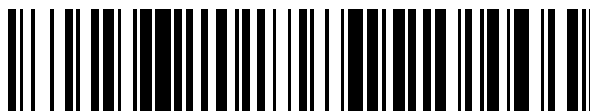


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 510 390**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.07.2009 E 11159730 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 2330424**

54 Título: **Diagnóstico de la EPOC**

30 Prioridad:

02.07.2008 EP 08450098

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

21.10.2014

73 Titular/es:

**APOSCIENCE AG (100.0%)
Rauhensteingasse 4/3
1010 Wien, AT**

72 Inventor/es:

ANKERSMIT, JAN HENDRIK

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 510 390 T3

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

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico de la EPOC

5 La presente invención se refiere a procedimientos para el diagnóstico de la EPOC en un sujeto humano.

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una de las principales causas de muerte a nivel mundial. En 2020, sólo la cardiopatía isquémica y las enfermedades cerebrovasculares serán responsables de una mortalidad más elevada entre la población mundial. Las tasas de prevalencia y hospitalización han crecido drásticamente durante los últimos años. Varios estudios han mostrado una fuerte correlación entre el tabaquismo y el desarrollo de la EPOC aunque no todos los fumadores desarrollan las características clínicas de la EPOC (Higenbottam T y col. (1980) Lancet 315:409-411). La patogénesis se caracteriza por obstrucción del flujo respiratorio debido a la remodelación de las vías respiratorias y una inflamación aberrante. La EPOC abarca bronquitis crónica y enfisema, ambas afecciones caracterizadas por destrucción del tejido. La limitación del flujo respiratorio progresa lentamente, lo que lleva a disnea y a limitaciones de la capacidad para realizar ejercicio físico. Sin embargo, la deficiencia no se limita a los pulmones ya que los pacientes con la EPOC también presentan un riesgo mayor de insuficiencias sistémicas que incluyen enfermedades cardiovasculares. El diagnóstico de la obstrucción de las vías respiratorias según las directrices de la Iniciativa Global para las enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (GOLD, por sus siglas en inglés) requiere del uso de espirometría. Una relación VEF1/CVF (volumen espiratorio forzado en un seguro/capacidad vital forzada) postbroncodilatador menor del 70% indica una obstrucción de las vías respiratorias irreversible y, por tanto, se considera que es el principal parámetro para el diagnóstico de la EPOC (Global Strategy for Diagnosis, Management, and Prevention of COPD. Global Initiative FOR Chronic Obstructive Lung Disease, 2007, www.goldcopd.com). Actualmente, los pacientes se clasifican dentro de los estadios GOLD según los datos de espirometría y la presentación clínica. La detección de los marcadores séricos que indican la actividad de la enfermedad es de interés especial en el proceso diagnóstico y terapéutico.

Aunque está ampliamente aceptado que el tabaquismo es el principal factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC, las descripciones de la ruta patogénica específica y los mecanismos implicados siguen siendo vagas. El estrés oxidativo en el parénquima pulmonar parece estar implicado en el inicio de la respuesta inflamatoria a la exposición al humo del tabaco. Los neutrófilos y macrófagos, como parte de la inmunidad innata, se consideraron fundamentales en el proceso de remodelación de las vías respiratorias en la EPOC. Este proceso de remodelación es consecuencia de la inducción de apoptosis crónica en los pulmones de los pacientes con la EPOC o en fumadores. El término apoptosis hace referencia a la alteración morfológica mostrada por células que mueren «de forma activa» lo que incluye disminución del volumen celular, formación de ampollas en la membrana, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN. La apoptosis afecta a las células epiteliales alveolares y bronquiales así como a las células endoteliales del parénquima. La apoptosis controlada es un proceso deseado y crítico para la homeostasis celular. Sin embargo, un desencadenamiento excesivo de apoptosis y un aumento del recambio de las células alveolares puede llevar a la destrucción del tejido.

Las observaciones de inmunohistoquímica en tejido pulmonar derivado de pacientes con la EPOC mostraron infiltrados inflamatorios compuestos por linfocitos T y macrófagos, con cantidades variables de mastocitos, neutrófilos y eosinófilos. Los avances en las reacciones inmunes han mostrado que un desequilibrio entre linfocitos T colaboradores de tipo 1 (TH1) y linfocitos T colaboradores de tipo 2 (TH2) tiene una función en la respuesta inflamatoria de diversas enfermedades. Los estudios han mostrado un patrón predominante de citoquinas TH1 en la inflamación intersticial infiltrante en la EPOC. El epitelio de las vías respiratorias es un componente crítico de la reacción inmune, produciendo citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleuquina-1-beta (IL-1 β) y quimioquinas. Las células epiteliales del pulmón también modulan las exacerbaciones agudas y las reacciones a patógenos que son frecuentes en pacientes que padecen la EPOC.

El único procedimiento utilizado en la práctica clínica para el diagnóstico de la EPOC es la espirometría, que es una prueba de la función pulmonar en la que se mide dicha función pulmonar, específicamente, la medición de la cantidad (volumen) y/o velocidad (flujo) de aire que puede inhalarse y exhalarse. Sin embargo, estas pruebas también se usan para diagnosticar otras enfermedades pulmonares como el asma y la fibrosis pulmonar. Por tanto, este procedimiento no puede funcionar como la única prueba para un diagnóstico fiable de la EPOC. En consecuencia, los médicos consideran también síntomas como disnea, tos crónica y producción de esputo y/o antecedentes de exposición a factores de riesgo en el diagnóstico de la EPOC. Es evidente que el uso de estos procedimientos en el diagnóstico de la EPOC o en la discriminación entre diversas formas de la EPOC puede dar lugar a un falso diagnóstico, por lo que el paciente no pueda utilizar la mejor forma de tratamiento justo desde el inicio de la enfermedad.

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar procedimientos y medidas que permitan un diagnóstico inequívoco de la EPOC en un sujeto humano desde el inicio de la enfermedad o incluso determinar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle la EPOC.

La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto humano que comprende las etapas de:

- determinar la cantidad de proteína de choque térmico 27 (HSP27) en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto humano,

5 - diagnosticar la EPOC cuando la cantidad de HSP27 esté aumentada en comparación con la cantidad de HSP27 en sujetos humanos sanos.

Según una realización preferida de la presente invención adicionalmente la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas (histonas), HSP70 y/o HSP90 alfa está aumentada en comparación con la cantidad de receptores 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, HSP70 y/o HSP90 alfa en humanos sanos.

Se vio que la concentración de HSP27, opcionalmente en combinación con ccCK-18, histonas, HSP70 y/o HSP90 alfa en una muestra de un humano puede funcionar como marcador que permita diagnosticar la EPOC, en particular, los estadios I/II y III/IV de la EPOC en dicho sujeto humano. Los marcadores incluso permiten determinar el riesgo de que un sujeto humano desarrolle la EPOC en el futuro. No todos los humanos que se considera están en riesgo de desarrollar la EPOC debido a su estilo de vida (por ejemplo, humanos expuestos a humos, fumadores, etc.) enfermarán de la EPOC. Por tanto, el diagnóstico de que un sujeto humano está en riesgo de desarrollar la EPOC es muy útil para la prevención de la EPOC.

Los marcadores utilizados en el procedimiento de la presente descripción pueden usarse por separado o en combinación, por lo que adicionalmente puede determinarse la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1, en el que se diagnostica la EPOC cuando la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1 está aumentada en comparación con la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1 en sujetos humanos sanos o en el que el riesgo de desarrollar la EPOC se diagnostica cuando la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1 está reducida en comparación con la cantidad de receptor 4 de la interleuquina 1 en humanos sanos. Entre las combinaciones preferidas se incluyen el receptor 4 de la interleuquina-1 y ccCK-18, receptor 4 de la interleuquina-1 e histonas, ccCK-18 e histonas, receptor 4 de la interleuquina-1, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa.

Para clasificar la gravedad de la EPOC se utilizan los parámetros espirométricos. Estos parámetros permiten clasificar la gravedad de la EPOC en cuatro estadios (véase la tabla A). La espirometría es esencial para el diagnóstico y proporciona una descripción útil de la gravedad de los cambios patológicos de la EPOC. Los puntos de corte espirométricos específicos (por ejemplo, relación VEF₁/CVF postbroncodilatador < 0,70 o VEF₁ < 80, 50 o 30% del previsto) se usan para determinar los estadios I a IV de la EPOC.

Tabla A: clasificación espirométrica de la EPOC (según www.goldcopd.com) Gravedad basada en el postbroncodilatador VEF₁.

Estadio I: leve	VEF ₁ /CVF < 0,70 VEF ₁ 80% del previsto
Estadio II: moderada	VEF ₁ /CVF < 0,70 50% VEF ₁ < 80% del previsto
Estadio III: grave	VEF ₁ /CVF < 0,70 30% VEF ₁ < 50% del previsto
Estadio IV: muy grave	VEF ₁ /CVF < 0,70 VEF ₁ < 30% del previsto o VEF ₁ < 50% del previsto más insuficiencia respiratoria crónica
VEF ₁ : volumen espiratorio forzado en un segundo; CVF: capacidad vital forzada; insuficiencia respiratoria: presión parcial de oxígeno arterial (PaO ₂) menor de 8,0 kPa (60 mmHg) con o sin presión parcial de CO ₂ arterial (PaCO ₂) mayor de 6,7 kPa (50 mmHg) respirando aire a nivel del mar.	

Los procedimientos para la determinación del VEF₁ y la CVF, que pueden usarse para sistematizar la EPOC (véase la tabla A) son bien conocidos en la técnica (véase por ejemplo, Eaton T y col., Chest (1999) 116:416-23; Schermer TR, y col., Thorax (2003) 58:861-6; Bolton CE, y col., Respir Med (2005) 99:493-500).

El efecto de la EPOC sobre un paciente en concreto depende no sólo del grado de limitación del flujo respiratorio sino también de la gravedad de los síntomas (especialmente insuficiencia respiratoria y disminución de la capacidad para hacer ejercicio). Existe solo una relación imperfecta entre el grado de limitación del flujo respiratorio y la presencia de síntomas. Los síntomas característicos de la EPOC son disnea, tos y producción de esputo crónicas y progresivas. La tos y producción de esputo crónicas pueden preceder al desarrollo de limitación del flujo respiratorio en muchos años. Este patrón ofrece una oportunidad única para identificar a fumadores y a otras personas en riesgo

de la EPOC, e intervenir cuando la enfermedad no suponga todavía un problema de salud.

Por el contrario, puede desarrollar una limitación significativa del flujo respiratorio sin tos y producción de esputo crónicas. Aunque la EPOC se define en función de la limitación del flujo respiratorio, en la práctica la decisión de acudir al médico (y permitir de este modo que se haga el diagnóstico) normalmente viene determinada por el efecto de un síntoma en particular sobre el estilo de vida del paciente.

Estadio I: EPOC leve - caracterizado por una limitación leve del flujo respiratorio ($VEF_1/CVF < 0,70$; VEF_1 80% del previsto). Pueden aparecer síntomas de tos y producción de esputo crónicas, pero no siempre. En este estadio, el individuo normalmente desconoce que su función pulmonar es anómala.

Estadio II: EPOC moderada - caracterizada por un empeoramiento de la limitación del flujo respiratorio ($VEF_1/CVF < 0,70$; 50% de $VEF_1 < 80\%$ de lo previsto), con dificultad para respirar desarrolla típicamente durante el ejercicio y aparece en ocasiones tos y producción de esputo. Este es el estadio en el que los pacientes típicamente van al médico debido a los síntomas respiratorios crónicos y una exacerbación de su enfermedad.

Estadio III: EPOC grave - caracterizada por empeoramiento adicional de la limitación del flujo respiratorio ($VEF_1/CVF < 0,70$; 30% de $VEF_1 < 50\%$ del previsto), dificultad respiratoria mayor, reducción de la capacidad para hacer ejercicio, fatiga y exacerbaciones repetidas que afectan prácticamente siempre a la calidad de vida de los pacientes.

Estadio IV: EPOC muy grave - caracterizada por una limitación del flujo respiratorio grave ($VEF_1/CVF < 0,70$; $VEF_1 < 30\%$ del previsto o $VEF_1 < 50\%$ del previsto más presencia de insuficiencia respiratoria crónica). La insuficiencia respiratoria se define como una presión parcial de O_2 en sangre arterial (PaO_2) menor de 8,0 kPa (60 mmHg) con o sin presión parcial de CO_2 en sangre arterial ($PaCO_2$) mayor de 6,7 kPa (50 mmHg) respirando aire a nivel del mar. La insuficiencia respiratoria también puede provocar efectos sobre el corazón como cardiopatía pulmonar (insuficiencia cardíaca derecha). Entre los signos clínicos de la cardiopatía pulmonar se incluyen la elevación de la presión venosa yugular y edema de tobillo con fóvea. Los pacientes pueden presentar estadio IV: EPOC muy grave incluso si el VEF_1 es $> 30\%$ del previsto, siempre que aparezcan estas complicaciones. En este estadio, la calidad de vida está muy apreciablemente alterada y las exacerbaciones pueden suponer una amenaza para la vida.

El término «en riesgo de desarrollar la EPOC», según se usa en este documento, se refiere a un grupo de sujetos humanos que están sometidos a amenazas ambientales o que pueden presentar una predisposición genética a desarrollar la EPOC. Entre los factores que fomentan la aparición de la EPOC se incluyen la predisposición genética, la exposición a partículas como el humo del tabaco, polvos en el lugar de trabajo (orgánico e inorgánico), contaminación del aire interior debido a calefacciones y cocinar con biomasa en hogares mal ventilados y contaminación del aire exterior, crecimiento y desarrollo pulmonar, estrés oxidativo, sexo, edad, infecciones respiratorias, situación socioeconómico, nutrición y comorbilidades. Los humanos que están en riesgo de desarrollar la EPOC pueden padecer de tos crónica, producción crónica de esputo y espirometría normal. Sin embargo, los sujetos humanos que sufran estos síntomas no desarrollan necesariamente el estadio I de la EPOC.

Según se usa en este documento, el término «sujeto humano sano» se refiere a humanos que no padecen la EPOC ni ninguna otra enfermedad pulmonar. Adicionalmente, estos humanos no han sufrido ninguna enfermedad pulmonar grave en su vida. «Humanos sanos» tampoco incluye a humanos que están expuestos con regularidad a factores de riesgo, como humos o sustancias nocivas.

Según la presente divulgación la cantidad de marcadores en «sujetos humanos sanos» se determina mediante la cuantificación de estos marcadores en al menos 5, 10, 15 o 20 «sujetos humanos sanos».

Puesto que los marcadores de la EPOC determinados con el procedimiento según la presente descripción se encuentran en la sangre, la muestra que se usará según la presente descripción es sangre, suero o plasma. Estos tipos de muestras pueden obtenerse de un humano con procedimientos conocidos en la técnica.

Para determinar específicamente la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, citoqueratina-18 escindida por caspasas (ccCK-18), proteína de choque térmico 27 (HSP27), proteína de choque térmico 70 (HSP70) y/o proteína de choque térmico 90 alfa (HSP90 alfa) en una muestra se prefiere usar procedimientos que utilizan anticuerpos dirigidos frente a dichos marcadores de la EPOC. Los procedimientos adecuados que utilizan anticuerpos son inmunoensayos que se seleccionan preferiblemente a partir del grupo compuesto por ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunotransferencia.

El término «anticuerpo», según se usa en este documento, hace referencia a anticuerpos monoclonales y policlonales o fragmentos de los mismos capaces de unirse a un antígeno. Otros anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, como anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, fragmentos de anticuerpos como fragmentos Fab o Fv, así como los fragmentos seleccionados mediante selección de bibliotecas de presentación de fagos y moléculas similares, también son útiles en los procedimientos descritos en este documento.

Los procedimientos para la preparación de anticuerpos monoclonales así como policlonales están bien establecidos (Harlow E. y col., 1988. *Antibodies*. Nueva York: Cold Spring Harbour Laboratory). Los anticuerpos policlonales se obtienen en diversas especies que incluyen, entre otras, ratón, ratas, conejo, cabra, oveja, burro, camello y caballo, usando procedimientos de inmunización y sangrado convencionales. Los sangrados de los animales con valores altos se fraccionan mediante procedimientos de adición de sal selectivos de rutina, como precipitación con sulfato amónico, y separando las fracciones específicas de inmunoglobulina mediante cromatografía de afinidad sucesiva en columnas de Sepharosa-proteína A y Sepharosa-leptina, según procedimientos convencionales. A continuación, se caracteriza la especificidad tanto de los anticuerpos policlonales como de los monoclonales purificados. Esta caracterización se realiza mediante procedimientos convencionales usando proteínas marcadas con un trazador como un radioisótopo o biotina en competición con niveles crecientes de posibles reactivos con reacción cruzada no marcados para la unión al anticuerpo. Los estudios de unión se evalúan adicionalmente mediante otros procedimientos convencionales como la bien establecida electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato sódico (PAGE-SDS) y procedimientos de inmunotransferencia en condiciones reductoras o no reductoras.

Los anticuerpos monoclonales se preparan según procedimientos de laboratorio convencionales bien establecidos («Practice and Theory of Enzyme Immunoassays» de P. Tijssen [en *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Eds: R.H. Burdon y P.H. van Kippenberg; Elsevier Publishers Biomedical Division, 1985]), que se basan en la técnica original de Kohler y Milstein (Kohler G., Milstein C. *Nature* 256:495, 1975). Esta técnica se realiza mediante la extracción de las células del timo de animales inmunizados e inmortalización de las células que producen anticuerpos mediante fusión con células de mieloma o mediante transformación con el virus de Epstein-Barr y, a continuación, seleccionado clones que expresan el anticuerpo deseado, aunque también se usan otras técnicas conocidas en la técnica. También se obtienen anticuerpos por otras técnicas conocidas por los expertos en la materia, incluyendo entre otras, la inmunización con ADN específico.

Los inmunoensayos utilizados preferiblemente se basan en técnicas en las que se usan anticuerpos de captura, que son capaces de unirse específicamente a un antígeno de interés, o a antígenos unidos a un soporte sólido. El anticuerpo de captura se conjuga o une a diversos soportes en fase sólida usando procedimientos de unión covalentes o no covalentes convencionales, dependiendo de los requerimientos analíticos y/o de separación en fase sólida necesarios. El soporte sólido está en forma de tubos de ensayo, perlas, micropartículas, papel de filtro, membranas, filtros de vidrio, partículas magnéticas, chips de cristal o silicón u otros materiales y técnicas conocidas por los expertos en la materia. El uso de micropartículas, especialmente partículas magnetizables, que se han recubierto directamente con el anticuerpo (anticuerpo de captura en partículas magnéticas) o partículas que se han marcado con un adhesivo universal (por ejemplo, avidina o anticuerpo antiespecie) es útil debido a una reducción significativa del tiempo de incubación del ensayo. Estas junto con otras técnicas alternativas conocidas en la técnica permiten la realización del ensayo en cuestión de minutos sin limitar la sensibilidad necesaria.

El anticuerpo de detección, que es capaz de unirse específicamente al antígeno de interés, usado para la detección del antígeno está unido directamente a una molécula indicadora, o se detecta indirectamente mediante un sistema de detección secundario. Este último se basa en varios principios diferentes conocidos en la técnica, que incluyen el reconocimiento de anticuerpos mediante un anticuerpo antiespecie marcado y otras formas de enlaces inmunológicos o no inmunológicos y sistemas de detección de amplificación de señal (por ejemplo, tecnología biotina-estreptavidina). La técnica de amplificación de señal se usa para aumentar significativamente la sensibilidad del ensayo y el bajo nivel de reproducibilidad y rendimiento. El marcador utilizado para su conjugación directa o indirecta al anticuerpo es cualquier molécula indicadora detectable. Entre los ejemplos de marcadores adecuados se incluyen aquellos ampliamente utilizados en el campo de los sistemas de detección inmunológica y no inmunológica, como fluoróforos, etiquetas luminiscentes, complejos metálicos y etiquetas radiactivas, así como restos que podrían ser detectados mediante otros reactivos adecuados como enzimas, o diversas combinaciones de marcadores directos o indirectos como enzimas con sustratos luminógenos.

Para diagnosticar la EPOC o el riesgo de desarrollar la EPOC supone una ventaja definir los niveles de corte por encima o por debajo de los cuales la enfermedad puede diagnosticarse. La concentración de receptor 4 de la interleuquina 1 en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila preferiblemente entre 50 y 150 pg/ml, preferiblemente entre 60 y 140 pg/ml, más preferiblemente entre 70 y 130 pg/ml.

Según otra realización de la presente descripción la concentración de citoqueratina-18 escindida por caspasas (ccCK-18) en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila entre 200 y 350 U/l, preferiblemente entre 200 y 330 U/l, más preferiblemente entre 250 y 300 U/l, medida como nuevo epítipo M30 de la citoqueratina-18.

Según otra realización de la presente descripción, la concentración de proteína de choque térmico 27 (HSP27), en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila entre 1500 y 2500 pg/ml, preferiblemente entre 1600 y 2400 pg/ml, más preferiblemente entre 1700 y 2300 pg/ml.

Según otra realización de la presente descripción, la concentración de proteína de choque térmico 70 (HSP70), en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila entre 50 y 200 pg/ml, preferiblemente entre 70 y 190 pg/ml, más preferiblemente entre 80 y 180 pg/ml.

Según otra realización de la presente descripción, la concentración de proteína de choque térmico 90 alta (HSP90 alfa), en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila entre 10 000 y 15 000 pg/ml, preferiblemente entre 11 000 y 14 500 pg/ml, más preferiblemente entre 12 000 y 14 000 pg/ml.

5 Según una realización adicional de la presente descripción la concentración de histonas en muestras de sangre de un sujeto humano sano es del 20 al 50% menor, preferiblemente del 25 al 40% menor, que en muestras de sangre de un sujeto humano que padece la EPOC.

10 Según otra realización preferida de la presente descripción, se diagnostica la EPOC cuando la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1, citoqueratina-18 escindida por caspasas (ccCK-18), histonas, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa en la muestra está aumentada al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20%, en comparación con la cantidad de ST2, ccCK-18, histonas, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa en sujetos humanos sanos. Por supuesto la cantidad de ST2, ccCK-18, histonas, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa puede también estar aumentada en al menos el 15%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

15 El riesgo de desarrollar la EPOC se diagnostica preferiblemente cuando la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1, la citoqueratina-18 escindida por caspasa (ccCK-18) y/o histonas en la muestra está reducida en al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20%, en comparación con la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, ccCK-18 y/o histonas en sujetos humanos sanos. Por supuesto la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, ccCK-18 y/o histonas también puede estar reducida en al menos el 15%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

20 El procedimiento según la presente descripción se aplica también a otros tipos de mamíferos donde el mamífero se selecciona preferiblemente a partir del grupo compuesto por caballo, perro, gato y ganado vacuno.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para discriminar entre la EPOC en estadios I/II y la EPOC en estadios III/IV en un sujeto humano que comprende las etapas de:

30 - determinar la concentración de proteína de choque térmico 27 (HSP27) en una muestra de sangre, suero o plasma de un humano que padece la EPOC,

35 - diagnosticar EPOC en estadios I/II cuando la cantidad de HSP27 está reducida en comparación con la cantidad de HPS27 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadio III/IV, o

- diagnosticar la EPOC en estadios III/IV cuando la cantidad de HSP27 está aumentada en comparación con la cantidad de HPS27 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadio I/II.

40 Según una realización especialmente preferida de la presente invención, adicionalmente, la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1 o HSP70 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios III/IV y/o cuando la concentración de ccCK-18 o fragmento de ADN asociado a histonas está reducida en comparación con la concentración de ccCK-18 o fragmento de ADN asociado a histonas determinado en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios III/IV, o donde se diagnostica la EPOC en estadios III/IV cuando la cantidad de receptor 4 de interleuquina-1 o HSP70 está reducida en comparación con la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios I/II y/o cuando la concentración de ccCK-18 o histonas está aumentada en comparación con la concentración de ccCK-18 o fragmento de ADN asociado a histonas determinado en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios I/II.

50 Los marcadores de la EPOC descritos en este documento también son adecuados para discriminar entre humanos que padecen la EPOC en estadios I/II o la EPOC en estadios III/IV como se define anteriormente. La discriminación entre estos estadios de la EPOC es importante para determinar el tratamiento. En pacientes con escasos síntomas o síntomas intermitentes (estadios I y II), por ejemplo, es suficiente el uso de un broncodilatador inhalado de corta acción si es necesario para controlar la disnea. Si no se dispone de broncodilatadores inhalados, debería considerarse el tratamiento habitual con teofilina de liberación lenta. En humanos cuya disnea durante su actividad cotidiana no se alivia a pesar del tratamiento con broncodilatadores de corta acción a necesidad, se recomienda añadir tratamiento habitual con un broncodilatador inhalado de acción prolongada. En humanos que padecen la EPOC en estadios III/IV, el tratamiento habitual con glucocorticoesteroides inhalado reduce la frecuencia de exacerbaciones y mejora el estado de salud. En estos humanos, debería añadirse el tratamiento habitual con un glucocorticoesteroide inhalado a los broncodilatadores inhalados de acción prolongada. En humanos que padecen de la EPOC en estadios III/IV deberán considerarse tratamientos quirúrgicos y/o con oxígeno a largo plazo si se produce insuficiencia respiratoria crónica.

65 Los valores de referencia que permiten discriminar entre la EPOC en estadios I/II y III/IV pueden evaluarse mediante la determinación de las respectivas concentraciones de receptor 4 de la interleuquina-1, ccCK-18, histonas, HSP27 y/o HSP70 en un conjunto de muestras obtenidas a partir de humanos que padecen la EPOC en estadios I/II y III/IV.

Este conjunto puede comprender muestras obtenidos a partir de al menos 5, preferiblemente al menos 10, más preferiblemente al menos 20, humanos que padecen la EPOC y en los que se han diagnosticado los diversos estadios de la EPOC mediante procedimientos alternativos (por ejemplo, espirometría).

5 Puede diagnosticarse la EPOC en estadios I/II en un sujeto humano cuando la concentración de HSP27 en una muestra de dicho sujeto oscila entre 2600 y 3300 pg/ml, preferiblemente entre 2700 y 3200 pg/ml. Si la cantidad de HSP27 en una muestra de un sujeto humano oscila entre 3400 y 5500 pg/ml, preferiblemente entre 3500 y 5000 pg/ml, más preferiblemente entre 3600 y 4500 pg/ml se diagnostica la EPOC en estadios III/IV.

10 Puede diagnosticarse la EPOC en estadios I/II en un sujeto humano cuando la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1 en una muestra de dicho sujeto oscila entre 160 y 400 pg/ml, preferiblemente entre 170 y 380 pg/ml, más preferiblemente entre 180 y 350 pg/ml. Puede además diagnosticarse la EPOC en estadios I/II cuando la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1 es de más de 160, preferiblemente más de 170, más preferiblemente más de 180 pg/ml en dicha muestra.

15 Puede diagnosticarse la EPOC en estadios I/II y la EPOC en estadios III/IV cuando la concentración de HPS70 en una muestra de un sujeto humano es de al menos 250 pg/ml, preferiblemente al menos 300 pg/ml.

20 Puede diagnosticarse la EPOC en estadios I/II y la EPOC en estadios III/IV cuando la concentración de HPS90 alfa en una muestra de un sujeto humano es de al menos 15 000 pg/ml, preferiblemente al menos 16 000 pg/ml.

25 Los marcadores mostrados en este documento también pueden usarse para controlar el progreso de la EPOC y el progreso de un tratamiento para la EPOC. Estos procedimientos suponen la comparación de la concentración de ccCK-18, histonas, HSP27 y/o HSP70 en muestras obtenidas de un humano a diferentes intervalos de tiempo. Los resultados obtenidos de dicho procedimiento permiten que el médico establezca una terapia apropiada.

La presente descripción se ilustra adicionalmente con las siguientes figuras, ejemplos y realizaciones sin que esto, sin embargo, suponga una restricción.

30 En la figura 1 se muestran las concentraciones en suero de citoqueratina-18 escindida por caspasa específica de apoptosis soluble detectada usando un anticuerpo M30 (+/- ETM).

35 En la figura 2 se muestran los valores de densidad óptica (D.O.) medida de los fragmentos de ADN asociados a histonas en circulación en muestras de suero (+/- ETM).

En la figura 3 se muestran los niveles de caspasa-1/ICE en las muestras de suero periférico de los pacientes del estudio (+/- ETM).

40 En la figura 4 se muestran las concentraciones séricas de ST2 soluble máxima en pacientes con la EPOC en estadios I y II (+/- ETM).

La figura 5 indica que la IL-10 en muestras de suero no mostraba diferencias entre los grupos de estudio (+/- ETM).

45 En la figura 6 se muestra las correlaciones entre las concentraciones séricas de ICE y el número de paquetes-años de los pacientes(A), fragmentos de ADN asociados a histonas en circulación y niveles séricos de ICE (B), VEF1/CVF y citoqueratina-18 escindida por caspasas séricas (C) y marcadores antiinflamatorios ST2 e IL-10 (D), respectivamente. R: coeficiente de correlación por rango de Spearman.

50 En la figura 7 (a, b, c, d, e, f) se muestran los niveles séricos de proteínas de choque térmico y proteosomas 20S determinados en el torrente circulatorio sistémico de pacientes y controles. Los resultados se expresan como la media \pm ETM.

55 En la figura 8a a 8d se muestran correlaciones no paramétricas entre HSP27, HSP70 y citoquina IL-6 inflamatoria y el parámetro de función pulmonar VEF1%CV. R: Coeficiente de correlación.

En la figura 9 se muestra una curva de característica operativa del receptor (ROC, por sus siglas en inglés) lo que indica sensibilidad y especificidad de HSP27 y HSP70 para diagnosticar la EPOC en la población del estudio fumadora.

60 EJEMPLOS:

Ejemplo 1:

Materiales y métodos.

65 Pacientes

Se incluirá en este estudio de casos y controles a un total de 64 pacientes. Voluntarios sanos (n = 15), fumadores sin la EPOC (n = 14), pacientes con la EPOC de leve a moderada (n = 19) y pacientes con la EPOC grave o muy grave (n=16) se evaluaron en cuatro grupos del estudio. Las características de los pacientes se muestran en la tabla 1.

5

Tabla 1

Características clínicas (la gravedad de la obstrucción del flujo respiratorio se determinó usando las pruebas de función pulmonar [PFP] en todos los sujetos; pacientes de la EPOC que cumplen los criterios diagnósticos GOLD para la EPOC). Los datos se proporcionan como la media (+/- desviación estándar) si no se indica otra cosa.					
Categoría del sujeto	Sano	Fumador sano	EPOC GOLD I-IV	EPOC GOLD I y II	EPOC GOLD III y IV
N	15	14	35	19	16
Hombre/mujer	10/5	7/7	20/15	10/9	10/6
Edad	57,20	56,64	59,60	60,68	58,31
Función pulmonar		-			
CVF (L)	4,55	3,84	2,80	3,33	2,14
VEF ₁ (%)	105,37	94,40	52,76	70,21	30,67
VEF ₁ /CV (%)	76,80	75,95	51,18	61,74	37,80
FEM 50 (%)	100,67	87,64	27,29	39,42	11,93
FEM 25 (%)	103,53	75,71	29,71	37,37	20,00
Antecedentes de tabaquismo					
Nunca ha fumado	15	0	0	0	0
Ex fumador	0	3	7	4	3
Fumador actual	0	11	28	15	13
Paquetes-años	0	34(25,2)	45,8(30,6)	47,3(29,7)	44,0(32,6)
Peso corporal (kg)	71,6(13,9)	76,4(8,6)	80,4(21,6)	79,7(16,7)	81,1(27,2)
Estatura (cm)	172,7(10,9)	168,7(8,1)	169,2(10,5)	167,7(12,1)	171,2(7,9)

10 Abreviaturas utilizadas: EPOC: enfermedad pulmonar obstructiva crónica; VEF1: volumen espiratorio forzado en 1 segundo; CVF: Capacidad vital forzada, GOLD: Iniciativa global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, FEM: Flujo espiratorio máximo.

15 Los criterios de exclusión fueron exacerbación aguda como se define en las directrices de la OMS y la Iniciativa global para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (GOLD, www.goldcopd.com) o uso de fármacos inmunomoduladores en los últimos 14 días, antecedentes de asma, enfermedades autoinmunes, otras enfermedades pulmonares relevantes (por ejemplo, cáncer de pulmón, deficiencia al-antitripsina conocida) o cualquier comorbilidad cardiopulmonar conocida. Se midieron la estatura y el peso (Seca; Vogel y Halke, Alemania) y se determinó el índice de masa corporal (IMC). Los parámetros de la función pulmonar (VEF1, CVF, relación VEF1:CVF) se midieron usando el mismo modelo de espirómetro (AutoboxV6200, SensorMedics, Austria). Las medidas se hicieron antes y, si se cumplían los requisitos de obstrucción del flujo respiratorio, 15 a 30 minutos después de inhalar 200 µg de salbutamol. La gasometría arterial (PaO₂, PaCO₂) se obtuvieron en reposo mientras se respiraba el aire de la habitación en posición sentada. La medida de la gasometría se realizó con un analizador de gas ABL 510 (Radiometer, Dinamarca). Los resultados se expresan como valores absolutos y porcentajes de valores previstos para edad, sexo y estatura, según las ecuaciones de predicción de la *European Community for Steel and Coal* (Comunidad Europea del Carbón y el Acero; Quanje PH y col. Eur Respir J Supl. 16 (1993): 5-40). Los valores previstos normales se derivaron de los valores de referencia de la Sociedad Austríaca de Medicina Pulmonar (Harnoncourt K y col., Österreich Ärztetg. 37 (1982): 1640-1642). Las muestras de sangre se extrajeron en el momento de la evaluación pulmonar. El suero se obtuvo tras la centrifugación y las alícuotas se mantuvieron congeladas a -20° C hasta su ensayo posterior.

30

Cuantificación de la citoqueratina-18 escindida por caspasas (ccCK-18)

35 Los niveles del neoepítotope M30 de la citoqueratina-18 se midieron en muestras usando el ELISA M30-Apoptosense (Peviva, Suecia). En resumen, este ELISA utiliza un anticuerpo que reconoce un neoepítotope expuesto tras la escisión inducida por apoptosis de citoqueratina18. Los niveles de antígeno M30 pueden medirse en unidades por litro (U/l) (1 U/l es equivalente a 1,24 pmoles de un péptido sintetizado del motivo de reconocimiento M30) según el

fabricante. Se estableció que la sensibilidad del ELISA era de 25 U/l. La reproducibilidad intra e interensayo era <10%. Las concentraciones séricas se calcularon comparando los valores de D.O. de las muestras con los valores de D.O. de las diluciones convencionales.

5 *Evaluación de los fragmentos de ADN asociados a histonas en suero*

Se usó un kit de ELISA comercial (Roche Applied Science, Alemania) para cuantificar el contenido en suero de complejos histona-ADN. Las muestras se incubaron conjuntamente en placas de microvaloración de 96 pocillos con anticuerpo monoclonal de ratón anti-histona conjugado con biotina (clon H11-4) y anticuerpo monoclonal de ratón anti-ADN conjugado con peroxidada (clon MCA-33) durante dos horas a temperatura ambiente. Después de lavar los pocillos, se añadió una solución de ABTS a cada pocillo. La reacción enzimática se controló hasta que se desarrolló suficiente color y las placas se leyeron a 405 nm. Los valores de D.O. se calcularon restando los valores de D.O. de los pocillos blanco de la media de los pocillos de muestra.

15 *Cuantificación de la caspasa-1/ICE en suero*

Se usó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (BenderMedSystems, Austria) comercial para determinar los contenidos séricos de caspasa-1/ICE soluble en muestras de suero. Las placas de microvaloración precubiertas con anticuerpo monoclonal frente a ICE humana se incubaron con el material de muestra o concentraciones convencionales diluidas (400 pg/ml - 6,25 pg/ml, siete etapas de dilución) a temperatura ambiente durante 1,5 horas. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se añadió un antisuero anti-ICE policlonal de conejo durante 30 minutos. Después de otra etapa de lavado, se aplicó conjugado de peroxidasa de rábano picante durante 30 minutos. Los pocillos se lavaron y se usó una solución de sustrato TMB para la detección de actividad enzimática. La reacción se detuvo usando ácido sulfúrico (2N). Las placas se leyeron a 450 nm en un contador Wallac Multilabel 1420 (PerkinElmer, EE. UU.). Las concentraciones se calcularon comparando los valores de densidad óptica (D.O.) de la muestra con la D.O. de concentraciones conocidas de los patrones.

Cuantificación del receptor 4 de la interleuquina-1

Se usó un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) (R&D Systems, EE. UU.) comercial para determinar los contenidos séricos de receptor 4 de la interleuquina-1 en las muestras. Las placas de microvaloración se recubrieron previamente con un anticuerpo de captura frente a ST2 humana. A continuación, las placas se lavaron y se bloquearon. Las muestras y las diluciones patrón (de 2000 pg/ml a 31,25 pg/ml) se incubaron a temperatura ambiente. Se usó para la detección un anticuerpo de cabra anti-R4 de IL-4 humano biotinilado para la detección. Se usó una solución de sustrato TMB para la detección de la actividad enzimática tras la adición de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. La reacción se detuvo usando ácido sulfúrico (1N). Las placas se leyeron a 450 nm en un contador Wallac Multilabel 1420 (PerkinElmer, EE. UU.). Las concentraciones se calcularon comparando los valores de densidad óptica (D.O.) de la muestra con la D.O. de concentraciones conocidas de los patrones.

40 *Cuantificación de interleuquina-10*

Se usó una técnica de ELISA (BenderMesSystems, Austria) para cuantificar los niveles de interleuquina-10 (IL-10) en muestras de suero obtenidas tras la centrifugación de sangre completa. Las placas de 96 pocillos se recubrieron con un anticuerpo monoclonal dirigido frente al antígeno específico y se incubaron durante la noche a 4^o C. Tras un a etapa de lavado, las placas se bloquearon con tampón del ensayo durante dos horas. Tras otra etapa de lavado, las muestras y los patrones con concentraciones definidas del antígeno se incubaron como describe el fabricante. A continuación, las placas se lavaron e incubaron con anticuerpos policlonales ligados a enzimas. La solución de sustrato TMB se aplicó después del tiempo apropiado de incubación y de otra etapa de lavado. Después se controló el desarrollo de color usando un contador Wallac Multilabel 1420 (Perkin Elmer, EE. UU.). Los valores de D.O. obtenidos se compararon con la curva patrón calculada a partir de los valores de D.O. de controles con concentraciones conocidas del antígeno.

55 *Métodos estadísticos*

Se usó el software SPSS (SPSS Inc., EE. UU.) para calcular todos los resultados. Se consideró que un valor $p < 0,05$ era estadísticamente significativo. Se realizaron comparaciones por pares entre grupos usando la prueba U de Mann-Whitney. Las correlaciones se calcularon usando el coeficiente de correlación de Spearman. Los resultados no se corrigieron para análisis múltiples.

60 Resultados

La citoqueratina-18 escindida por caspasas inducidas por apoptosis esta aumentada en pacientes con la EPOC

65 Se mostraron niveles séricos elevados de neopeptido M30 en pacientes con la EPOC en estadios I y II (294,96 U/l [87,81 - 502,11], $p = 0,008$) y con la EPOC en estadios III y IV (464,86 U/l [79,69 - 850,03], $p = 0,001$) en

comparación con los contenidos séricos de fumadores sanos (119,67 U/l [93,85 - 145,49]). Los controles sanos mostraron niveles ligeramente elevados de M30 (284,08 U/l [64,26 - 503,90]), aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa (fig. 1).

5 *El contenido de fragmentos de ADN asociados a histonas estaba aumentado en pacientes con la EPOC grave o muy grave*

Se determinó que la media del valor de D.O. en pacientes con la EPOC en estadios III y IV era de 0,43 [0,26 - 0,60]. Este nivel presentaba una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los niveles de histonas en sueros de controles sanos (0,27 [0,12 - 0,42], $p = 0,037$) y fumadores sin EPOC (0,26 [0,08 - 0,45], $p = 0,022$). Los pacientes con la EPOC en estadios I y II presentaban niveles elevados de fragmentos de ADN asociados a histonas (0,40 [0,22 - 0,59]), aunque no se observó un efecto estadístico en comparación con otros grupos (fig. 2).

15 *Los niveles de caspasa-1/ICE en suero no mostraron diferencias estadísticamente significativas*

Las concentraciones de ICE en muestras séricas eran de 84,86 pg/ml ([64,85 - 104,87], con un intervalo de confianza [IC] del 95%) para controles sanos y 102,76 pg/ml [56,59 - 148,93] para fumadores sin la EPOC. Los pacientes con la EPOC en estadios GOLD I y II mostraron un contenido medio moderadamente más alta de 114,56 pg/ml [78,98 - 150,14] y los pacientes con la EPOC en estadios III y IV presentaban un nivel medio en suero de 111,87 pg/ml [82,21 - 141,53] comparable con la EPOC en estadios I y II. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (fig. 3).

Los niveles séricos de receptor 4 de la interleuquina 1 están elevados en pacientes con la EPOC

25 Pudieron demostrarse niveles séricos elevados del receptor 4 de la interleuquina-1 en pacientes con la EPOC en estadio I y II (251,80 pg/ml [45,74 - 457,85], $p = 0,031$) en comparación con los contenidos séricos de fumadores sanos (94,01 pg/ml [11,57 - 176,46]). En todos los demás grupos las comparaciones no mostraron diferencias significativas; controles sanos (99,86 pg/ml [41,86 - 157,86]), la EPOC en estadios III y IV (127,24 pg/ml [51,72 - 202,75]) (fig. 4).

30 *Los niveles de IL-10 no mostraron diferencias estadísticamente significativas*

Las concentraciones de IL-10 en muestras de suero eran de 8,84 pg/ml ([-6,14 - 23,81]) para controles sanos y 10,25 pg/ml [-3,84 - 24,34] para fumadores sin la EPOC. Los pacientes con la EPOC en estadios GOLD I y II mostraron un contenido de 11,57 pg/ml [-8,49 - 31,62] y los pacientes con la EPOC en estadios III y IV presentaban un nivel sérico medio más bajo de 0,63 pg/ml [-0,71 - 1,97]. No se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (fig. 5).

40 Conclusión

La enfermedad obstructiva crónica se caracteriza por inflamación crónica del tejido pulmonar y afección concomitante de otros sistemas de órganos. Se considera que este proceso está desencadenado principalmente por muchos años de fumar. Pudo demostrarse una fuerte correlación entre el número de paquetes-años y la concentración sérica de la caspasa-1 ICE (ICE) proinflamatoria lo que indica un efecto directo de los hábitos tabáquicos sobre la respuesta inflamatoria sistémica (fig. 6A). Los niveles elevados de ccCK-18 soluble específica de apoptosis y de fragmentos de ADN asociados a histonas (histonas) pudieron encontrarse en pacientes con la EPOC en estadios GOLD I y II y GOLD III y IV (figuras 1, 2). Los contenidos séricos de proteína ICE biológicamente activo se correlacionan significativamente con niveles de histonas (fig. 6B). En células apoptóticas, la activación del endonucleosoma produce la escisión del ADN y genera fragmentos de cromatina largos, oligonucleosomas cortos ricos en H1 y mononucleosomas (denominados histonas) que no se unen al núcleo. La liberación de complejos histona-ADN específicos de apoptosis parece tener como resultado la remodelación constante debida a la activación inmune.

La patogénesis de la EPOC se asocia con la degeneración del tejido pulmonar debido a un aumento de la activación y señalización proapoptótica de los sistemas inmunes innato y adquirido en pacientes susceptibles a la enfermedad. La inflamación crónica induce un aumento de los niveles de ICE, una proteasa con Cys285 que sirve como residuo catalítico, que escinde el precursor de IL-1 β biológicamente inactivo de 21 kDa en Asp116-Ala117 para generar la forma madura de 17,5 kDa de IL-1 β . La enzima activa consta de dos subunidades no idénticas (p10 y p20) ambas esenciales para la actividad enzimática y, por tanto, tiene una función fundamental en la apoptosis de diversas células, incluyendo células endoteliales y epiteliales. El recambio apoptótico da lugar a la liberación de filamentos intermedios celulares como citoqueratina-18 (CK-18). CK-18 es un componente principal de los filamentos intermedios y se expresa ampliamente en tejidos epiteliales y endoteliales. En las células apoptóticas, CK-18 está fosforilada y los microfilamentos se agregan rápidamente. Condiciones diferentes de estrés celular aumentan la reorganización de los microfilamentos citoplasmáticos a la vez que alteran la polimerización de CK-18. En consecuencia, la escisión mediada por caspasas de CK-18 tiene lugar durante la apoptosis e induce la formación de un neopeptido específico, reconocido por el anticuerpo M30. La especificidad de unión de este anticuerpo se

restringe a productos de degeneración apoptótica de CK-18 (CK-18 escindida por caspasas [ccCK-18]). De manera interesante, la presencia de ccCK-18 soluble se asoció con alteración de la función pulmonar según la clasificación de la EPOC usando las directrices GOLD (fig. 6C).

- 5 Los datos anteriores indican una apoptosis dependiente de la degeneración pulmonar en muestras de suero. La escisión de la citoqueratina-18 y la liberación de ccCK-18 al torrente circulatorio se produce con la progresión de la enfermedad y puede usarse para controlar la morbilidad del paciente.

10 Estudios previos han demostrado una predominancia del entorno de citoquinas TH1 en pacientes con la EPOC. Puesto que la inflamación va siempre acompañada de la secreción de proteínas conocidas por tener propiedades antiinflamatorias, como la IL-10, se estudió otra proteína que se sabe está relacionada con el sistema inmune innato denominada receptor 4 de la interleuquina-1 T1. Se considera que esta molécula soluble modula las respuestas inmunes asociadas a TH1/TH2. Se observó un aumento significativo de los niveles séricos del receptor 4 de la interleuquina-1 antiinflamatoria en pacientes con la EPOC en estadios I y II, pero no en la EPOC grave. Estas observaciones indican que en la EPOC se evidencia un aumento de los marcadores de activación inmune innata y una regulación similar a las de las enfermedades autoinmunes, sepsis y enfermedades específicas pulmonares como fibrosis y asma.

20 En un trabajo reciente se ha mostrado que los receptores similares a Toll (TLR) actúan como receptores de patrones de reconocimiento en mamíferos que señalizan la presencia de componentes microbianos en las células del sistema inmune innato. Se han publicado al menos 10 miembros de la familia de TLR de mamíferos, mostrando cada TLR una especificidad diferente por patrones molecular de microbios. La unión de ligandos de activación, por ejemplo lipolisacárido [LPS], a los TLR induce la activación del NF- κ B, lo que induce a la producción y liberación de citoquinas proinflamatorias. Normalmente se acepta que la preexposición a LPS reduce la sensibilidad a una segunda exposición a LPS, lo que produce una disminución de la producción de numerosas citoquinas tanto en roedores como en humanos. Los mecanismos moleculares de tolerancia inducida por TLR pueden suponer la regulación por disminución del complejo TLR4-MD2 que puede llevar a la disminución de la señalización de los TLR. Adicionalmente, se demostró que la expresión de IRAK-M e IRAK-1 así como del supresor de la señalización de citoquinas (SOCS-1) está relacionada con la tolerancia a endotoxinas.

30 En varios estudios se asume un papel importante para el receptor 4 de la interleuquina-1, miembro de la familia del receptor Toll/IL-1 (TIR), en la inducción de la tolerancia a endotoxinas. ST2 se expresa en las células TH2, en mastocitos y en macrófagos. Se demostró que se regula por incremento tras la estimulación con LPS y regula la expresión de citoquinas en un modelo de lesión pulmonar aguda. La secreción del receptor 4 de la interleuquina 1 en el inicio de la EPOC actúa como regulador negativo de la señalización de TLR4 y IL-1R a través del secuestro de MyD88. En el ámbito clínico esto puede significar que el T1/receptor 4 de la interleuquina-1 sistémico funciona como una proteína sérica protectora para evitar la destrucción pulmonar debida a un sistema inmune adquirido e innato hiperactivo. Fue importante para este resultado la observación de que T1/receptor 4 de la interleuquina 1 está significativamente correlacionado con los niveles séricos de IL-10 en estudios realizados en cohortes de pacientes.

40 Los resultados indican que los pacientes con la EPOC muestran un aumento del recambio apoptótico y la liberación de ccCK-18 y complejos histona-ADN al torrente circulatorio sistémico. También se encontró un aumento de T1/receptor 4 de la interleuquina-1 soluble en pacientes con la EPOC en estadios I y II en comparación con fumadores sanos. El aumento de los niveles de receptor 4 de la interleuquina-1 antiinflamatoria en los cuatro estadios de la EPOC puede ser un posible bucle de retroalimentación negativo para controlar la respuesta inflamatoria crónica. Además se pudo demostrar que la ICE soluble se correlaciona significativamente con antecedentes de tabaquismo (paquetes-años) lo que indica el desencadenamiento de la inflamación debido a sustancias inhalantes nocivas. Los marcadores séricos identificados sirven para identificar a los pacientes en riesgo de desarrollo y progresión de la EPOC.

50 EJEMPLO 2:

Material y procedimientos

55 Pacientes

El conjunto de pacientes utilizado en este ejemplo es idéntico al conjunto de pacientes del ejemplo 1.

60 Proteínas de choque térmico 27, 60 y 70

Los niveles de HSP27, HSP60 y HSP70 se determinaron usando kits de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) adaptados para la cuantificación de la HSP intracelular (Douset IC, R&D Systems, EE. UU.). Placas de microvaloración de 96 pocillos se recubrieron durante la noche a 4^o C con el anticuerpo de captura a una concentración de 1 μ g/ml. Después de bloquear las placas, se añadieron a los pocillos muestras de suero y proteínas patrón en diferentes concentraciones. Tras una etapa de lavado, se añadió anticuerpo marcado con biotina a cada pocillo y se incubó durante 1 hora. Las placas se lavaron y se añadió estreptavidina-HRP. La reacción de

color se consiguió usando tetrametilbencidina (TMB; Sigma, EE. UU.) y se detuvo mediante la adición de una solución de parada ácida. La densidad óptica se determinó a 450 nm en un lector de ELISA.

Proteína de choque térmico 90 alfa

5 Los niveles séricos de HSP90 alfa se midieron con un kit de ELISA listo para usar disponible en el mercado (Stressgen, EE. UU.). Brevemente, las muestras de suero y los patrones se incubaron en placas de microvaloración de 96 pocillos con anticuerpo HSP90 antihumano. Tras una etapa de lavado, se añadió anticuerpo anti-HSP90 conjugado con HRP y las placas se incubaron durante 24 horas. Las placas se lavaron y se añadió sustrato TMB. El desarrollo de color se detuvo mediante una solución de parada ácida y se determinó la densidad óptica a 450 nm. La cantidad de proteína en cada muestra se calculó según una curva patrón de valores de densidad óptica obtenida a partir de niveles conocidos de HSP90. Se determinó que la sensibilidad del ELISA era de 50 pg/ml, el fabricante estableció que la variabilidad intraensayo era de menos del 10%.

15 *Proteosoma 20S*

Las placas de microvaloración se incubaron durante la noche a 4^o C con anticuerpo monoclonal frente a la subunidad $\alpha 6$ del proteosoma 20S (Biomol, EE. UU.). Las placas se lavaron y bloquearon durante 1 hora con BSA al 1% en solución salina tamponada con fosfato. Se añadieron las muestras de suero y diferentes concentraciones de una proteína patrón (Biomol), a continuación, las placas se sellaron e incubaron durante 24 horas a 4^o C. Se añadió un anticuerpo policlonal de conejo frente a las subunidades α/β del proteosoma 20S (Biomol) que servía como anticuerpo de detección y, después de una etapa de lavado, las placas se incubaron con un anticuerpo de burro anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, Reino Unido) durante otras 2 horas. La tetrametilbencidina se usó como sustrato de color. La reacción se detuvo añadiendo ácido sulfúrico 1 N. Las placas se leyeron a 450 nm usando un contador Wallac Multilabel 1420 (PerkinElmer, EE. UU.).

Interleuquina -6

30 Los niveles séricos de IL-6 se determinaron mediante un kit de ELISA comercial (BenderMedSystems, Austria). Los ensayos se realizaron según las instrucciones de fabricación. Las placas se leyeron a 450 nm en un lector de ELISA, y el contenido en IL-6 se calculó comparando los valores de densidad óptica de las muestras con los valores de densidad óptica de concentraciones de IL-6 conocidas.

Métodos estadísticos

35 Se usó el software SPSS (SPSS Inc., EE. UU.) para calcular todos los resultados. Se consideró que un valor $p < 0,05$ era estadísticamente significativo. Se realizaron comparaciones por pares entre grupos usando la prueba U de Mann-Whitney. Las correlaciones se calcularon usando el coeficiente de correlación de Spearman.

40 Resultados

HSP27

45 Los niveles séricos de HSP27 eran de 2042,57 pg/ml [1599,58-2485,57] (media [intervalo de confianza del 95%]) en controles sanos, 2199,64 [1641,52-2757,75] en fumadores sanos, 2862,62 [2280,49-3444,74] en la EPOC en estadios GOLD I-II y 3717,58 [3079,35-4355,81] en la EPOC en estadios GOLD III-IV. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles sanos y la EPOC en estadios I-II ($p=0,025$), controles sanos y la EPOC en estadios III-IV ($p<0,001$), fumadores sanos y la EPOC en estadios III-IV ($p = 0,001$) y la EPOC en estadios I-II y la EPOC en estadios III-IV ($p<0,001$) (fig. 7a).

HSP60

50 Los niveles séricos de HSP60 eran de 1836,69 pg/ml [153,30-3520,08] en controles sanos, 4378,40 [-3851,48-12608,28] en fumadores sanos, 3497,42 [-1561,38-8556,23] en la EPOC en estadios GOLD I-II y 531,81 [132,57-931,05] en la EPOC en estadios GOLD III-IV. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (fig. 7b).

HSP70

60 Los niveles séricos de HSP60 eran de 140,50 pg/ml [67,97-213,04] en controles sanos, 108,50 [43,30-173,69] en fumadores sanos, 454,29 [327,05-581,52] en la EPOC en estadios GOLD I-II y 437,92 [143,41-732,42] en la EPOC en estadios GOLD III-IV. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles sanos y la EPOC en estadios I-II ($p<0,001$), controles sanos y la EPOC en estadios III-IV ($p = 0,009$), fumadores sanos y la EPOC en estadios III-IV ($p<0,001$) y fumadores sanos y la EPOC en estadios III-IV ($p<0,001$) (fig. 7c).

HSP90 alfa

Los niveles séricos de HSP90 alfa eran de 13 133,78 pg/ml [9791,40-16 476,15] en controles sanos, 12 827,91 [10 838,21-14 817,62] en fumadores sanos, 17 884,50 [13 307,14-22 461,85] en la EPOC en estadios GOLD I-II y 17 273,02 [12 573,96-21 972,08] en la EPOC en estadios GOLD III-IV. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre controles sanos y la EPOC en estadios I-II ($p = 0,025$) y controles sanos y la EPOC en estadios III-IV ($p = 0,049$) (fig. 7d).

Proteosoma 20S

Los niveles séricos de proteosoma 20S eran de 194,78 ng/ml [164,94-224,62] en controles sanos, 188,25 [159,26-217,25] en fumadores sanos, 172,33 [133,78-210,88] en la EPOC en estadios GOLD I-II y 187,50 [145,54-229,46] en la EPOC en estadios GOLD III-IV. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (fig. 7e).

Interleuquina -6

Los niveles séricos de IL-6 eran de 5,18 pg/ml [0,17-10,19] en controles sanos, 1,65 [-0,11-3,42] en fumadores sanos, 7,14 [1,19-13,09] en la EPOC en estadios GOLD I-II y 2,99 [0,99-5,00] en la EPOC en estadios GOLD III-IV. Se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre fumadores sanos y la EPOC en estadio I-II ($p = 0,017$).

Correlaciones y modelos de regresión

Las correlaciones entre las HSP, VEF₁%CV e IL6 se presentan en las figuras 8a a 8d. En modelos de regresión logística unifactorial incluyendo solo fumadores sanos y pacientes con la EPOC, HSP27 presentaba un área bajo la curva (AUC) en la curva de característica operativa del receptor (ROC) de 0,763 (0,624 - 0,902: IC del 95%; $p = 0,004$) y HSP70 mostró un AUC de 0,885 (0,786 - 0,983: IC del 95%; $p < 0,001$). Ninguna de las demás variables mostró resultados significativos en los análisis de regresión logística unifactorial (fig. 9).

Conclusión:

Los pacientes que padecen enfermedad pulmonar obstructiva crónica presentan inflamación progresiva de las vías respiratorias bronquiales, vías respiratorias pequeñas y parénquima pulmonar. Las biopsias pulmonares mostraron infiltración masiva del tejido peribronquial con neutrófilos, macrófagos y linfocitos como parte del sistema inmune innato y adquirido. Se considera que la activación de estas células lleva a la remodelación del tejido pulmonar. El proceso progresivo lento de la remodelación del tejido va acompañado por una cantidad significativa de destrucción celular. En la EPOC, se piensa que tanto los factores endógenos como neutrófilos y células T citotóxicas, así como estímulos exógenos como el humo del tabaco, contribuyen a la destrucción del tejido. Sin embargo, dejar de fumar no altera la insuficiencia de la respuesta inflamatoria.

La inducción de las señales inflamatorias y el aumento del recambio celular tienen como resultado la regulación por incremento de las proteínas de choque térmico intracelulares y un aumento de la liberación al ambiente extracelular. En este ejemplo pudo demostrarse un aumento significativo de HSP27 en muestras de suero obtenidas del flujo de sangre periférica de pacientes que padecían la EPOC en comparación con fumadores sanos. HSP27 funciona como mecanismo de reparación que tiene como objetivo la estabilidad y el correcto plegamiento postraduccional de proteínas intracelulares así como la prevención de la muerte celular apoptótica. Se notificaron niveles séricos elevados de HSP27 en trastornos inflamatorios como el síndrome coronario agudo y la nefropatía crónica de trasplante. La expresión de HSP27 se induce de forma transitoria como respuesta a acontecimientos de estrés. La finalización del desencadenamiento agudo tiene como resultado una regulación por disminución inmediata de las concentraciones HSP27 a niveles normales. Por tanto, HSP27 se regula por incremento solo cuando se requieren sus propiedades citoprotectoras. De manera interesante, los resultados mostraron un aumento continuo de las concentraciones séricas de HSP27 con la intensidad de la enfermedad y una fuerte correlación con IL-6 proinflamatoria sérica. Este efecto puede ser debido a un aumento de la devastación del tejido específicamente en los estadios tardíos de la EPOC y la extensión de la enfermedad inflamatoria a otros sistemas orgánicos dando lugar a un derramamiento sistémico de HSP27 dentro del lecho vascular. HSP27 actúa generalmente como mediador antiapoptótico y puede considerarse un inmunodepresor endógeno que tiene por objeto controlar la inflamación excesiva en el ámbito clínico de la EPOC. Adicionalmente, el contenido sérico de HSP27 mostraba alta sensibilidad y especificidad para determinar la aparición de la EPOC en un modelo de regresión logística.

El papel de la HSP60 extracelular no ha sido bien definido. Los datos proporcionados en este documento no proporcionan ningún soporte a que la HSP60 sea un elemento clave en la patogénesis de la EPOC. Las concentraciones séricas de HPS60 no se correlacionaba con los niveles de otras HSP.

Los niveles séricos de HSP70 estaban elevados en los pacientes en estadios GOLD inicial y tardío de la EPOC. Se mostró un aumento de cuatro veces en el grupo GOLD I-II en comparación con fumadores no sintomáticos. HSP70 es una molécula carabina intracelular que se libera al espacio extracelular tras la muerte celular o mediante diversas

- rutas de secreción. Se ha comunicado que la HSP70 extracelular activa células del sistema inmune innato y adquirido y estimula la producción de citoquinas. Se encontró un aumento en las concentraciones de HSP70 soluble en muestras de la EPOC. Los valores máximos en el grupo de la EPOC en estadios I-II indican un enorme estado de activación inmune principalmente en los estadios iniciales de la enfermedad. Adicionalmente, los niveles de HSP70
- 5 se correlacionaban significativamente con los niveles de HSP27, HSP90 alfa e IL-16 y son, por tanto, parte de la «señal de peligro» sistémico que acompaña a la activación inmune en la EPOC. Adicionalmente, el contenido sérico de HSP27 mostraba alta sensibilidad y especificidad para determinar la aparición de la EPOC en un modelo de regresión logística.
- 10 La HSP90 alfa soluble estaba regulada por incremento de forma significativa en el torrente sanguíneo periférico en los grupos con la EPOC en comparación con sujetos sanos no fumadores. Se han descrito previamente niveles elevados de HSP90 alfa en injerto de derivación aortocoronaria con bomba y en la cicatrización de heridas tras la hipoxia. La HSP90 también se caracterizó como factor central en la presentación de antígeno a linfocitos T a través de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHCII). Como resumen de los datos, se
- 15 concluye que los niveles elevados de HSP90 alfa extracelular en la EPOC son un estimulante esencial del sistema inmune adquirido, desencadenando una posible respuesta autorreactiva a autoantígenos. Esta función de HSP90 alfa también puede cambiar la inmunogenicidad del antígeno asociado. Por tanto, HSP90 alfa tiene efectos inmunomoduladores a través de la presentación cruzada de péptidos asociados en el contexto de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad.
- 20 El contenido sérico extracelular del proteosoma 20S no disminuía ni aumentaba estadísticamente en las cohortes del estudio investigadas. Los niveles permanecían por debajo de 200 ng/ml en todos los grupos y parecían tener una importancia secundaria en la progresión de la EPOC.
- 25 En resumen, se mostraron concentraciones séricas elevadas de proteínas de choque térmico 27, 70 y 90 alfa moduladores inmunes solubles en pacientes con la EPOC. Este derramamiento en el lecho vascular está causado al menos parcialmente por la activación continua del sistema inmune en el deterioro de la EPOC a través de mecanismos desencadenantes endógenos y exógenos. Adicionalmente, HSP27 y HSP70 mostraron tendencias estadísticas excelentes para servir como marcadores diagnósticos para la detección de la obstrucción de las vías
- 30 respiratorias en estados iniciales de la EPOC.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para el diagnóstico de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto humano que comprende las etapas de:
- 5 - determinar la cantidad de proteína de choque térmico 27 (HSP27) en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto humano,
- 10 - diagnosticar la EPOC cuando la cantidad de HSP27 está aumentada en comparación con la cantidad de HSP27 en sujetos humanos sanos.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que además se determina la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, proteína de choque térmico 70 (HSP70) y/o proteína de choque térmico 90 alfa (HSP90 alfa), en el que se diagnostica la EPOC cuando la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, HSP70 y/o HSP90 alfa está aumentada en comparación con la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, HSP70 y/o HSP90 alfa en sujetos humanos sanos.
- 15
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, proteína de choque térmico 27 (HSP27), proteína de choque térmico 70 (HSP70) y/o proteína de choque térmico 90 alfa (HSP90 alfa) se determina mediante un inmunoensayo seleccionado a partir de grupo que consiste de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) e inmunotransferencia.
- 20
4. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, caracterizado por que la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1 en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila preferiblemente entre 50 y 150 pg/ml, preferiblemente entre 60 y 140 pg/ml, más preferiblemente entre 70 y 130 pg/ml.
- 25
5. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, caracterizado por que la cantidad de fragmento de ADN asociado a histonas en muestras de sangre de un sujeto humano sano es del 20 al 50% menor, preferiblemente del 25 al 40% menor, que en muestras de sangre de un sujeto humano que padece la EPOC.
- 30
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que la cantidad de proteína de choque térmico 27 (HSP27) en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila entre 1500 y 2000 pg/ml, preferiblemente entre 1600 y 2400 pg/ml, más preferiblemente entre 1700 y 2300 pg/ml.
- 35
7. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, caracterizado por que la cantidad de proteína de choque térmico 70 (HSP70), en muestras de sangre de un sujeto humano sano oscila entre 50 y 200 pg/ml, preferiblemente entre 70 y 190 pg/ml, más preferiblemente entre 80 y 180 pg/ml.
- 40
8. Procedimiento según la reivindicación 2 o 3, caracterizado por que la concentración de proteína de choque térmico 90 alfa (HSP90 alfa), en una muestra de sangre de un sujeto humano sano oscila entre 10 000 y 15 000 pg/ml, preferiblemente entre 11 000 y 14 500 pg/ml, más preferiblemente entre 12 000 y 14 000 pg/ml.
- 45
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que se diagnostica la EPOC cuando la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa en la muestra está al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20%, aumentada en comparación con la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa en sujetos humanos sanos.
- 50
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que se diagnostica el riesgo de desarrollar la EPOC cuando la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa en la muestra está al menos el 10%, preferiblemente al menos el 20%, reducida en comparación con la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1, fragmento de ADN asociado a histonas, HSP27, HSP70 y/o HSP90 alfa en sujetos humanos sanos.
- 55
11. Procedimiento para discriminar entre la EPOC en estadios I/II y la EPOC en estadios III/IV en un sujeto humano que comprende las etapas de:
- 60 - determinar la cantidad de proteína de choque término 27 (HSP27) en una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto humano que padece la EPOC,
- 65 - diagnosticar la EPOC en estadios I/II cuando la cantidad de HSP27 está reducida en comparación con la cantidad de HPS27 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios III/IV, o
- diagnosticar la EPOC en estadios III/IV cuando la cantidad de HSP27 está aumentada en comparación con la

cantidad de HPS27 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios I/II.

- 5 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que además se determina la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1, citoqueratina-18 escindida por caspasas (ccCK-18), histonas y/o proteína de choque térmico 70 (HSP70), en el que se diagnostica la EPOC en estadios I/II cuando la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1 o HSP70 está aumentada en comparación con la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1 o HSP70 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios III/IV y/o cuando la cantidad de ccCK-18 o fragmento de ADN asociado a histonas está reducida en comparación con la cantidad de ccCK-18 o fragmento de ADN asociado a histonas determinado en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios III/IV,
- 10 o en el que se diagnostica la EPOC en estadios III/IV cuando la cantidad de receptor 4 de la interleuquina-1 o HSP70 está reducida en comparación con la concentración de receptor 4 de la interleuquina-1 o HSP70 determinada en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios I/II y/o cuando la cantidad de ccCK-18 o histonas está aumentada en comparación con la concentración de ccCK-18 o fragmento de ADN asociado a histonas determinado en una muestra de un sujeto humano que padece la EPOC en estadios I/II.

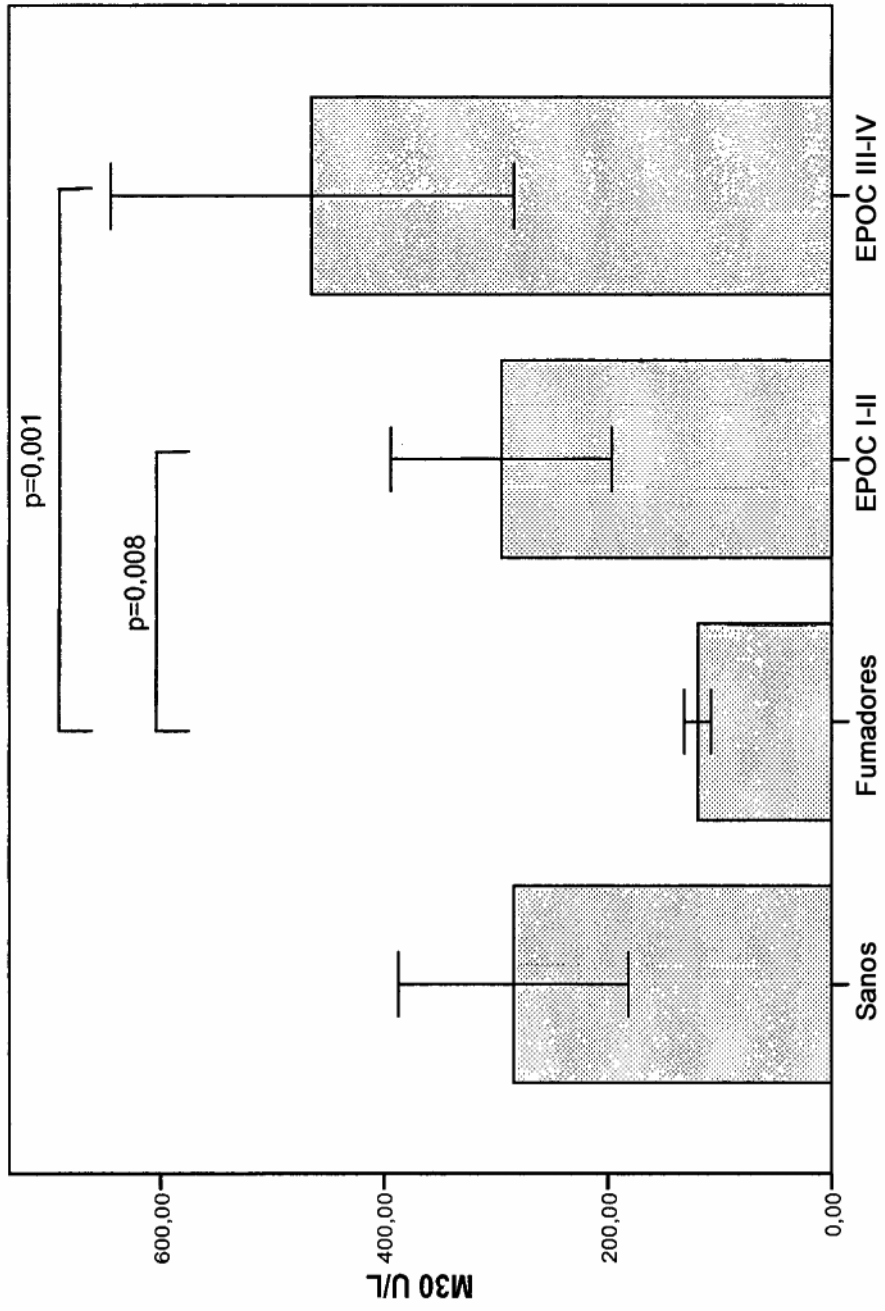


Fig. 1

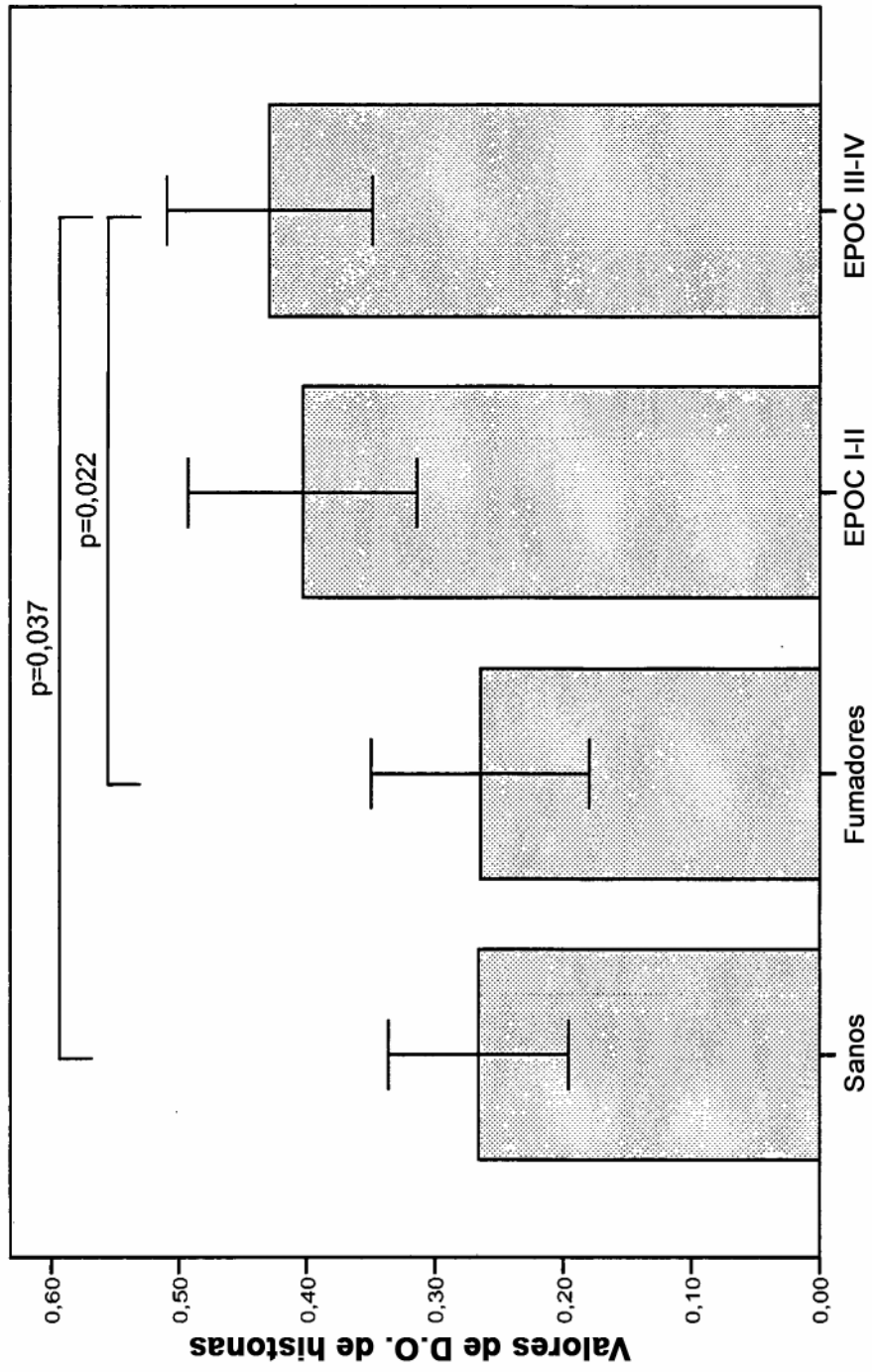


Fig. 2

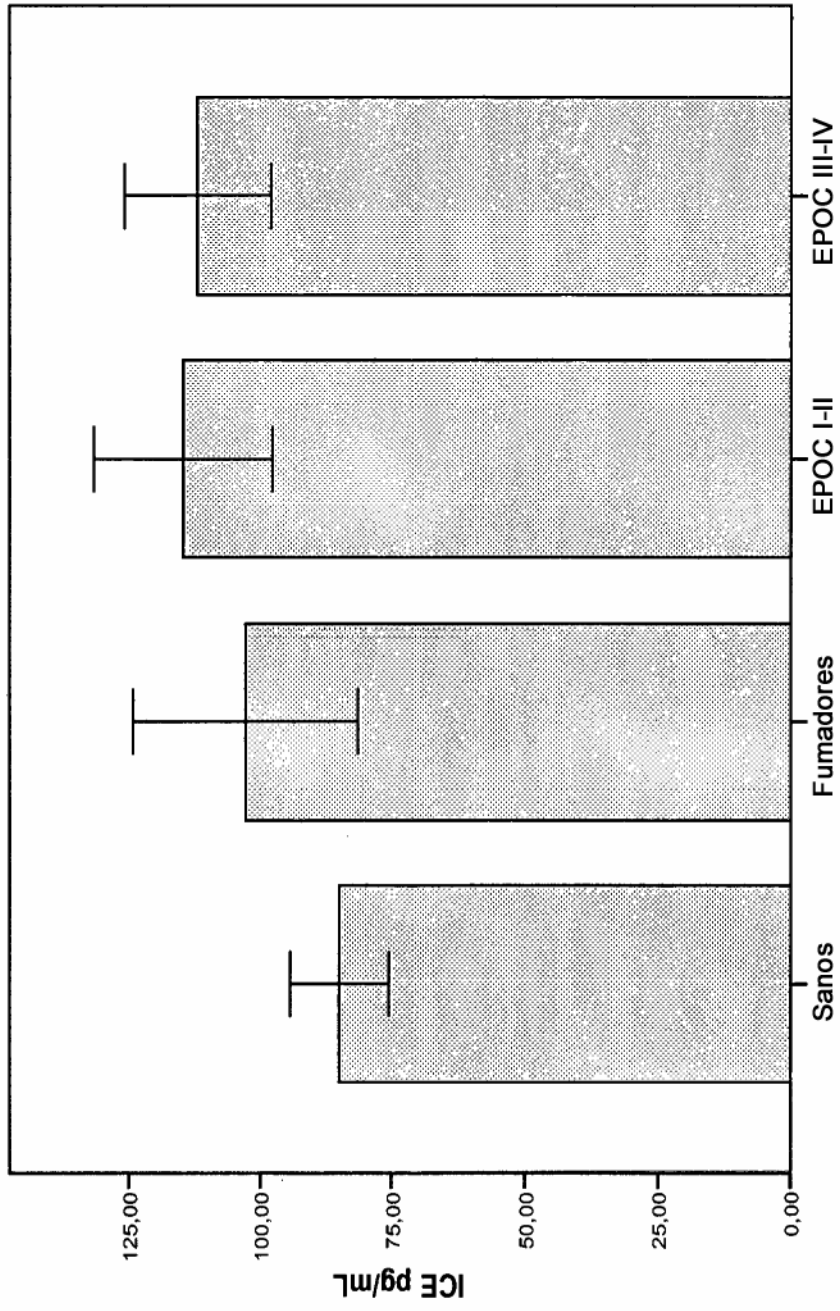


Fig. 3

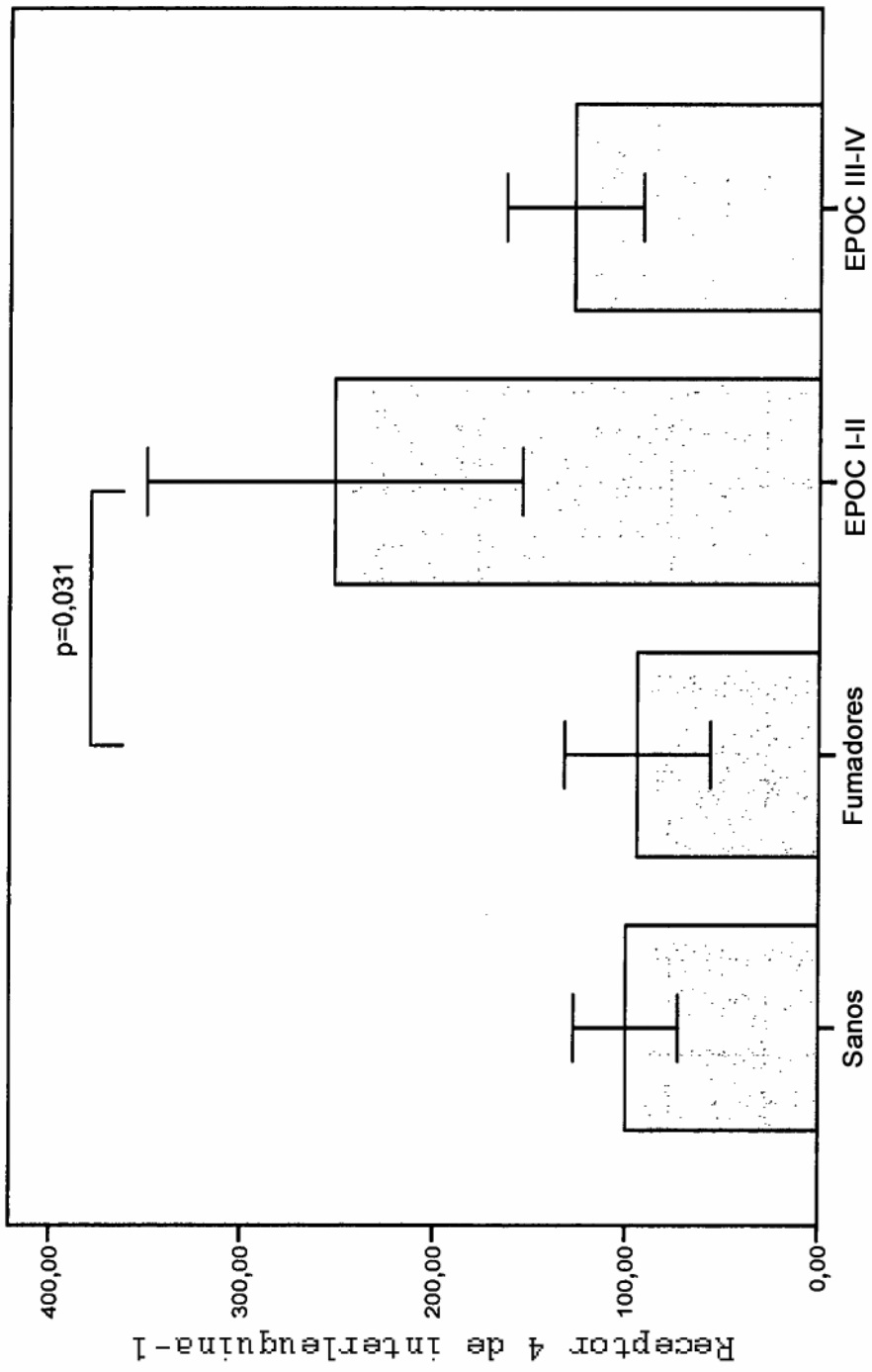


Fig. 4

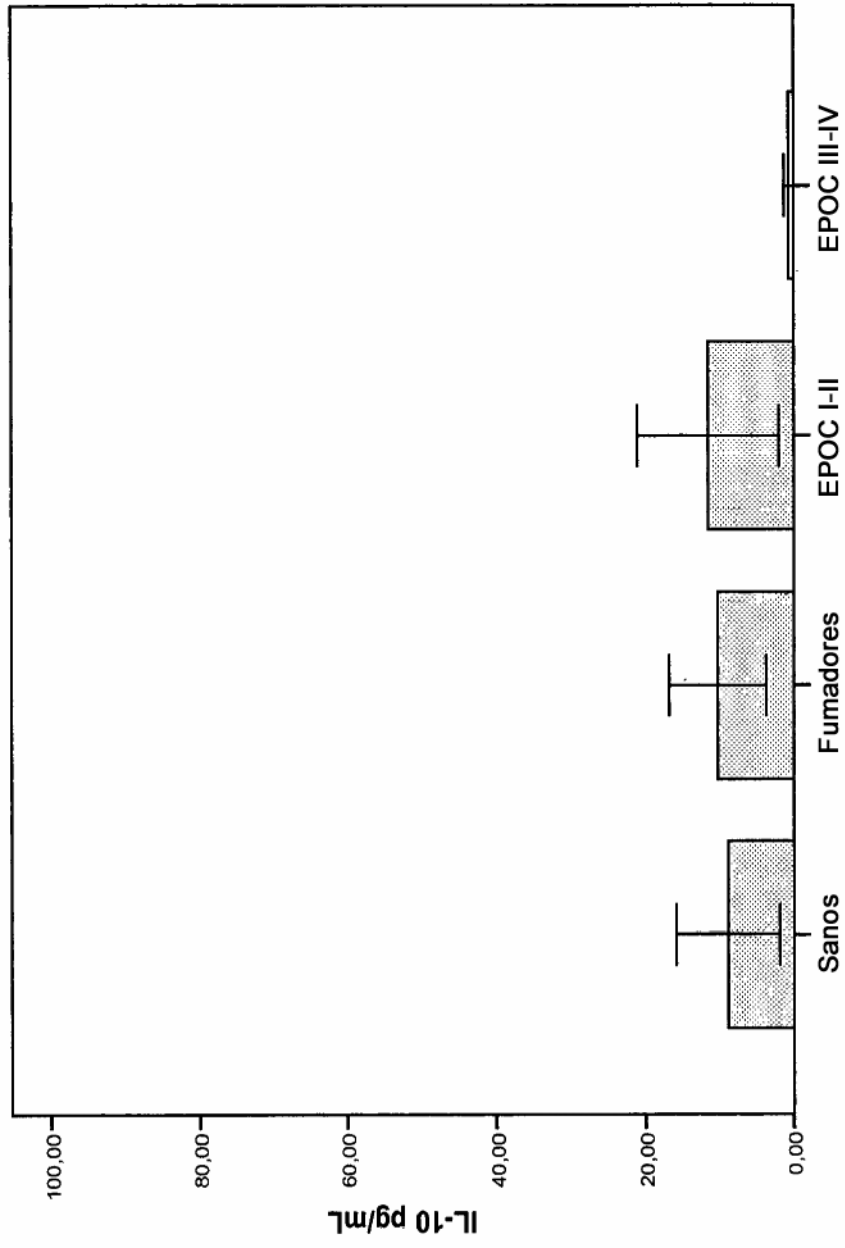


Fig. 5

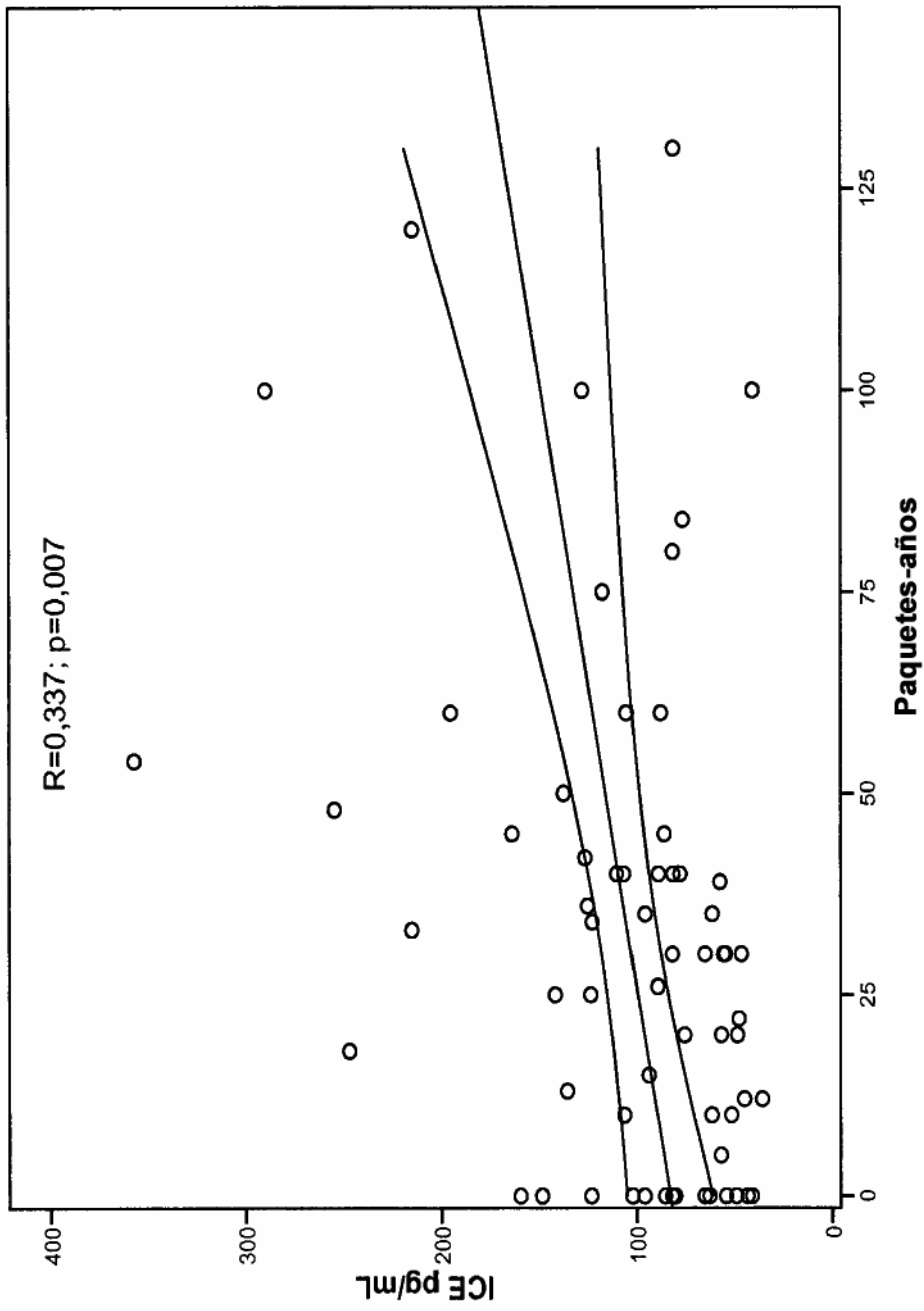


Fig. 6a

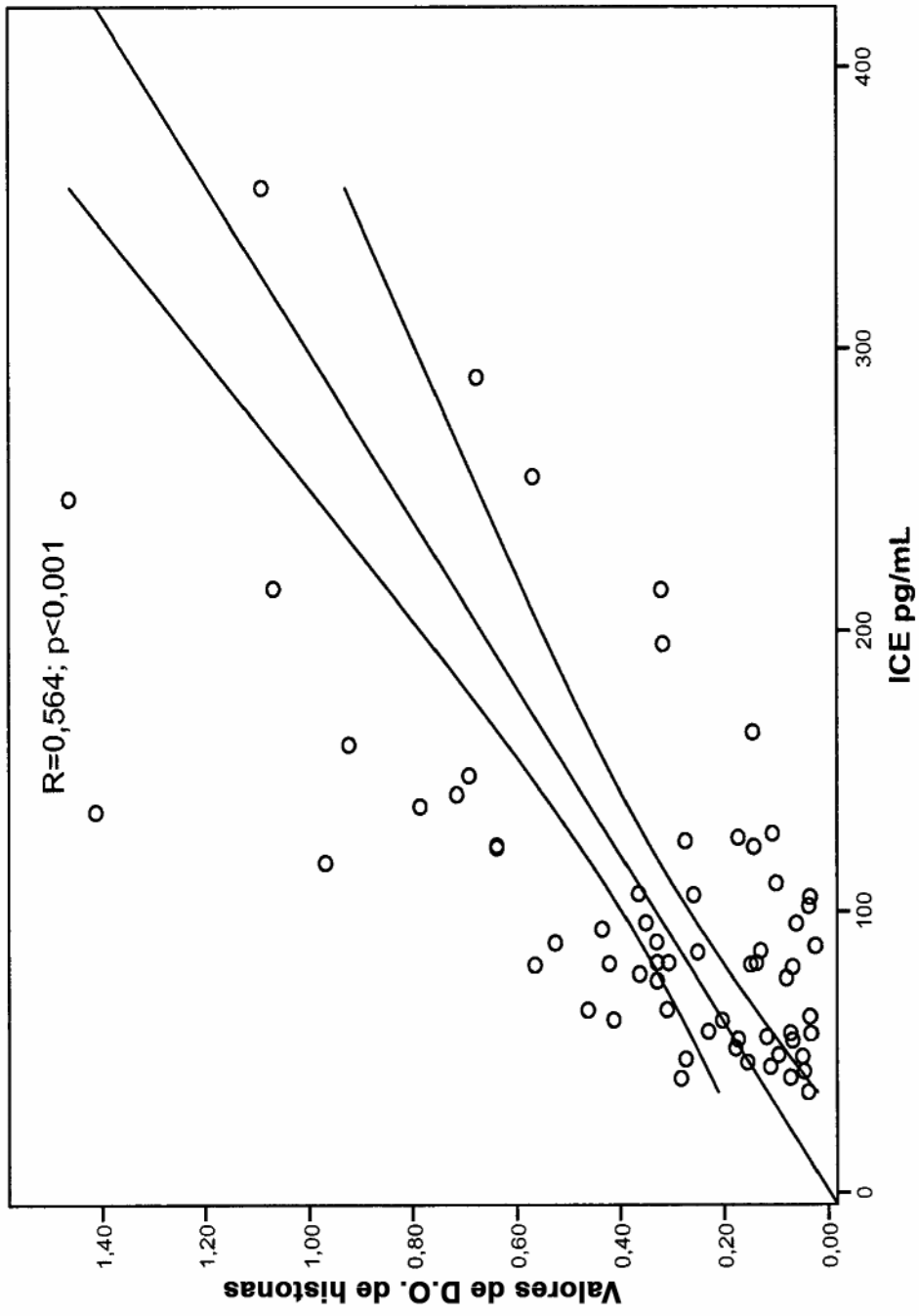


Fig. 6b

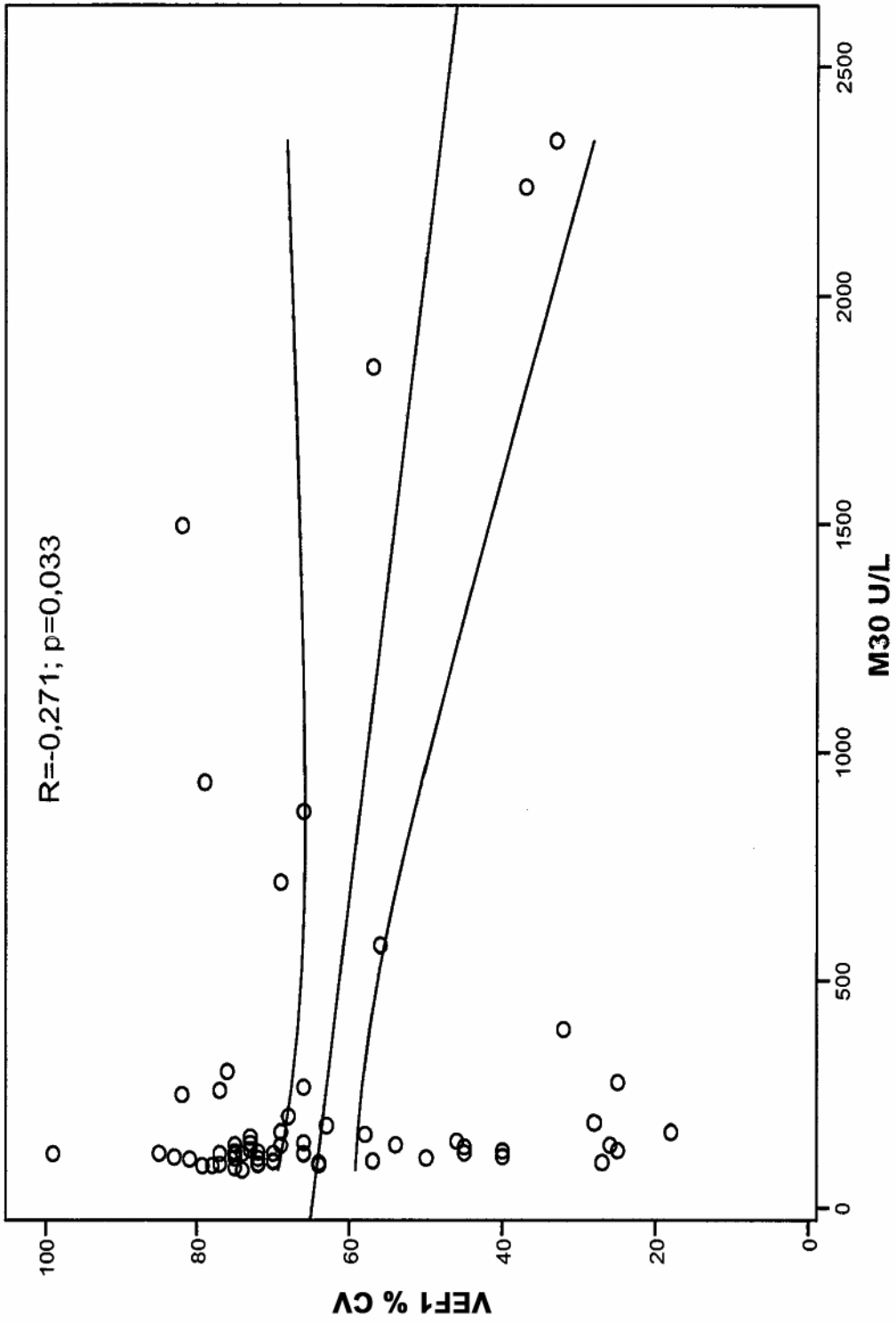


Fig. 6c

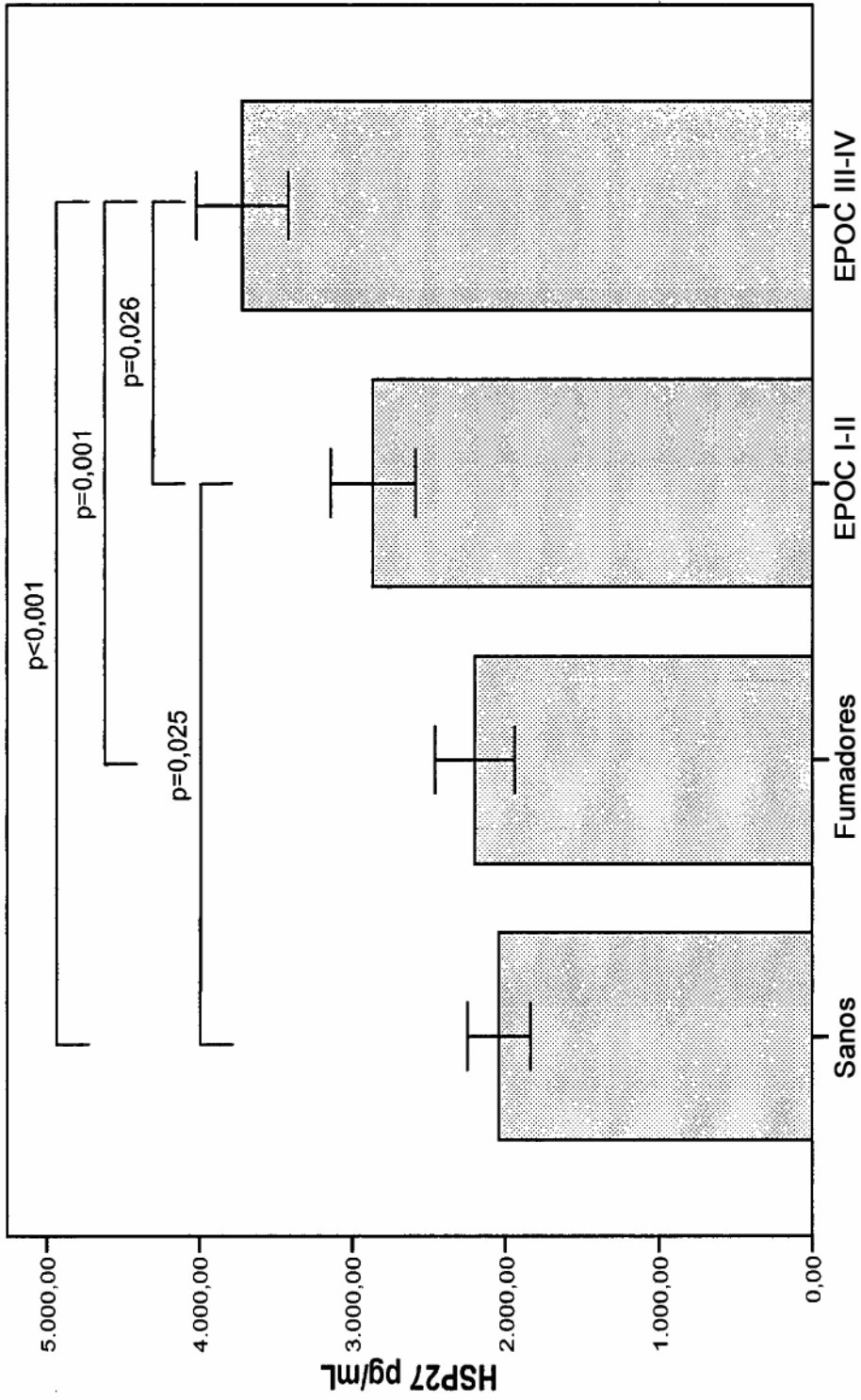


Fig. 7a

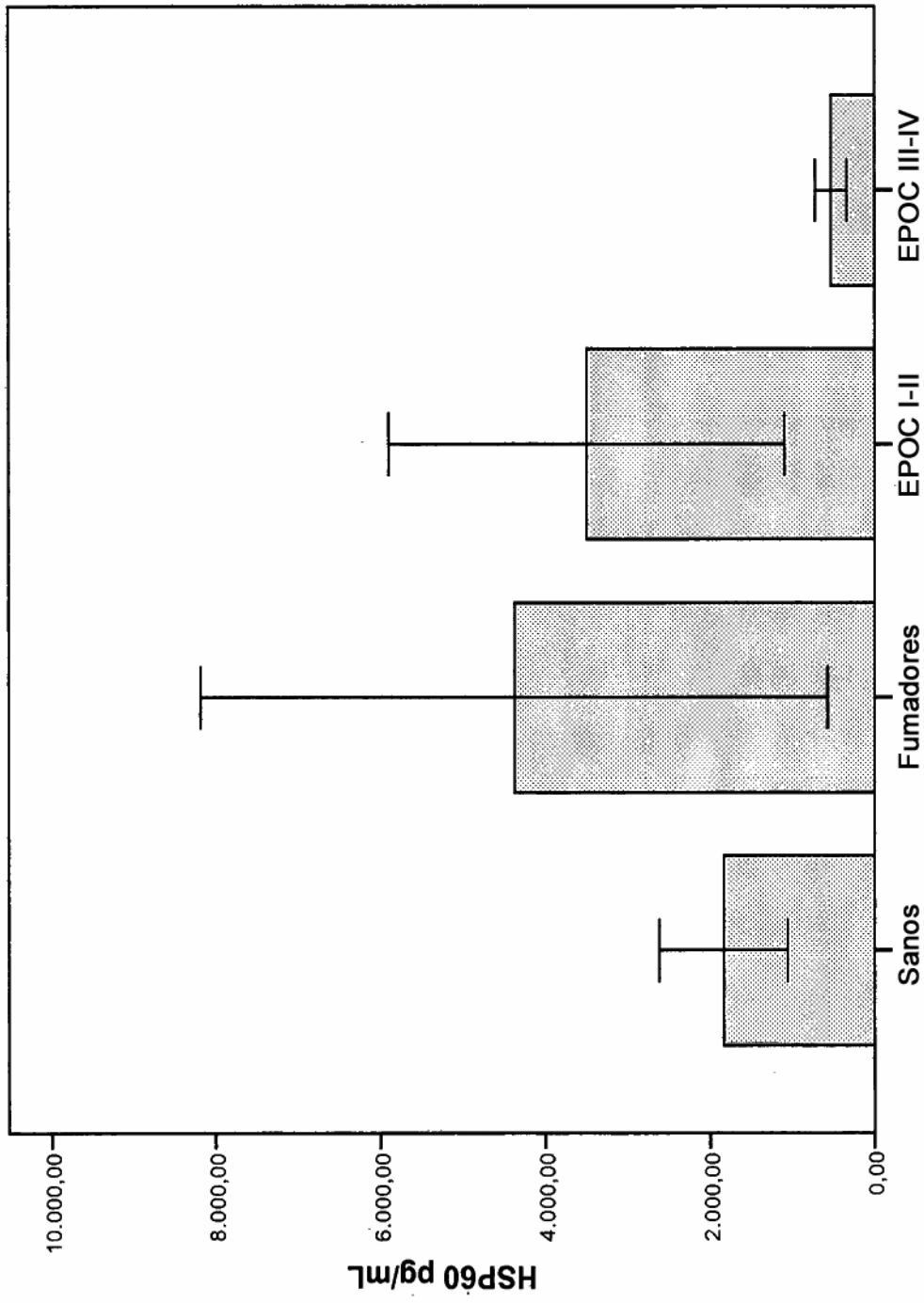


Fig. 7b

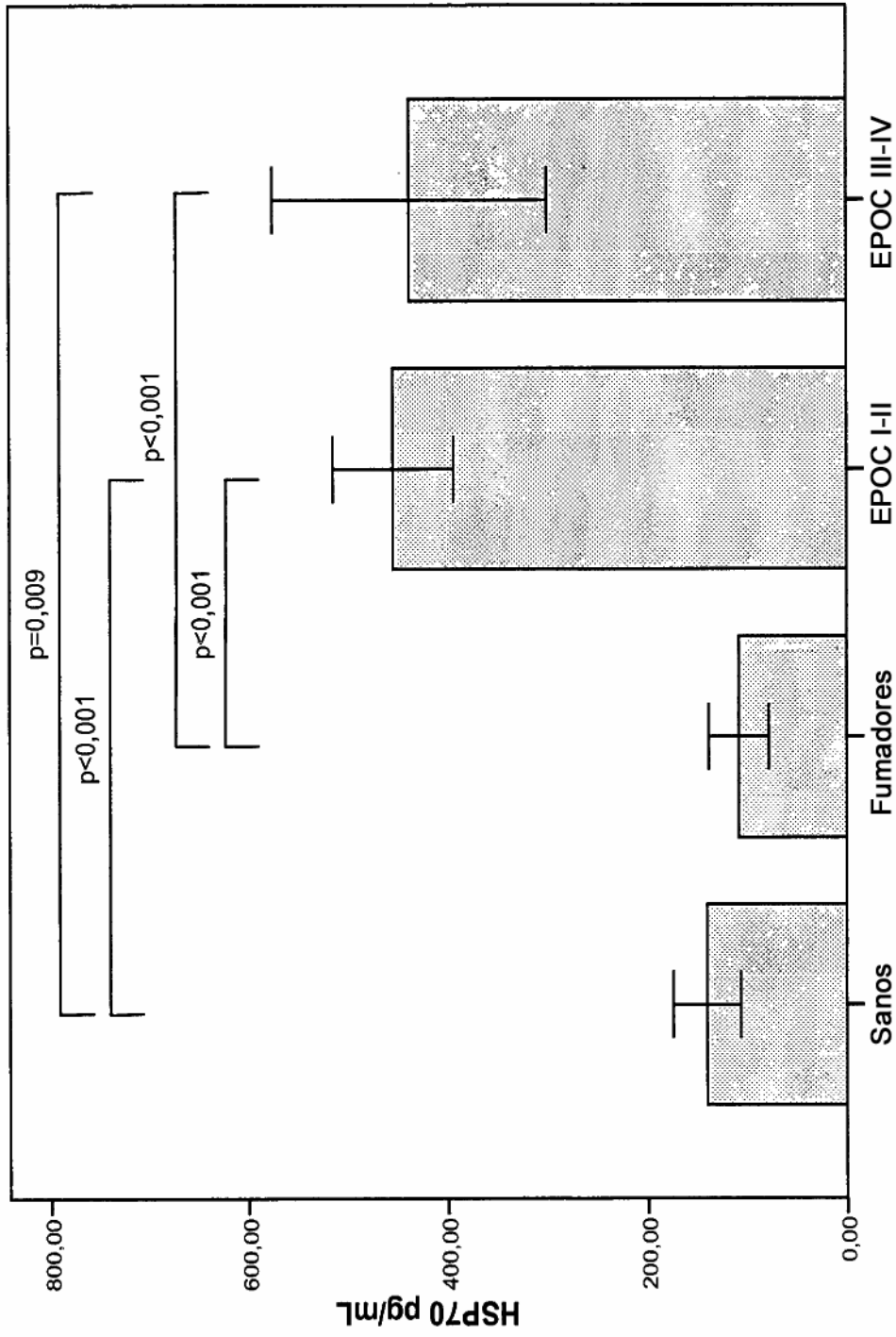


Fig. 7c

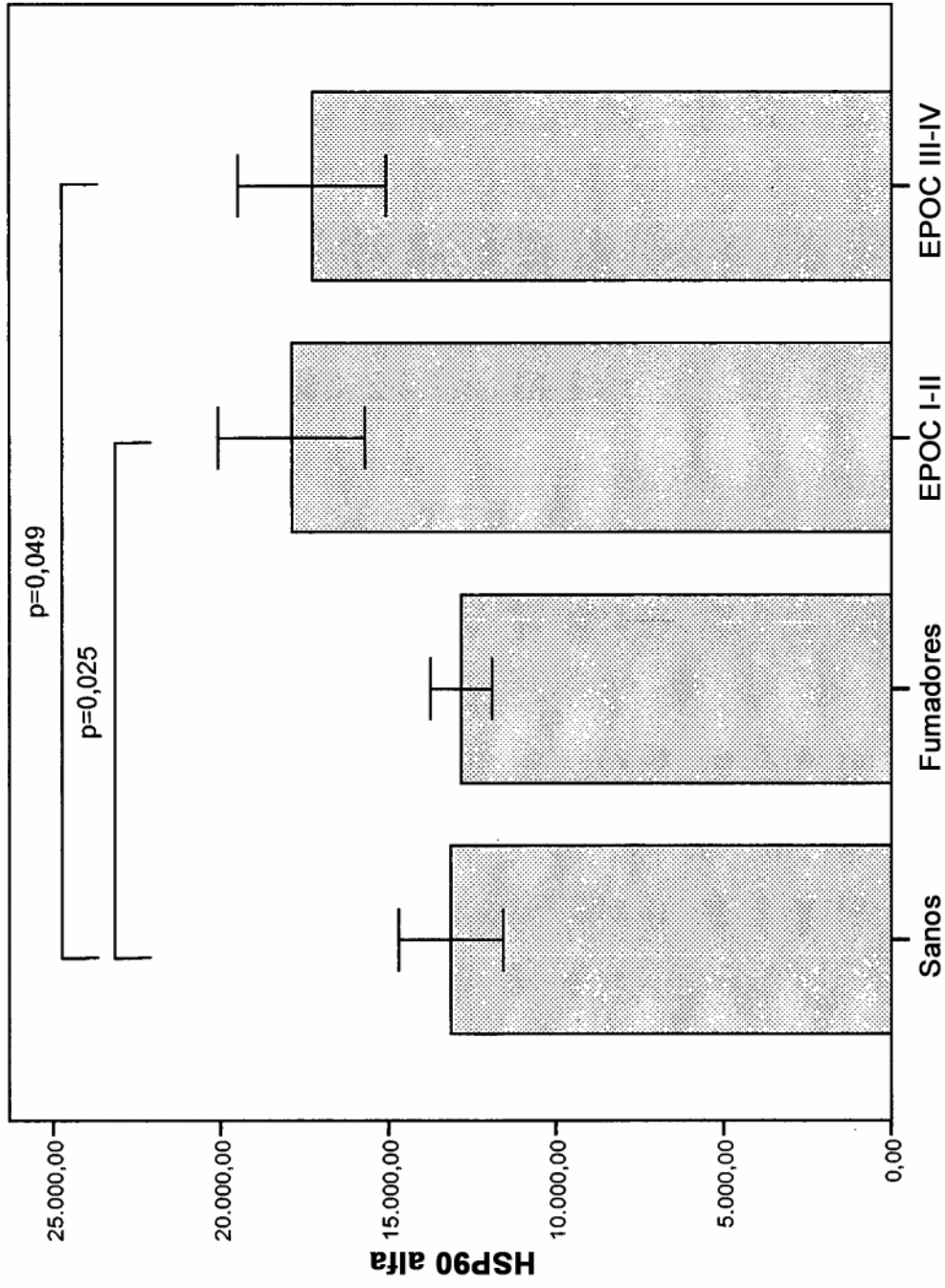


Fig. 7d

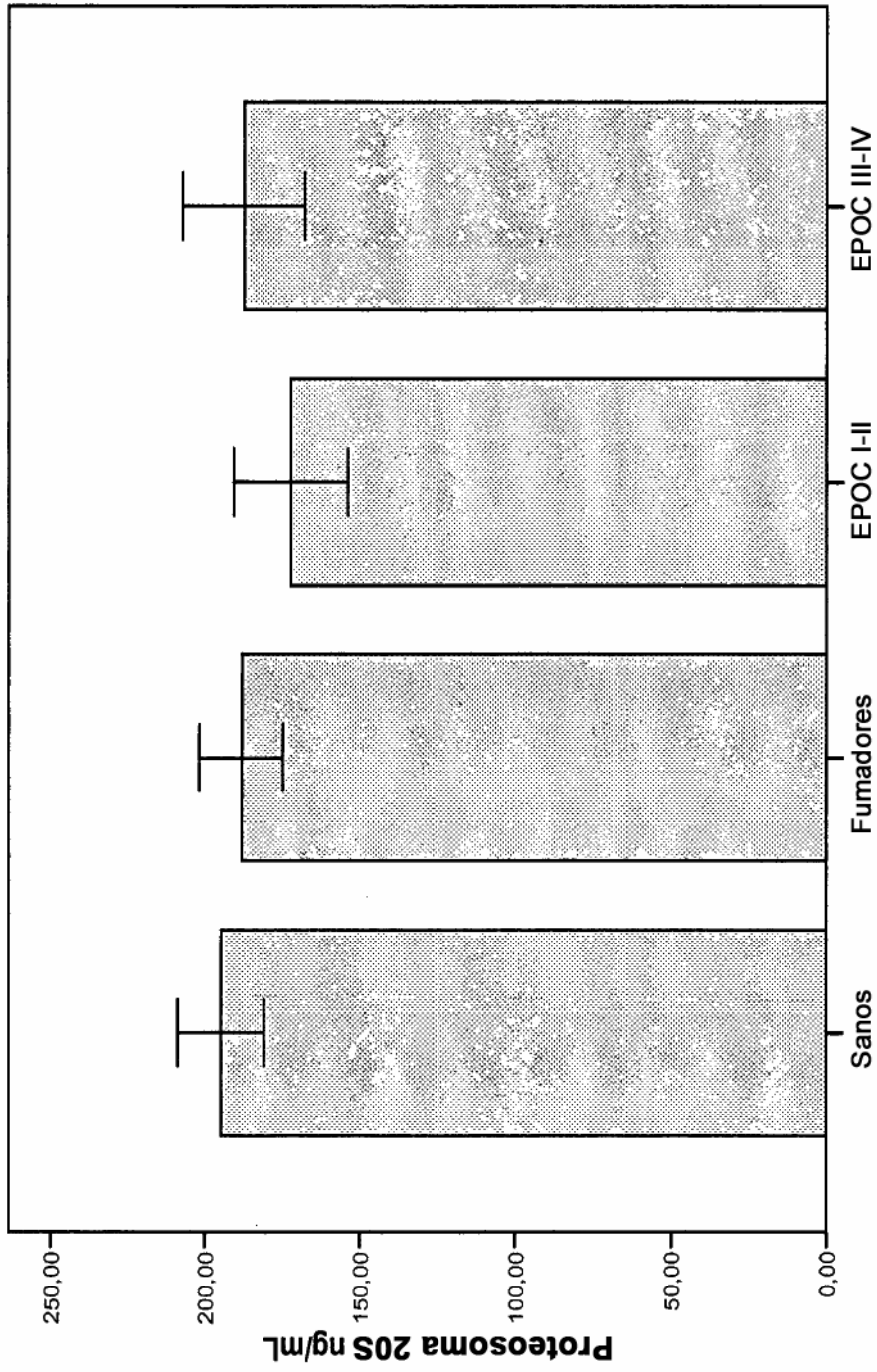


Fig. 7e

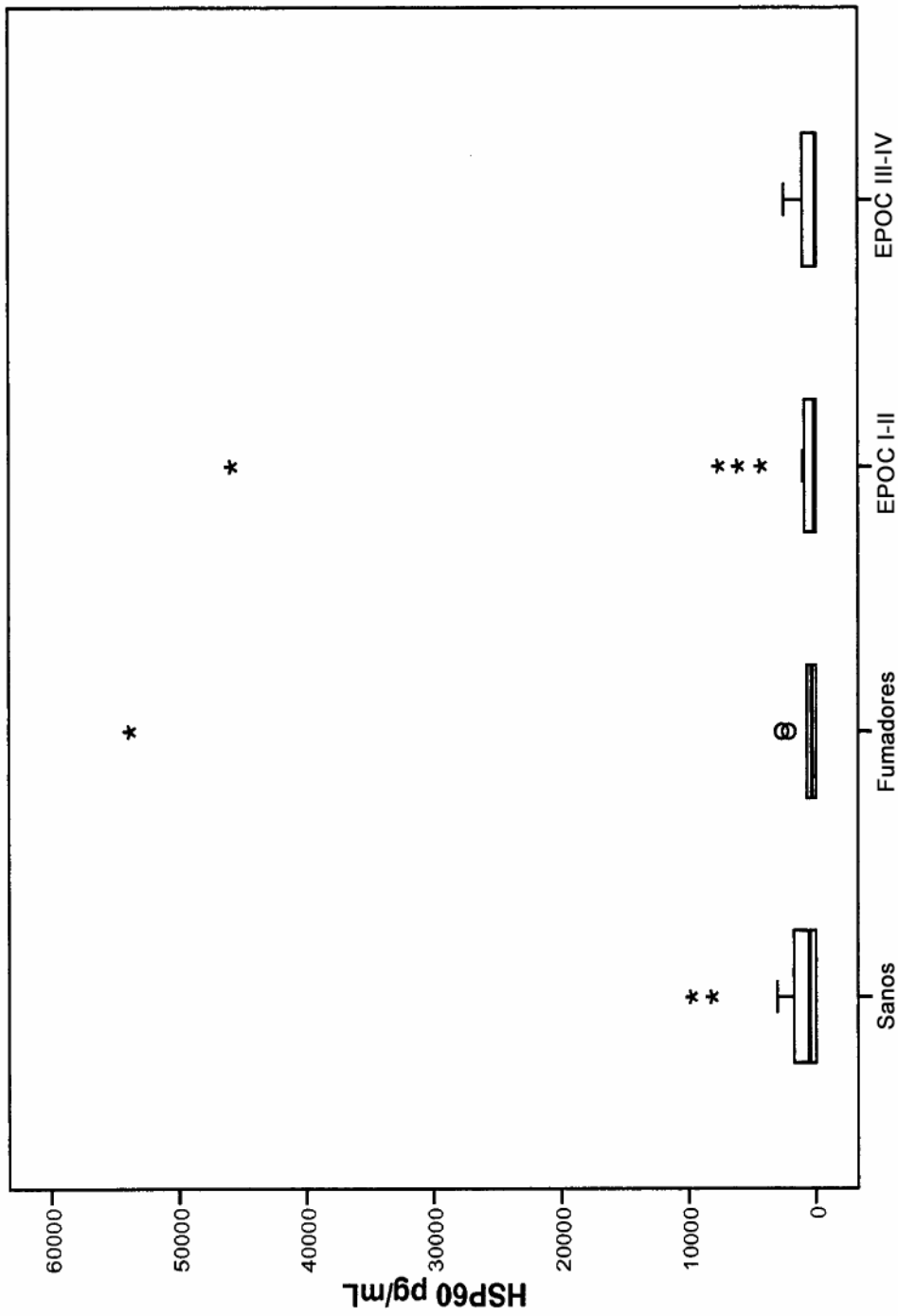


Fig. 7f

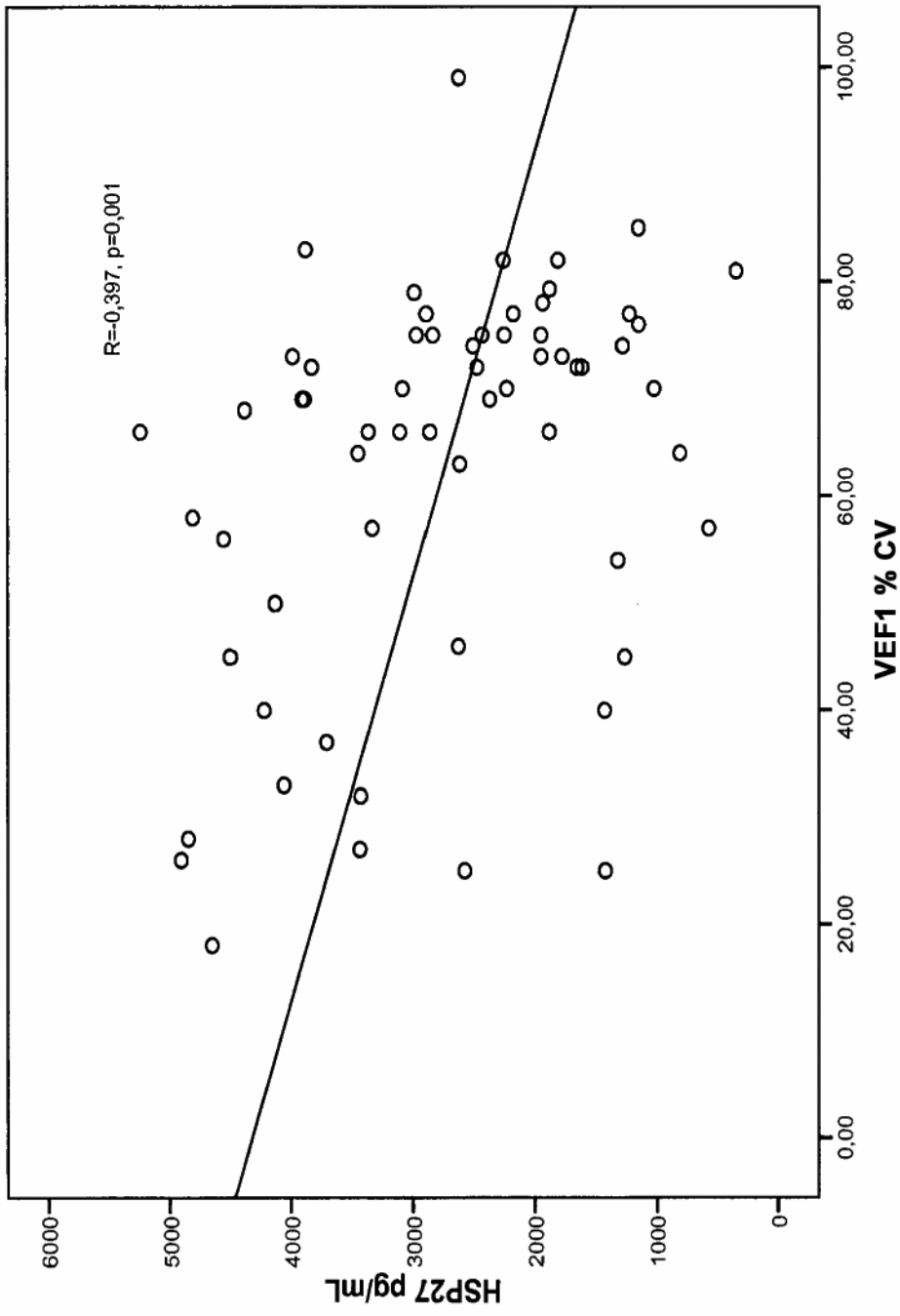


Fig. 8b

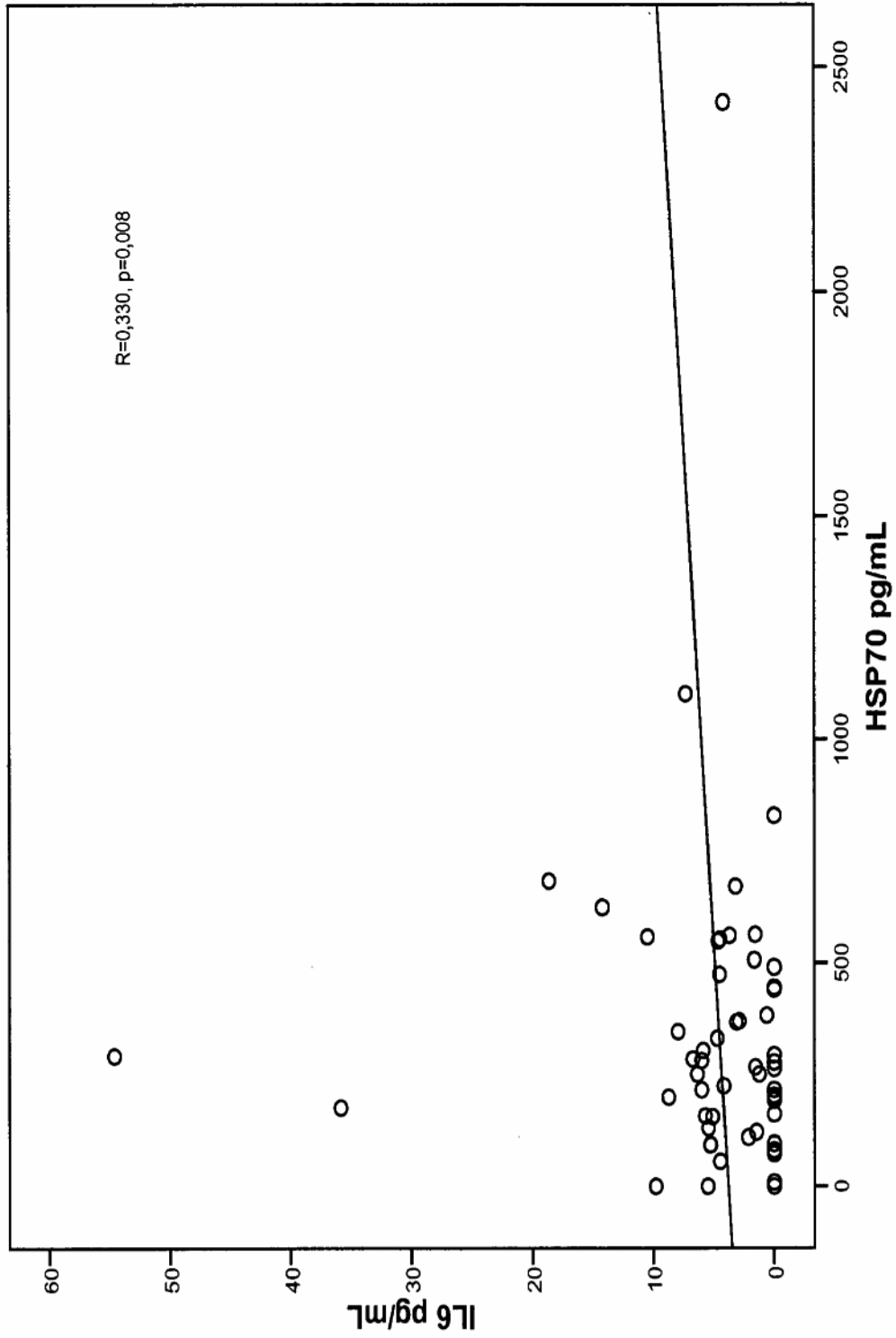


Fig. 8c

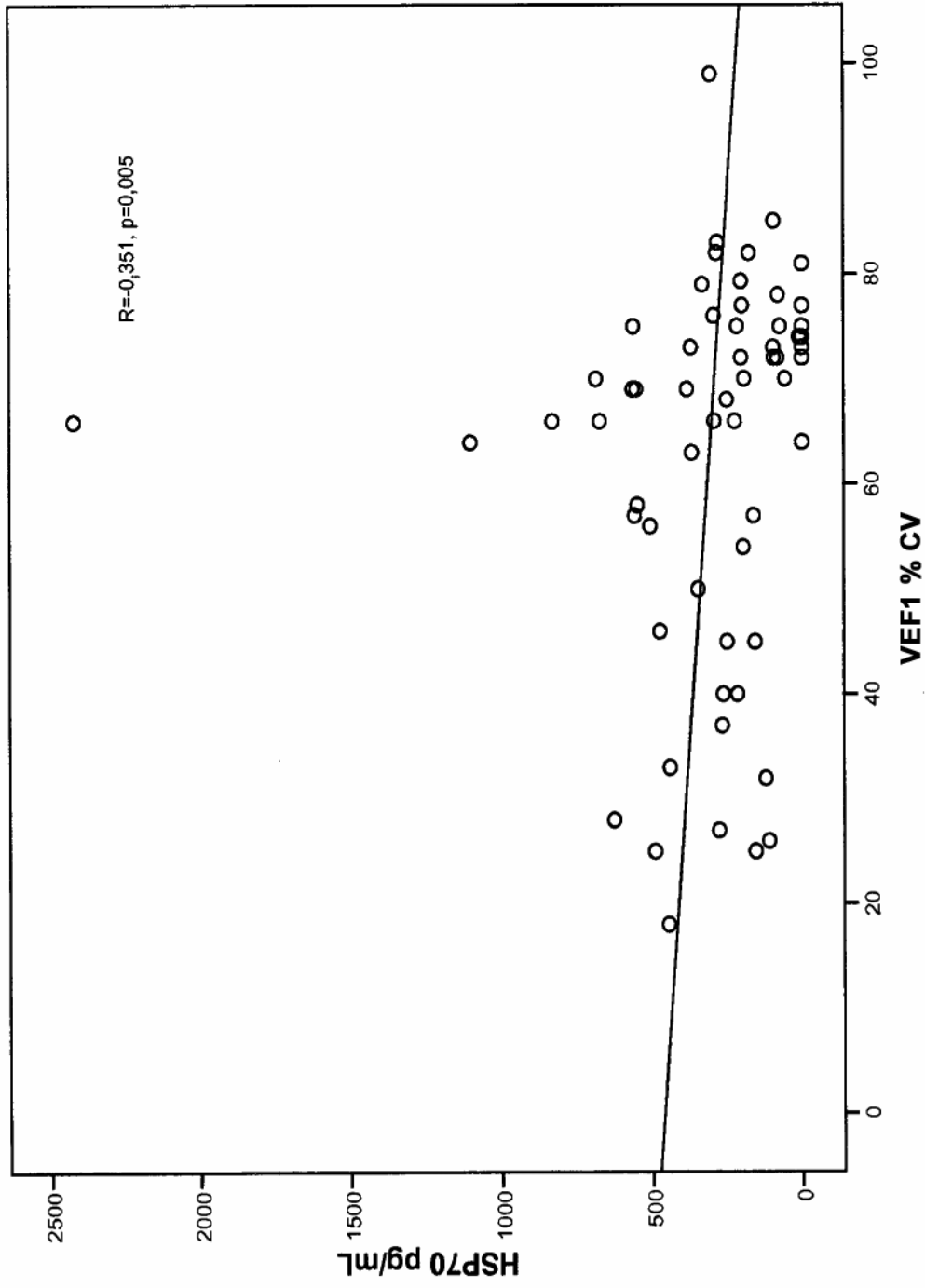


Fig. 8d

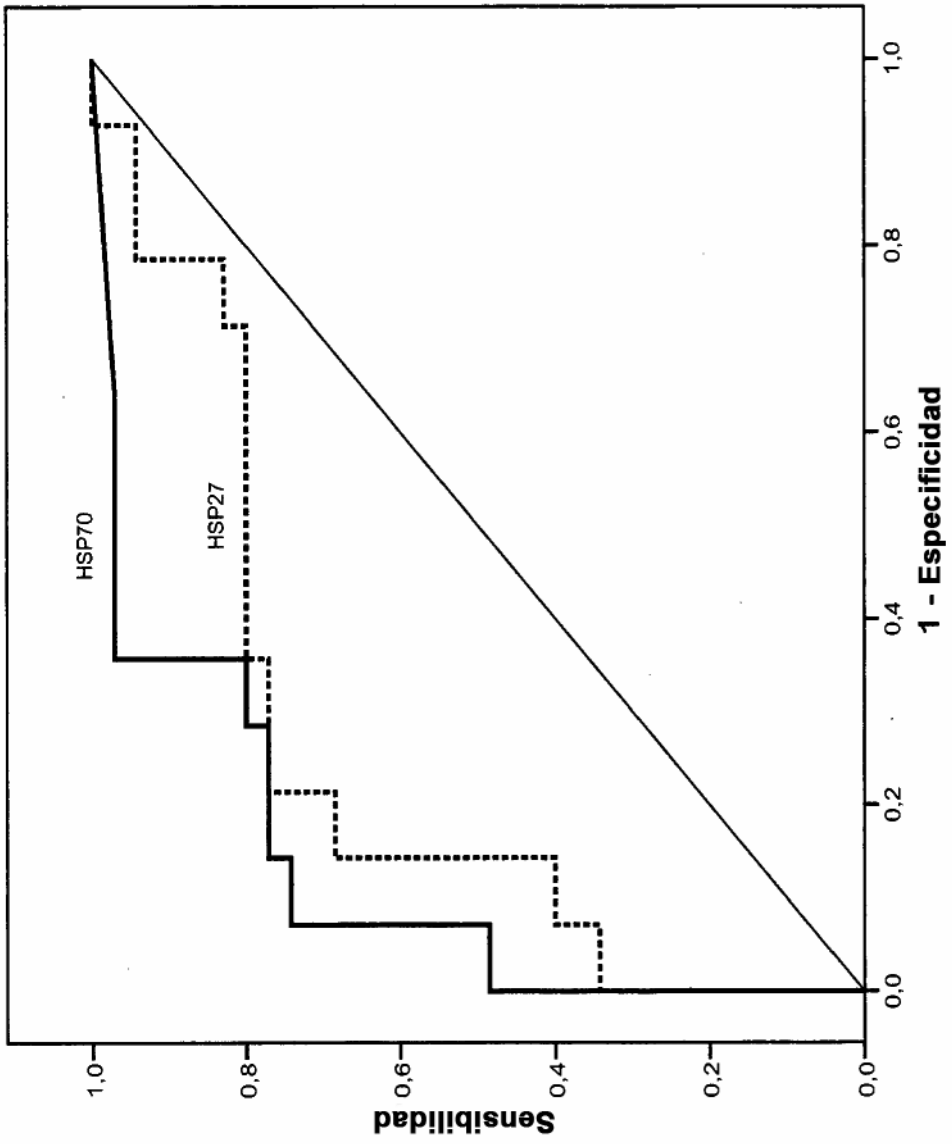


Fig. 9