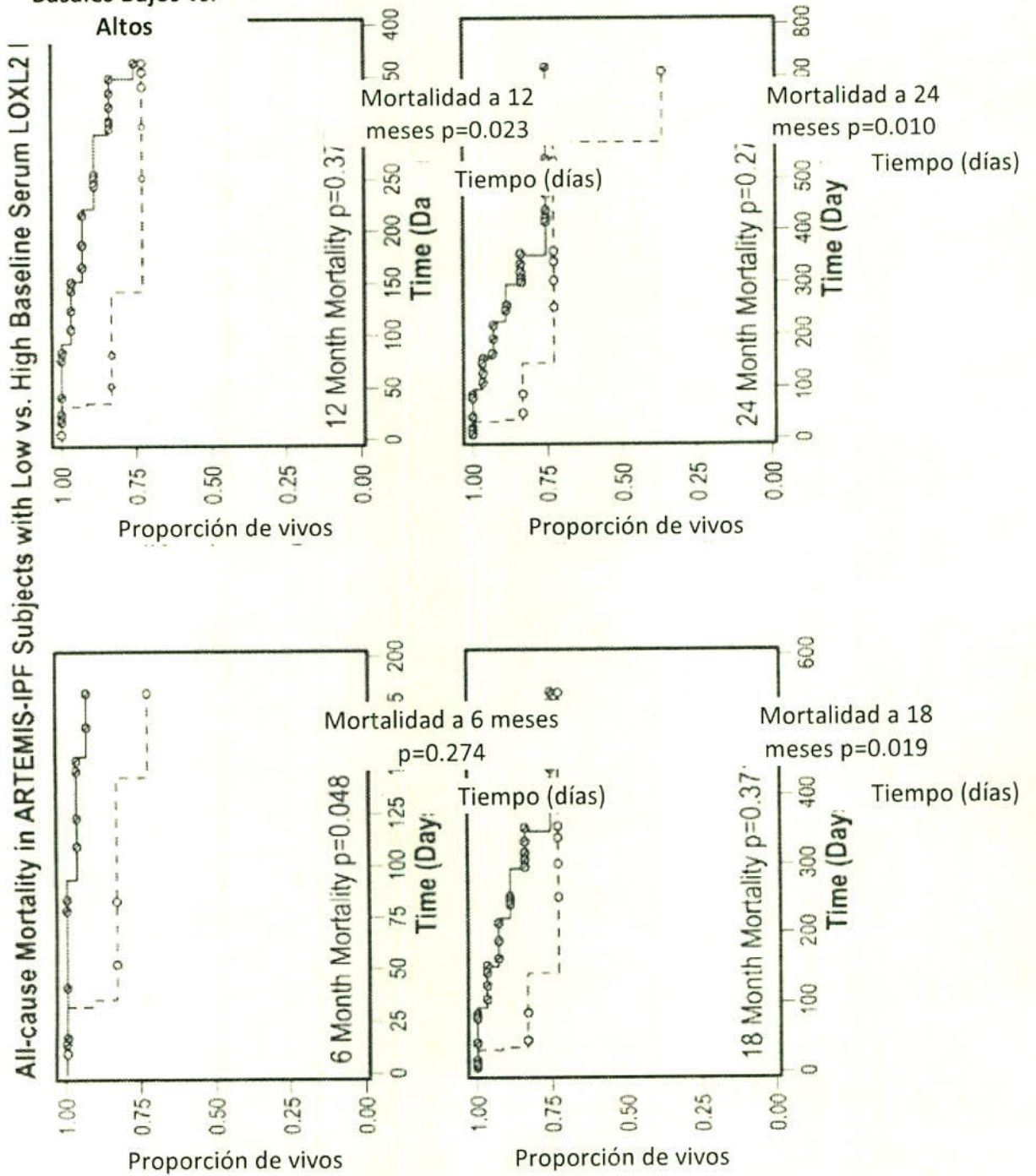


FIG. 15A

Todos los casos de mortalidad en Sujetos ARTEMIS-IPF con niveles basales Séricos de LOXL2 Basales Bajos vs.

FIG. 15B



Niveles Séricos de LOXL2 en Sujetos CHB Agrupados por Estado de Fibrosis de Ishak

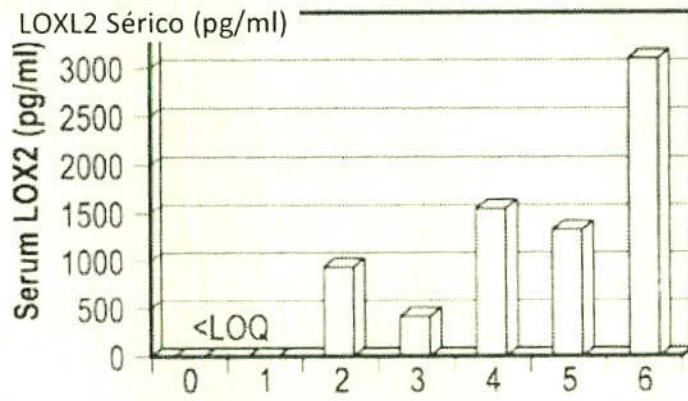


FIG. 16A

Niveles Séricos de LOXL2 en Sujetos CHB Agrupados por Estado de Fibrosis de Ishak

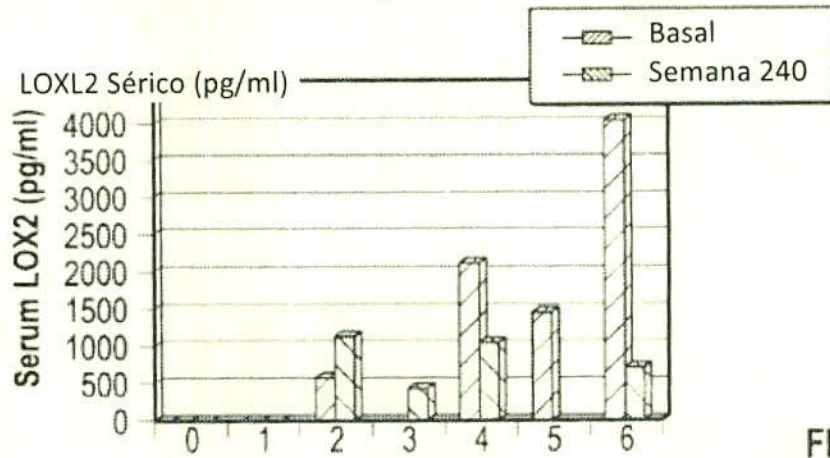


FIG. 16B

Niveles Séricos de LOXL2 en Sujetos CHB Agrupados por Estado de Fibrosis de Ishak

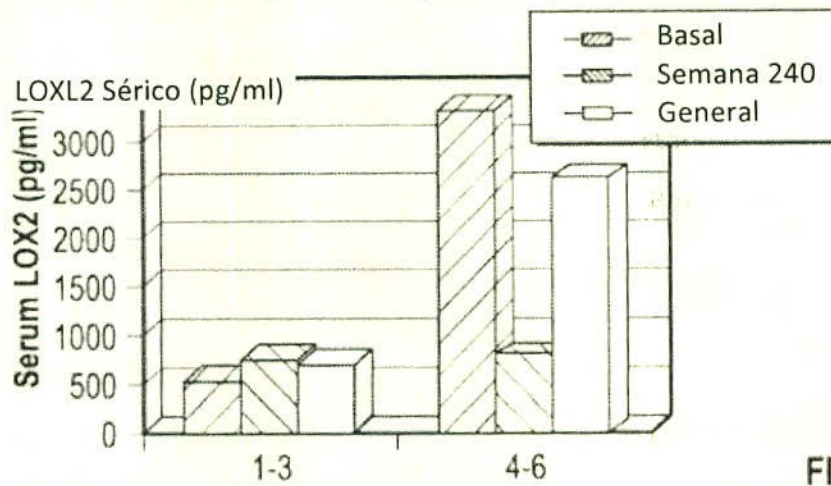


FIG. 16C

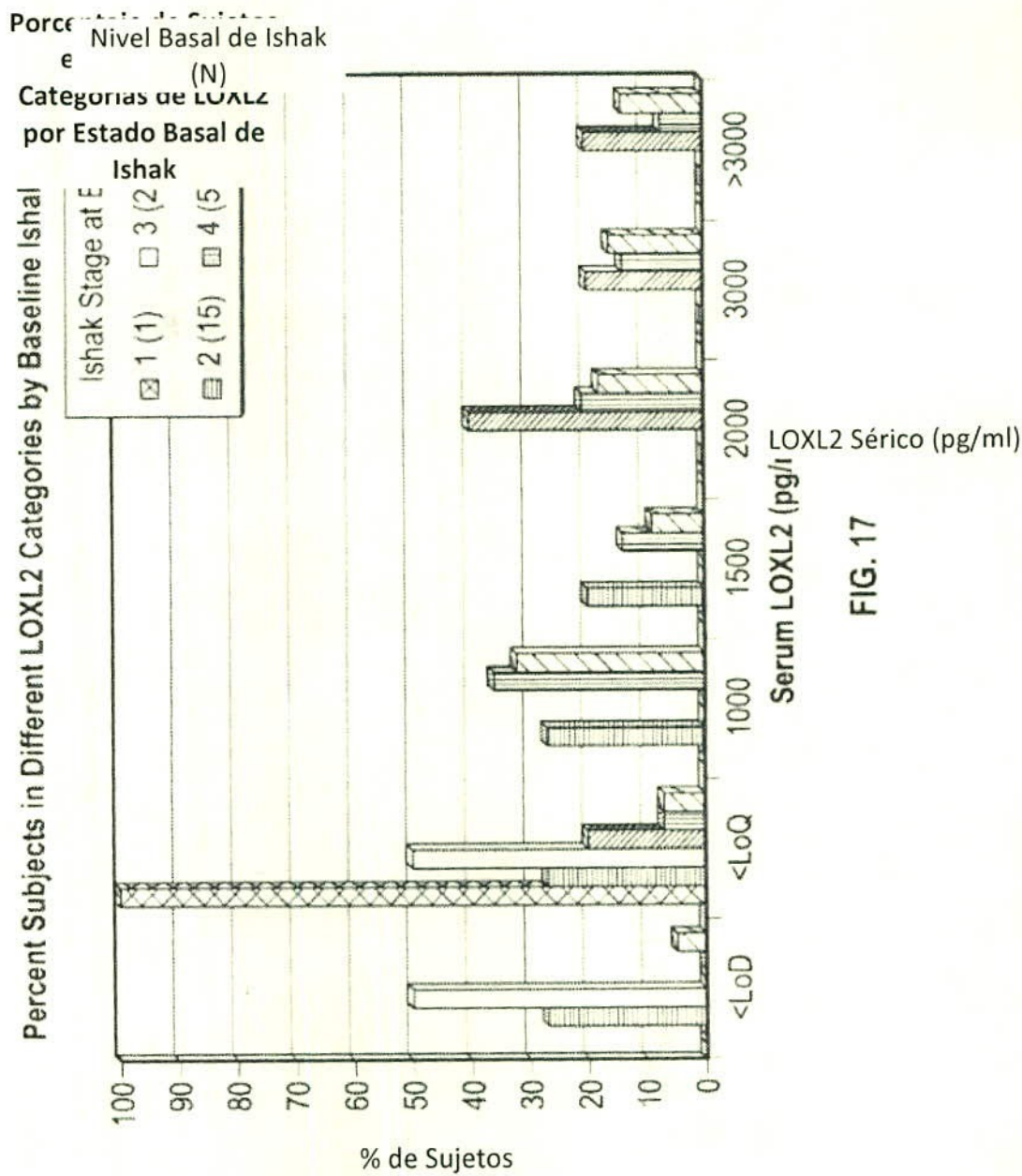


FIG. 17

Niveles Séricos de LOXL2 (Basales (BL) y a la Semana 240 (WK240) en Sujetos CHB y
Sujetos con Cirrosis Persistente

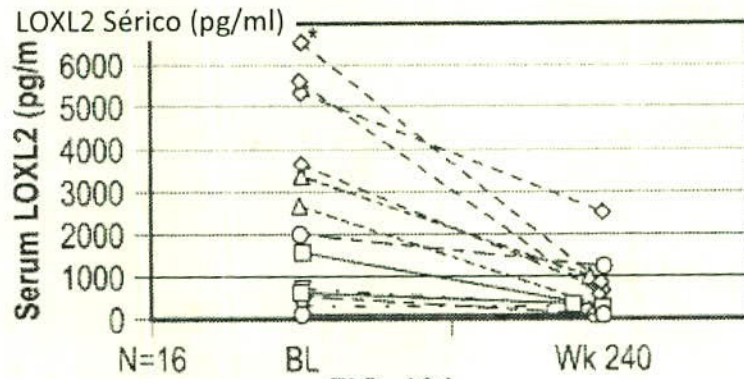


FIG. 18A

Niveles Séricos de LOXL2 (Basales (BL) y a la Semana 240 (WK240) en Sujetos CHB y
Sujetos con Cirrosis Persistente

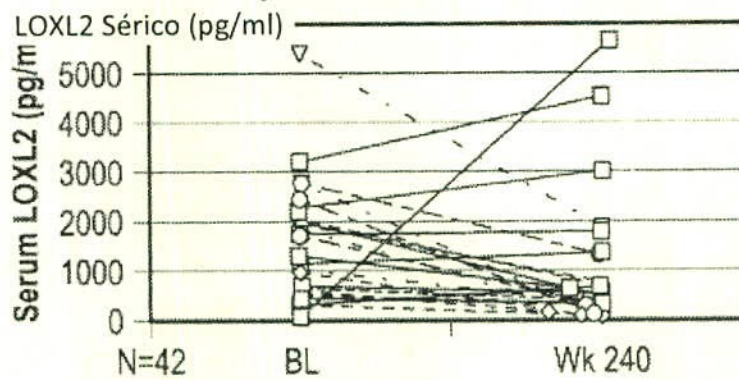


FIG. 18B

Niveles Séricos de LOXL2 (Basales (BL) y a la Semana 240 (WK240) en Sujetos CHB y
Sujetos no cirróticos: Sin cambio en el Estado de Fibrosis

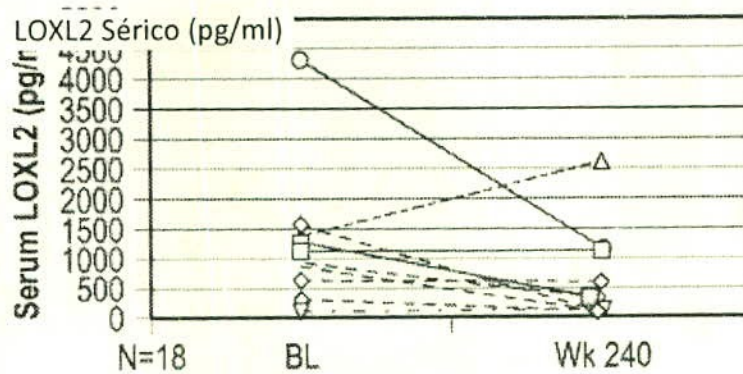


FIG. 18C

Niveles Séricos de LOXL2 (Basales (BL) y a la Semana 240 (WK240) en Sujetos CHB y
Sujetos con Progresión a Cirrosis

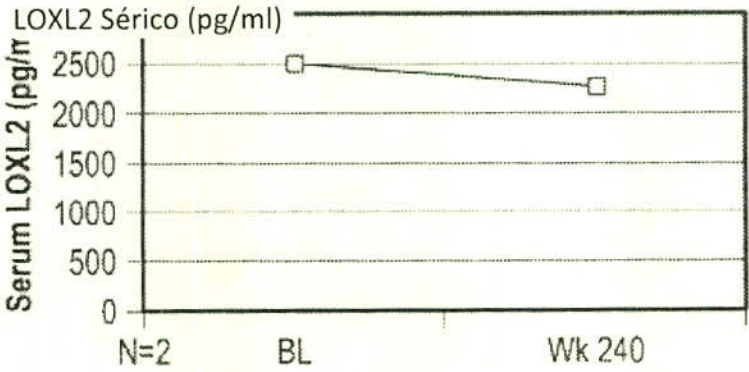


FIG. 18D

Niveles Séricos de LOXL2 (Basales (BL) y a la Semana 240 (WK240) en Sujetos CHB y
Sujetos no Cirróticos con reducción a $\geq$ Estado 2 en Fibrosis

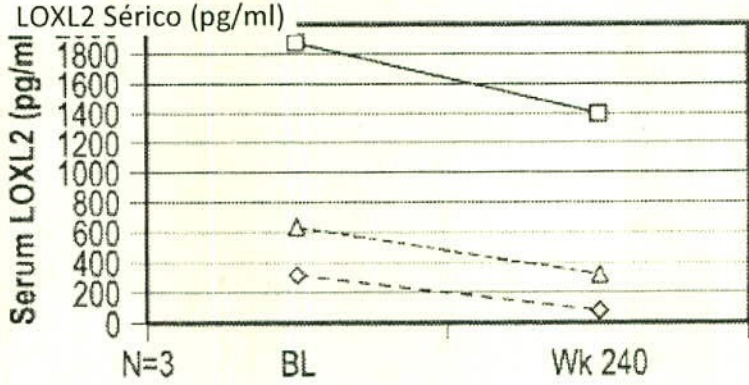


FIG. 18E

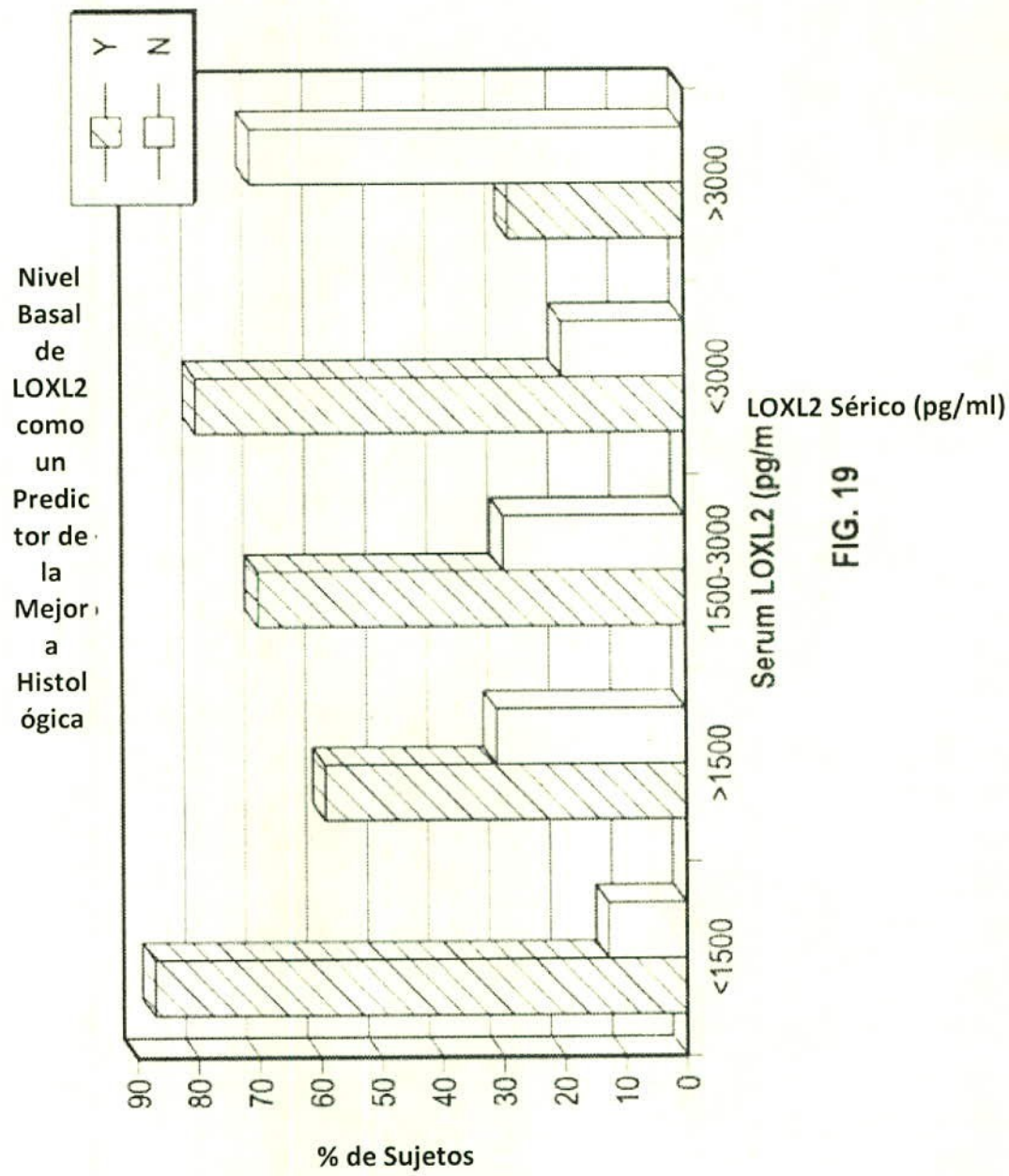


FIG. 19

LISTADO DE SECUENCIA

<110> GILEAD BIOLOGICS, INC.
SMITH, Victoria
ADAMKEWICZ, Joanne
LYMAN, Susan K.
CHIEN, Jason
LI, Xiaoming
SHAO, Lixin

<120> ENSAYO DE LISILOXIDASA-HOMÓLOGO 2 Y MÉTODOS
DE USO DEL MISMO

<130> 246102008340

<140> Aún no se ha asignado

<141> Simultáneamente con la presente

<150> US 61/492,210

<151> 2011-06-01

<150> US 61/550,895

<151> 2011-10-24

<150> US 61/578,813

<151> 2011-12-21

<160> 14

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 774

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)...(774)

<223> LOXL2

<400> 1

Met	Glu	Arg	Pro	Leu	Cys	Ser	His	Leu	Cys	Ser	Cys	Leu	Ala	Met	Leu
1				5					10					15	
Ala	Leu	Leu	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Ala	Gln	Tyr	Asp	Ser	Trp	Pro	His
			20					25					30		
Tyr	Pro	Glu	Tyr	Phe	Gln	Gln	Pro	Ala	Pro	Glu	Tyr	His	Gln	Pro	Gln
		35					40					45			
Ala	Pro	Ala	Asn	Val	Ala	Lys	Ile	Gln	Leu	Arg	Leu	Ala	Gly	Gln	Lys
		50				55					60				
Arg	Lys	His	Ser	Glu	Gly	Arg	Val	Glu	Val	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Gln	Trp
65					70					75				80	
Gly	Thr	Val	Cys	Asp	Asp	Asp	Phe	Ser	Ile	His	Ala	Ala	His	Val	Val
			85						90					95	
Cys	Arg	Glu	Leu	Gly	Tyr	Val	Glu	Ala	Lys	Ser	Trp	Thr	Ala	Ser	Ser
			100					105					110		
Ser	Tyr	Gly	Lys	Gly	Glu	Gly	Pro	Ile	Trp	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Cys
			115				120					125			

Thr	Gly	Asn	Glu	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Cys	Thr	Ser	Asn	Gly	Trp	Gly	
	130					135					140					
Val	Thr	Asp	Cys	Lys	His	Thr	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Val	Cys	Ser	Asp	
145					150					155					160	
Lys	Arg	Ile	Pro	Gly	Phe	Lys	Phe	Asp	Asn	Ser	Leu	Ile	Asn	Gln	Ile	
				165					170					175		
Glu	Asn	Leu	Asn	Ile	Gln	Val	Glu	Asp	Ile	Arg	Ile	Arg	Ala	Ile	Leu	
			180					185					190			
Ser	Thr	Tyr	Arg	Lys	Arg	Thr	Pro	Val	Met	Glu	Gly	Tyr	Val	Glu	Val	
		195					200					205				
Lys	Glu	Gly	Lys	Thr	Trp	Lys	Gln	Ile	Cys	Asp	Lys	His	Trp	Thr	Ala	
	210					215					220					
Lys	Asn	Ser	Arg	Val	Val	Cys	Gly	Met	Phe	Gly	Phe	Pro	Gly	Glu	Arg	
225					230					235					240	
Thr	Tyr	Asn	Thr	Lys	Val	Tyr	Lys	Met	Phe	Ala	Ser	Arg	Arg	Lys	Gln	
				245					250					255		
Arg	Tyr	Trp	Pro	Phe	Ser	Met	Asp	Cys	Thr	Gly	Thr	Glu	Ala	His	Ile	
			260				265						270			
Ser	Ser	Cys	Lys	Leu	Gly	Pro	Gln	Val	Ser	Leu	Asp	Pro	Met	Lys	Asn	
		275					280					285				
Val	Thr	Cys	Glu	Asn	Gly	Leu	Pro	Ala	Val	Val	Ser	Cys	Val	Pro	Gly	
	290					295					300					
Gln	Val	Phe	Ser	Pro	Asp	Gly	Pro	Ser	Arg	Phe	Arg	Lys	Ala	Tyr	Lys	
305					310					315					320	
Pro	Glu	Gln	Pro	Leu	Val	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly	Ala	Tyr	Ile	Gly	Glu	
				325					330					335		
Gly	Arg	Val	Glu	Val	Leu	Lys	Asn	Gly	Glu	Trp	Gly	Thr	Val	Cys	Asp	
			340					345					350			
Asp	Lys	Trp	Asp	Leu	Val	Ser	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Arg	Glu	Leu	Gly	
		355					360					365				
Phe	Gly	Ser	Ala	Lys	Glu	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Arg	Leu	Gly	Gln	Gly	
	370					375					380					
Ile	Gly	Pro	Ile	His	Leu	Asn	Glu	Ile	Gln	Cys	Thr	Gly	Asn	Glu	Lys	
385					390					395					400	
Ser	Ile	Ile	Asp	Cys	Lys	Phe	Asn	Ala	Glu	Ser	Gln	Gly	Cys	Asn	His	
				405					410					415		
Glu	Glu	Asp	Ala	Gly	Val	Arg	Cys	Asn	Thr	Pro	Ala	Met	Gly	Leu	Gln	
			420					425					430			
Lys	Lys	Leu	Arg	Leu	Asn	Gly	Gly	Arg	Asn	Pro	Tyr	Glu	Gly	Arg	Val	
		435					440					445				
Glu	Val	Leu	Val	Glu	Arg	Asn	Gly	Ser	Leu	Val	Trp	Gly	Met	Val	Cys	
	450					455					460					
Gly	Gln	Asn	Trp	Gly	Ile	Val	Glu	Ala	Met	Val	Val	Cys	Arg	Gln	Leu	
465					470					475					480	
Gly	Leu	Gly	Phe	Ala	Ser	Asn	Ala	Phe	Gln	Glu	Thr	Trp	Tyr	Trp	His	
				485					490					495		
Gly	Asp	Val	Asn	Ser	Asn	Lys	Val	Val	Met	Ser	Gly	Val	Lys	Cys	Ser	
			500					505					510			
Gly	Thr	Glu	Leu	Ser	Leu	Ala	His	Cys	Arg	His	Asp	Gly	Glu	Asp	Val	
		515					520					525				
Ala	Cys	Pro	Gln	Gly	Gly	Val	Gln	Tyr	Gly	Ala	Gly	Val	Ala	Cys	Ser	
	530					535					540					
Glu	Thr	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Asn	Ala	Glu	Met	Val	Gln	Gln	Thr	
545					550					555					560	
Thr	Tyr	Leu	Glu	Asp	Arg	Pro	Met	Phe	Met	Leu	Gln	Cys	Ala	Met	Glu	
				565					570					575		
Glu	Asn	Cys	Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asp	Pro	Thr	Thr	Gly	
			580					585					590			
Tyr	Arg	Arg	Leu	Leu	Arg	Phe	Ser	Ser	Gln	Ile	His	Asn	Asn	Gly	Gln	

	595					600					605								
Ser	Asp	Phe	Arg	Pro	Lys	Asn	Gly	Arg	His	Ala	Trp	Ile	Trp	His	Asp				
	610					615					620								
Cys	His	Arg	His	Tyr	His	Ser	Met	Glu	Val	Phe	Thr	His	Tyr	Asp	Leu				
625					630					635					640				
Leu	Asn	Leu	Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	Ala	Ser	Phe				
				645						650				655					
Cys	Leu	Glu	Asp	Thr	Glu	Cys	Glu	Gly	Asp	Ile	Gln	Lys	Asn	Tyr	Glu				
			660					665					670						
Cys	Ala	Asn	Phe	Gly	Asp	Gln	Gly	Ile	Thr	Met	Gly	Cys	Trp	Asp	Met				
	675					680						685							
Tyr	Arg	His	Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Val	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Pro				
	690				695					700									
Pro	Gly	Asp	Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Pro	Asn	Phe	Glu	Val				
705				710						715				720					
Ala	Glu	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Cys	Arg	Ser	Arg	Tyr				
			725						730				735						
Asp	Gly	His	Arg	Ile	Trp	Met	Tyr	Asn	Cys	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe				
			740				745					750							
Ser	Glu	Glu	Thr	Glu	Lys	Lys	Phe	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Leu	Leu	Asn				
	755					760						765							
Asn	Gln	Leu	Ser	Pro	Gln														
	770																		

<210> 2
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)...(227)
 <223> Dominio Catalítico de la proteína LOXL2

<400> 2																			
Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Asn	Ala	Glu	Met	Val	Gln	Gln	Thr	Thr	Tyr	Leu				
1				5				10						15					
Glu	Asp	Arg	Pro	Met	Phe	Met	Leu	Gln	Cys	Ala	Met	Glu	Glu	Asn	Cys				
		20					25					30							
Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asp	Pro	Thr	Thr	Gly	Tyr	Arg	Arg				
		35				40						45							
Leu	Leu	Arg	Phe	Ser	Ser	Gln	Ile	His	Asn	Asn	Gly	Gln	Ser	Asp	Phe				
	50				55					60									
Arg	Pro	Lys	Asn	Gly	Arg	His	Ala	Trp	Ile	Trp	His	Asp	Cys	His	Arg				
65				70				75						80					
His	Tyr	His	Ser	Met	Glu	Val	Phe	Thr	His	Tyr	Asp	Leu	Leu	Asn	Leu				
			85					90						95					
Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	Ala	Ser	Phe	Cys	Leu	Glu				
		100					105					110							
Asp	Thr	Glu	Cys	Glu	Gly	Asp	Ile	Gln	Lys	Asn	Tyr	Glu	Cys	Ala	Asn				
	115					120					125								
Phe	Gly	Asp	Gln	Gly	Ile	Thr	Met	Gly	Cys	Trp	Asp	Met	Tyr	Arg	His				
	130				135					140									
Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Val	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Pro	Pro	Gly	Asp				
145				150				155						160					
Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Pro	Asn	Phe	Glu	Val	Ala	Glu	Ser				
			165				170							175					
Asp	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Cys	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Gly	His				

			180					185				190							
Arg	Ile	Trp	Met	Tyr	Asn	Cys	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Glu	Glu				
		195					200					205							
Thr	Glu	Lys	Lys	Phe	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln	Leu				
	210					215						220							
Ser	Pro	Gln																	
225																			

<210> 3
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> DOMINIO
 <222> (1)...(227)
 <223> Dominio Catalítico de la proteína LOXL2

Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Asn	Ala	Glu	Ile	Val	Gln	Gln	Thr	Ala	Tyr	Leu				
1				5					10					15					
Glu	Asp	Arg	Pro	Met	Ser	Leu	Leu	Gln	Cys	Ala	Met	Glu	Glu	Asn	Cys				
			20					25					30						
Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	His	Thr	Asp	Pro	Thr	Arg	Gly	His	Arg	Arg				
		35				40						45							
Leu	Leu	Arg	Phe	Ser	Ser	Gln	Ile	His	Asn	Asn	Gly	Gln	Ser	Asp	Phe				
	50					55					60								
Arg	Pro	Lys	Asn	Gly	Arg	His	Ala	Trp	Ile	Trp	His	Asp	Cys	His	Arg				
65					70					75					80				
His	Tyr	His	Ser	Met	Glu	Val	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu				
			85						90					95					
Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	Ala	Ser	Phe	Cys	Leu	Glu				
			100					105					110						
Asp	Thr	Glu	Cys	Glu	Gly	Asp	Ile	Gln	Lys	Ser	Tyr	Glu	Cys	Ala	Asn				
		115				120						125							
Phe	Gly	Glu	Gln	Gly	Ile	Thr	Met	Gly	Cys	Trp	Asp	Met	Tyr	Arg	His				
	130					135					140								
Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Pro	Pro	Gly	Asp				
145					150					155				160					
Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Pro	Asn	Tyr	Glu	Val	Pro	Glu	Ser				
			165					170						175					
Asp	Phe	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Cys	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Gly	Tyr				
			180					185					190						
Arg	Ile	Trp	Met	Tyr	Asn	Cys	His	Val	Gly	Gly	Ala	Phe	Ser	Glu	Glu				
		195					200					205							
Thr	Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln	Leu				
	210					215						220							
Ser	Val	Gln																	
225																			

<210> 4
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

<220>
 <221> DOMINIO

<222> (1)...(227)

<223> Dominio Catalítico de la proteína LOXL2

<400> 4

Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Asn	Ala	Glu	Ile	Val	Gln	Gln	Thr	Ala	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Glu	Asp	Arg	Pro	Met	Ala	Leu	Leu	Gln	Cys	Ala	Met	Glu	Glu	Asn	Cys
			20					25					30		
Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Val	His	Thr	Asp	Pro	Thr	Arg	Gly	His	Arg	Arg
		35					40					45			
Leu	Leu	Arg	Phe	Ser	Ser	Gln	Ile	His	Asn	Asn	Gly	Gln	Ser	Asp	Phe
	50					55					60				
Arg	Pro	Lys	Asn	Gly	Arg	His	Ala	Trp	Ile	Trp	His	Asp	Cys	His	Arg
65					70					75					80
His	Tyr	His	Ser	Met	Glu	Val	Phe	Thr	Tyr	Tyr	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu
			85						90					95	
Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	Ala	Ser	Phe	Cys	Leu	Glu
			100					105					110		
Asp	Thr	Glu	Cys	Glu	Gly	Asp	Ile	Gln	Lys	Ser	Tyr	Glu	Cys	Ala	Asn
		115					120					125			
Phe	Gly	Glu	Gln	Gly	Ile	Thr	Met	Gly	Cys	Trp	Asp	Met	Tyr	Arg	His
	130					135					140				
Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Pro	Pro	Gly	Asp
145					150					155					160
Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Pro	Asn	Tyr	Glu	Val	Pro	Glu	Ser
			165					170						175	
Asp	Phe	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Cys	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Gly	Tyr
			180					185					190		
Arg	Ile	Trp	Met	Tyr	Asn	Cys	His	Val	Gly	Gly	Ala	Phe	Ser	Glu	Glu
		195				200					205				
Thr	Glu	Gln	Lys	Phe	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln	Leu
	210					215					220				
Ser	Val	Gln													
225															

<210> 5

<211> 227

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)...(227)

<223> Dominio Catalítico de la proteína LOXL2

<400> 5

Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Asn	Ala	Glu	Met	Val	Gln	Gln	Thr	Thr	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Glu	Asp	Arg	Pro	Met	Phe	Met	Leu	Gln	Cys	Ala	Met	Glu	Glu	Asn	Cys
			20					25					30		
Leu	Ser	Ala	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn	Pro	Thr	Thr	Gly	Tyr	Arg	Arg
		35					40					45			
Leu	Leu	Arg	Phe	Ser	Ser	Gln	Ile	His	Asn	Asn	Gly	Gln	Ser	Asp	Phe
	50					55					60				
Arg	Pro	Lys	Asn	Gly	Arg	His	Ala	Trp	Ile	Trp	His	Asp	Cys	His	Arg
65					70					75					80
His	Tyr	His	Ser	Met	Glu	Val	Phe	Thr	His	Tyr	Asp	Leu	Leu	Asn	Leu
			85						90					95	

Asn	Gly	Thr	Lys	Val	Ala	Glu	Gly	His	Lys	Ala	Ser	Phe	Cys	Leu	Glu
			100					105					110		
Asp	Thr	Glu	Cys	Glu	Gly	Asp	Ile	Gln	Lys	Asn	Tyr	Glu	Cys	Ala	Asn
		115					120					125			
Phe	Gly	Asp	Gln	Gly	Ile	Thr	Met	Gly	Cys	Trp	Asp	Met	Tyr	Arg	His
	130					135					140				
Asp	Ile	Asp	Cys	Gln	Trp	Ile	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Pro	Pro	Gly	Asp
	145				150					155					160
Tyr	Leu	Phe	Gln	Val	Val	Ile	Asn	Pro	Asn	Phe	Glu	Val	Ala	Glu	Ser
			165						170					175	
Asp	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Cys	Arg	Ser	Arg	Tyr	Asp	Gly	His
			180					185					190		
Arg	Ile	Trp	Met	Tyr	Asn	Cys	His	Ile	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Glu	Glu
		195					200					205			
Thr	Glu	Lys	Lys	Phe	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Leu	Leu	Asn	Asn	Gln	Leu
	210					215					220				
Ser	Pro	Gln													
	225														

<210> 6
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo Sintético

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)...(135)
 <223> Región Variable de Cadena Pesada

<400>	6														
Met	Glu	Trp	Ser	Arg	Val	Phe	Ile	Phe	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Ala	Gly
1				5					10					15	
Val	His	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Arg
			20					25					30		
Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe
		35					40					45			
Thr	Tyr	Tyr	Leu	Ile	Glu	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu
	50					55					60				
Glu	Trp	Ile	Gly	Val	Ile	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Gly	Thr	Asn	Tyr	Asn
	65				70					75					80
Glu	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser
			85						90				95		
Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Asp	Asp	Ser	Ala	Val
			100					105					110		
Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Asn	Trp	Met	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
		115					120					125			
Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser									
	130					135									

<210> 7
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo Sintético

<220>
<221> CADENA
<222> (1)...(132)
<223> Región Variable de Cadena ligera

<400> 7
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Ser
20 25 30
Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45
Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
85 90 95
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Ile Lys
130

<210> 8
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> CADENA
<222> (1)...(116)
<223> Región variable de cadena pesada

<400> 8
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30
Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)...(112)
 <223> Región variable de cadena ligera

<400> 9
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Phe Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95
 Leu Glu Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 10
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)...(116)
 <223> Región variable de cadena pesada

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr
 20 25 30
 Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

100
Thr Val Ser Ser
115

105

110

<210> 11
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> CADENA
<222> (1)...(116)
<223> Región variable de cadena pesada

<400> 11
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30
Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Trp Met Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<220>
<221> CADENA
<222> (1)...(116)
<223> Región variable de cadena pesada

<400> 12
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Thr Tyr Tyr
20 25 30
Leu Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Val Ile Asn Pro Gly Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90					95		
Ala	Arg	Asn	Trp	Met	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val
		100						105					110		
Thr	Val	Ser	Ser												
		115													

<210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)...(112)
 <223> Región variable de cadena ligera

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
	35					40						45			
Pro	Gln	Phe	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50				55						60				
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65				70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His
			85					90					95		
Leu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Constructo sintético

<220>
 <221> CADENA
 <222> (1)...(112)
 <223> Región variable de cadena ligera

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	
Gln	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser
		20						25					30		
Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser

		35					40				45						
Pro	Gln	Phe	Leu	Ile	Tyr	Arg	Met	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro		
	50					55					60						
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile		
65				70						75					80		
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	His		
			85					90						95			
Leu	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110				

Por la presente certifico que esta correspondencia está siendo transmitida por fax a la Oficina Mundial de la Propiedad Intelectual de fax no. 01141223388270 en la fecha que se indica a continuación.

Fecha: 9 de Noviembre de 2012

Firma: /Angela Olivos-Blackburn/
Angela Olivos-Blackburn

iente No.: 246102008340

**TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES
EN EL COMITÉ INTERNACIONAL DE LA OMPI**

Solicitud Internacional No. : PCT/US2012/040585
Fecha de Presentación : 01 DE JUNIO DE 2012 (01.06.2012)
Internacional
Fecha de la Primera Prioridad : 01 DE JUNIO DE 2011 (01.06.2011)
Solicitante(s) : GILEAD BIOLOGICS, INC.
Título : ENSAYO DE LISILOXIDASA-HOMÓLOGO 2 Y
MÉTODOS DE USO DEL MISMO

ENMIENDA BAJO EL ARTÍCULO 19
RESPUESTA AL REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

El Comité Internacional de la
Organización para la Propiedad Intelectual
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20,
SUIZA

Estimada OMPI:

Esta respuesta en virtud del artículo 19 del PCT se presenta en respuesta al informe de búsqueda internacional (Formato PCT/ISA/220 y Formato PCT/ISA/210) que fue enviado el 10 de septiembre de 2012, en la solicitud antes identificada. El solicitante presenta a continuación reivindicaciones modificadas en hojas de reemplazo 71-77 y hoja de reemplazo 78 (Resumen original). Se estableció un período de dos meses para la respuesta. Se cree que no se requiere el pago de ninguna tasa en relación con esta presentación.

En las Reivindicaciones

Por favor reemplace las reivindicaciones 1-40 con la siguiente lista de reivindicaciones.

1. Un método que comprende:
 - a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo sometido a tratamiento para una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y
 - b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel detectado de LOXL2 indica la presencia o ausencia de la enfermedad o condición en el individuo la probabilidad de una respuesta a un tratamiento para una enfermedad o condición en el individuo.
2. Un método que comprende:
 - a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene y está sometido a un tratamiento para una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y
 - b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera el LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel de LOXL2 detectado indica la probabilidad de un resultado, evento, o criterio de valoración de la enfermedad o condición.
3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde un nivel de LOXL2 detectado en el paso (b) que es menor que un nivel determinado en un primer momento en el individuo indica la eficacia del tratamiento.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el nivel determinado en el primer momento es un nivel de pre-tratamiento.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-26, en donde la muestra líquida es sangre, una fracción de sangre, orina, saliva, esputo, o lavado broncoalveolar.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 7-26, en donde el anticuerpo específico para LOXL2 comprende una etiqueta detectable.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 8-26, que además comprende inmovilizar el LOXL2 presente en la muestra líquida sobre un soporte insoluble, en donde la inmovilización es llevada a cabo mediante la puesta en contacto de la muestra líquida con un segundo anticuerpo específico para LOXL2 para formar un segundo complejo anticuerpo-LOXL2, en donde el segundo anticuerpo está inmovilizado sobre el soporte insoluble.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la inmovilización es llevada a cabo antes del paso (a).

9. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2), en donde el anticuerpo es capaz de unirse a LOXL2 cuando el LOXL2 está unido a un agente que inhibe la actividad enzimática de LOXL2; y

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida,

en donde el nivel detectado de LOXL2 indica la presencia o ausencia de la enfermedad o condición en el individuo la probabilidad de un resultado, evento, o criterio de valoración de la enfermedad o condición.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el agente es un inhibidor alostérico de la actividad enzimática de LOXL2.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal antiLOXL2.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo monoclonal antiLOXL2 se une a un epítipo dentro de un dominio SRCR3-4 de LOXL2.

13. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2);

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida; y:

c) comparar dicho nivel detectado con un valor control normal, en donde un nivel detectado que es mayor que un valor control normal es indicativo de una probabilidad de que el individuo responda a un tratamiento para una enfermedad o condición; y

d) determinación de una probabilidad de que el individuo responda al tratamiento para la enfermedad o condición.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y 15-26, en donde la enfermedad o condición es una enfermedad fibrótica o cáncer.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la enfermedad o condición es una enfermedad fibrótica y un nivel circulante de LOXL2 que es mayor que un normal nivel control indica que el individuo probablemente tenga una respuesta con beneficio clínico a un tratamiento para la enfermedad fibrótica.

16. El método de la reivindicación 14 o reivindicación 15, en donde la enfermedad o condición es fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, o mielofibrosis, cirrosis, hepatitis viral crónica, virus de la hepatitis C (HCV) o virus de la hepatitis B (HBV).

17. El método de la reivindicación 16, en donde la enfermedad o condición es fibrosis idiopática pulmonar (IPF).

18. El método de la reivindicación 17, en donde el nivel detectado indica la probabilidad de un resultado de enfermedad IPF, criterio de valoración, o evento en el individuo.

19. El método de la reivindicación 18, en donde el resultado de enfermedad IPF, criterio de valoración, o evento es progresión de la enfermedad IPF, declive de la función

pulmonar, hospitalización respiratoria, supervivencia libre de trasplante, muerte, o falta de respuesta al tratamiento.

20. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene IPF con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida,

en donde el nivel detectado indica la probabilidad de progresión de la enfermedad IPF, declive de la función pulmonar, hospitalización respiratoria, supervivencia libre de trasplante, muerte, o falta de respuesta al tratamiento.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en donde el método además comprende detección de una medida de Severidad de la enfermedad IPF o estado funcional en el individuo, la medida es seleccionada a partir del grupo que consiste en porcentaje de la capacidad vital forzada predicha (FVC), porcentaje de la capacidad de difusión de monóxido de carbono predicha (DL_{CO}), distancia de caminata a los 6 minutos (6MWD), media de la presión arterial pulmonar (mPAP), saturación más baja de oxígeno en reposo (SpO_2), índice fisiológico compuesto (CPI), Puntuación del Cuestionario Respiratorio de St. George (SGRQ), Puntaje del Índice de Transición de Disnea (TDI), falta de respuesta al tratamiento, y biomarcadores de la enfermedad IPF.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y 23-27, que además comprende analizar el nivel de LOXL2 usando un modelo predictivo.

23. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2);

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel detectado indica la presencia o ausencia de la enfermedad o condición en el individuo la probabilidad de una respuesta a un tratamiento para una enfermedad o condición en el individuo; y

c) alteración o interrupción del tratamiento para la enfermedad o condición en el individuo basado en el nivel detectado de LOXL2 en la muestra líquida.

24. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2);

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida; y

c) sometimiento del individuo a una o más pruebas diagnósticas adicionales.

25. El método de la reivindicación 24, en donde la una o más pruebas diagnósticas adicionales es una prueba de función pulmonar o prueba de función hepática.

26. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel detectado indica que el individuo tiene una enfermedad fibrótica activa o un estado de enfermedad fibrótica avanzado.

27. El método de la reivindicación 26, en donde la enfermedad fibrótica activa es fibrosis hepática METAVIR F1 o F2, o el estado de enfermedad fibrótica avanzado es fibrosis hepática METAVIR F4.

28. Un dispositivo de ensayo para ser usado en la determinación del nivel de un polipéptido de oxidasa (LOXL2) en una muestra biológica líquida obtenida de un individuo, en donde el dispositivo comprende: una matriz que define un vía de flujo axial, donde la matriz comprende:

i) una zona de recepción de la muestra en un extremo corriente arriba de la vía de flujo que recibe la muestra de fluido;

ii) una o más zonas de prueba posicionadas dentro de la vía de flujo y corriente debajo de la zona de recepción de la muestra, cada una de dicha una o más zonas de prueba comprende un Anticuerpo específico para LOXL2, en donde el anticuerpo específico para LOXL2 es capaz de unirse a un Polipéptido LOXL2 presente en una muestra líquida para formar un complejo anticuerpo anti LOXL2/LOXL2; y

iii) una o más zonas de control posicionadas dentro de la vía de flujo y corriente debajo de la zona de recepción de la muestra.

29. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 28, en donde, cuando la una o más zona de prueba comprende al menos dos zonas de prueba, al menos una de la una o más zonas de control está posicionada entre dos zonas de prueba.

30. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 29, en donde las al menos dos zonas de prueba y la al menos una zona de control se encuentran posicionadas en un formato alternante dentro de la vía de flujo comenzando con una zona de prueba posicionada corriente arriba de cualquier zona de control.

31. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 29 o 30, en donde el anticuerpo anti-LOXL2 en una o más de dichas una o más zonas de prueba esta inmovilizado sobre la matriz en la zona de prueba.

32. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-31, que además comprende una zona de etiquetado, comprende un anticuerpo marcado específico para un anticuerpo específico para LOXL2, en donde:

el anticuerpo marcado es capaz de unirse a un anticuerpo anti-LOXL2 presente en un complejo anticuerpo anti LOXL2/LOXL2, para formar un anticuerpo anti-LOXL2 /LOXL2 marcado, y

el anticuerpo marcado se puede mover en presencia de la muestra líquida.

33. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 32, en donde el anticuerpo marcado comprende un componente de etiqueta seleccionada a partir del grupo que consiste en a agente

quimioluminiscente, una partícula marcada, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

34. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-33, en donde la matriz está posicionada dentro de una carcasa que comprende un soporte y opcionalmente una tapa, en donde la carcasa contiene una apertura de aplicación y una o más puertos de observación.

35. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde el dispositivo es una tira reactiva.

36. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 29-35, en donde el dispositivo es un dispositivo de ensayo en forma de varilla.

37. Un kit para la determinación del nivel de un polipéptido de oxidasa (LOXL2) en una muestra biológica obtenida de un individuo, en donde el kit comprende:

- a) un primer anticuerpo específico para LOXL2; y
- b) a segundo anticuerpo específico para LOXL2.

38. El kit de la reivindicación 37, que además comprende LOXL2 purificado Para ser usado en la generación de una curva estándar.

39. El kit de la reivindicación 37 o reivindicación 38, en donde al menos uno de dichos anticuerpos comprende una etiqueta detectable.

40. El kit de la reivindicación 39, en donde la etiqueta detectable comprende un agente quimioluminiscente, una partícula marcada, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde el contacto y la detección son llevados a cabo usando el dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-36 o el kit de la reivindicaciones 37-40.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 41, en donde el nivel detectado de LOXL2 es mayor que aproximadamente 700 pg/mL.

43. El método de la reivindicación 42, en donde el nivel detectado de LOXL2 es mayor que aproximadamente 800 pg/mL.

44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 41, en donde el nivel detectado de LOXL2 es mayor que aproximadamente 750 pg/mL.

45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 41, que además comprende la determinación de que el nivel detectado de LOXL2 es mayor que un nivel umbral de LOXL2, determinando de este modo la probabilidad de un resultado de enfermedad, criterio de valoración, o evento en el individuo.

46. El método de la reivindicación 45, en donde la cantidad umbral es aproximadamente 700, 750, o 800 pg/mL.

47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o 22-25, en donde la enfermedad o condición es cirrosis biliar primaria (PBC) o colangitis esclerosante primaria (PSC).

Comentarios

Las reivindicaciones 1-19 y 21-41 corresponden a las reivindicaciones originalmente presentadas 1-19 y 20-40, respectivamente. Las reivindicaciones 1 y 2 han sido enmendadas para incorporar elementos de la reivindicación dependiente original 3, con las enmiendas correspondientes a la reivindicación 3. Las reivindicaciones dependientes originales 9, 13, 22, 23, y 25 (ahora 9, 13, 23, 24, y 26) han sido re-escritas de una forma independiente, incorporando elementos de la reivindicación independiente original 1, con dependencia de las reivindicaciones 5-7, 14, y 21 (ahora 22) actualizadas de forma apropiada. Se han agregado las nuevas reivindicaciones 20 y 42-47. Las reivindicaciones han sido enumeradas de forma apropiada.

Las enmiendas están totalmente sustentadas en la especificación tal como ha sido presentada, incluyendo las reivindicaciones originales. La nueva reivindicación 20 está sustentada, por ejemplo, en las reivindicaciones originales 1 y 17-19. Las nuevas reivindicaciones 42-46 están sustentadas, por ejemplo, en los párrafos [0018] y [00148]. La nueva reivindicación 47 está basada, por ejemplo, en los párrafos [00132], y [00176]. No se ha agregado nueva materia. Las enmiendas no van más allá de la descripción tal como fue presentada.

El solicitante respetuosamente solicita que las enmiendas adjuntas a las reivindicaciones sean incorporadas.

Fecha: 09 de Noviembre de 2012

Respetuosamente presenta,

Por /Amy A. Mills, Reg. No. 58,906/
Amy A. Mills, Reg. No. 58,906
MORRISON & FOERSTER LLP
12531 High Bluff Drive, Suite 100
San Diego, California 92130-2040
TEL: (858) 314-7521
FAX: (858) 720-5125

cc. US Patent & Trademark Office ISA/US

REIVINDICACIONES

1. Un método que comprende:
 - a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo sometido a tratamiento para una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y
 - b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel detectado de LOXL2 indica la presencia o ausencia de la enfermedad o condición en el individuo la probabilidad de una respuesta a un tratamiento para una enfermedad o condición en el individuo.
2. Un método que comprende:
 - a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene y está sometido a tratamiento para una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y
 - b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera el LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel de LOXL2 detectado indica la probabilidad de un resultado, evento, o criterio de valoración de la enfermedad o condición.
3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde un nivel de LOXL2 detectado en el paso (b) que es menor que un nivel determinado en un primer momento en el individuo indica la eficacia del tratamiento.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el nivel determinado en el primer momento es un nivel de pre-tratamiento.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y 6-26, en donde la muestra líquida es sangre, una fracción de sangre, orina, saliva, esputo, o lavado broncoalveolar.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y 7-26, en donde el anticuerpo específico para LOXL2 comprende una etiqueta detectable.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-6 y 8-26, que además comprende inmovilizar el LOXL2 presente en la muestra líquida sobre un soporte insoluble, en donde la inmovilización es llevada a cabo mediante la puesta en contacto de la muestra líquida con un segundo anticuerpo específico para LOXL2 para formar un segundo complejo anticuerpo-LOXL2, en donde el segundo anticuerpo esta inmovilizado sobre el soporte insoluble.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la inmovilización es llevada a cabo antes del paso (a).

9. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2), en donde el anticuerpo es capaz de unirse a LOXL2 cuando el LOXL2 está unido a un agente que inhibe la actividad enzimática del LOXL2; y

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida,

en donde el nivel detectado de LOXL2 indica la presencia o ausencia de la enfermedad o condición en el individuo la probabilidad de un resultado, evento, o criterio de valoración de la enfermedad o condición.

10. El método de la reivindicación 9, en donde el agente es un inhibidor alostérico de La actividad enzimática de LOXL2.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el inhibidor alostérico es un anticuerpo monoclonal antiLOXL2.

12. El método de la reivindicación 11, en donde el anticuerpo monoclonal anti LOXL2 se une a un epítopo dentro de un dominio SRCR3-4 de LOXL2.

13. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2);

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida; y:

c) comparar dicho nivel detectado con un valor control normal, en donde a nivel detectado que es mayor que un valor control normal es indicativo de una probabilidad de que el individuo responda a un tratamiento para una enfermedad o condición; y

d) determinación de una probabilidad de que el individuo responda al tratamiento para la enfermedad o condición.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y 15-26, en donde la enfermedad o condición es una enfermedad fibrótica o cáncer.

15. El método de la reivindicación 14, en donde la enfermedad o condición es una enfermedad fibrótica y un nivel circulante de LOXL2 que es mayor que un normal nivel control indica que el individuo probablemente tenga una respuesta con beneficio clínico a un tratamiento para la enfermedad fibrótica.

16. El método de la reivindicación 14 o reivindicación 15, en donde la enfermedad o condición es fibrosis pulmonar, fibrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis cardíaca, o mielofibrosis, cirrhosis, hepatitis viral crónica, hepatitis C virus (HCV) o hepatitis B virus (HBV).

17. El método de la reivindicación 16, en donde la enfermedad o condición es fibrosis pulmonar idiopática (IPF).

18. El método de la reivindicación 17, en donde el nivel detectado indica la probabilidad de un resultado de enfermedad IPF, criterio de valoración, o evento en el individuo.

19. El método de la reivindicación 18, en donde el resultado de enfermedad IPF, criterio de valoración, o evento es progresión de la enfermedad IPF, declive de la función

pulmonar, hospitalización respiratoria, supervivencia libre de trasplante, muerte, o falta de respuesta al tratamiento.

20. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene IPF con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida,

en donde el nivel detectado indica la probabilidad de progresión de la enfermedad IPF, declive de la función pulmonar, hospitalización respiratoria, supervivencia libre de trasplante, muerte, o falta de respuesta al tratamiento.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 17-20, en donde el método además comprende detección de una medida de Severidad de la enfermedad IPF o estado funcional en el individuo, la medida es seleccionada a partir del grupo que consiste en porcentaje de la capacidad vital forzada predicha (FVC), porcentaje de la capacidad de difusión de monóxido de carbono predicha (DL_{CO}), distancia de caminata a los 6 minutos (6MWD), media de la presión arterial pulmonar (mPAP), saturación más baja de oxígeno en reposo (SpO_2), índice fisiológico compuesto (CPI), Puntuación del Cuestionario Respiratorio de St. George (SGRQ), Puntaje del Índice de Transición de Disnea (TDI) score, falta de respuesta al tratamiento, y biomarcadores de la enfermedad IPF.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-21 y 23-27, que además comprende analizar el nivel de LOXL2 usando un modelo predictivo.

23. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2);

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel detectado indica la presencia o ausencia de la enfermedad o condición en el individuo la probabilidad de una respuesta a un tratamiento para una enfermedad o condición en el individuo; y

c) alteración o interrupción del tratamiento para la enfermedad o condición en el individuo basado en el nivel detectado de LOXL2 en la muestra líquida.

24. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo que tiene una enfermedad o condición con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2);

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida; y

c) sometimiento del individuo a una o más pruebas diagnósticas adicionales.

25. El método de la reivindicación 24, en donde la una o más pruebas diagnósticas adicionales es una prueba de función pulmonar o prueba de función hepática.

26. Un método que comprende:

a) contactar una muestra líquida obtenida de un individuo con un anticuerpo específico para lisil oxidasa (LOXL2); y

b) detección de la unión del anticuerpo con el LOXL2 presente en la muestra líquida, detectando de esta manera un nivel de LOXL2 en la muestra líquida, en donde el nivel detectado indica que el individuo tiene una enfermedad fibrótica activa o un estado de enfermedad fibrótica avanzado.

27. El método de la reivindicación 26, en donde la enfermedad fibrótica activa es METAVIR F1 o F2 fibrosis hepática, o el estado de enfermedad fibrótica avanzado es METAVIR F4 fibrosis hepática.

28. Un dispositivo de ensayo para ser usado en determinación del nivel de un polipéptido de oxidasa (LOXL2) en una muestra biológica líquida obtenida de un individuo, en donde el dispositivo comprende: una matriz que define una vía de flujo axial, donde la matriz comprende:

i) a zona de recepción de la muestra en un extremo corriente arriba de la vía de flujo que recibe la muestra de fluido;

ii) una o más zonas de prueba posicionadas dentro de la vía de flujo y corriente abajo desde la zona de recepción de la muestra, cada una de dicha una o más zonas de prueba comprende un anticuerpo específico para LOXL2, en donde el anticuerpo específico para LOXL2 es capaz de unirse a un polipéptido LOXL2 presente en una muestra líquida para formar un complejo anticuerpo anti LOXL2/LOXL2; y

iii) una o más zonas de control posicionadas dentro de la vía de flujo y corriente abajo desde la zona de recepción de la muestra.

29. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 28, en donde, cuando la una o más zona de prueba comprende al menos dos zonas de prueba, al menos una de la una o más zonas de control está posicionada entre dos zonas de prueba.

30. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 29, en donde las al menos dos zonas de prueba y al menos una zona de control se encuentran posicionadas en un formato alternante dentro de la vía de flujo comenzando con una zona de prueba posicionada corriente arriba de cualquier zona de control.

31. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 29 o 30, en donde el anticuerpo anti-LOXL2 en una o más de dichas una o más zonas de prueba esta inmovilizado sobre la matriz en la zona de prueba.

32. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-31, que además comprende una zona de etiquetado, comprende un anticuerpo marcado específico para un anticuerpo específico para LOXL2, en donde:

el anticuerpo marcado es capaz de unirse a un anticuerpo anti-LOXL2 presente en un complejo anticuerpo anti LOXL2/LOXL2, para formar un anticuerpo anti-LOXL2 /LOXL2 marcado, y

el anticuerpo marcado se puede mover en presencia de la muestra líquida.

33. El dispositivo de ensayo de la reivindicación 32, en donde el anticuerpo marcado comprende un componente de etiqueta es seleccionada a partir del grupo que consiste en a

agente quimioluminiscente, una partícula marcada, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

34. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-33, en donde la matriz está posicionada dentro de una carcasa que comprende un soporte y opcionalmente una tapa, en donde la carcasa contiene una apertura de aplicación y una o más puertos de observación.

35. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 29-34, en donde el dispositivo es una tira reactiva.

36. El dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 29-35, en donde el dispositivo es un dispositivo de ensayo en forma de varilla.

37. A kit para la determinación del nivel de un polipéptido de oxidasa (LOXL2) en una muestra biológica obtenida de un individuo, el kit comprende:

- a) un primer anticuerpo específico para LOXL2; y
- b) a segundo anticuerpo específico para LOXL2.

38. El kit de la reivindicación 37, que además comprende LOXL2 purificado para ser usado en la generación de una curva estándar.

39. El kit de la reivindicación 37 o reivindicación 38, en donde al menos uno de dichos anticuerpos comprende una etiqueta detectable.

40. El kit de la reivindicación 39, en donde la etiqueta detectable comprende un agente quimioluminiscente, una partícula marcada, un agente colorimétrico, un agente de transferencia de energía, una enzima, un agente fluorescente, y un radioisótopo.

41. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27, en donde el contacto y la detección son llevados a cabo usando el dispositivo de ensayo de cualquiera de las reivindicaciones 28-36 o el kit de la reivindicaciones 37-40.

42. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 41, en donde el nivel detectado de LOXL2 es mayor que aproximadamente 700 pg/mL.

43. El método de la reivindicación 42, en donde el nivel detectado de LOXL2 es mayor que aproximadamente 800 pg/mL.

44. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 41, en donde el nivel detectado de LOXL2 es mayor que aproximadamente 750 pg/mL.

45. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-27 y 41, que además comprende determinación del nivel detectado de LOXL2 es mayor que un nivel umbral de LOXL2, determinando de este modo la probabilidad de un resultado de enfermedad, criterio de valoración, o evento en el individuo.

46. El método de la reivindicación 45, en donde la cantidad umbral es aproximadamente 700, 750, o 800 pg/mL.

47. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-16 o 22-25, en donde la enfermedad o condición es cirrosis biliar primaria (PBC) o colangitis esclerosante primaria (PSC).

RESUMEN

La presente descripción proporciona un ensayo para detectar y/o cuantificar polipéptidos circulantes de lisil oxidasa (LOXL2) en un individuo. El ensayo es útil en aplicaciones de diagnóstico y prognosis, los cuales también son suministrados.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2012 (06.12.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/167181 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/40 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/040585

(22) International Filing Date:
1 June 2012 (01.06.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/492,210 1 June 2011 (01.06.2011) US
61/550,895 24 October 2011 (24.10.2011) US
61/578,813 21 December 2011 (21.12.2011) US

(71) Applicant (for all designated States except US): GILEAD BIOLOGICS, INC. [US/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SMITH, Victoria [AU/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US). ADAMKEWICZ, Joanne, I. [US/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US). LYMAN, Susan, K. [US/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US). CHIEN, Jason [US/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US). LI, Xiaoming [US/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US). SHAO, Lixin [US/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US). BORNSTEIN, Jeffrey, D. [CA/US]; C/o Gilead Sciences, Inc., 333 Lakeside Drive, Foster City, CA 94404 (US).

(74) Agents: MILLS, Amy, A. et al.; Morrison & Foerster LLP, 12531 High Bluff Drive, Suite 100, San Diego, CA 92130-2040 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,

(54) Title: LYSYL OXIDASE-LIKE 2 ASSAY AND METHODS OF USE THEREOF

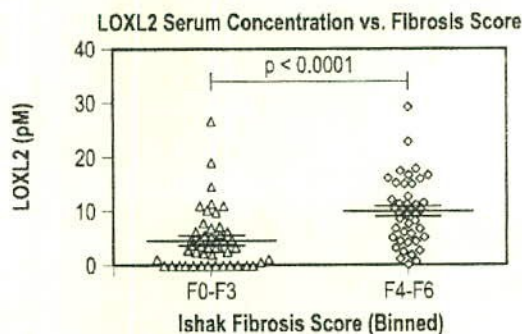


FIG. 1

(57) Abstract: The present disclosure provides an assay to detect and/or quantify circulating lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) polypeptides in an individual. The assay is useful in diagnostic and prognostic applications, which are also provided.

WO 2012/167181 A1

WO 2012/167181 A1



UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with amended claims (Art. 19(1))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 129174

Bogotá D.C., Diciembre 13 de 2013 - 08:34:28

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	569012813	12/12/2013	13.250.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
			\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301122- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 13:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 152

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Diciembre 13 de 2013 - 08:34:30

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 13 - 135366

Bogotá D.C., Diciembre 27 de 2013 - 13:32:06

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	135363	27/12/2013		2.073.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
37 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.110.000.00
			<u>\$1.110.000.00</u>
			=====

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTODIEZ MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-301122-00000-0000

Fecha: 2013-12-27 13:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 152

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Diciembre 27 de 2013 - 13:32:06

152



No. 13-301122- -00000-0000

Fecha: 2013-12-27 13:41:29 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 152

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Descripción de la invención
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
 - ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
 - ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño.
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
 - ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
 - ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
 - ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐