

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 018**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2012 E 12162884 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.12.2014 EP 2647995**

54 Título: **Métodos y uso para la evaluación de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2015

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

HORSCH, ANDREA;
GALLUSSER, ANDREAS;
HESS, GEORG;
KLEMT, VOLKER y
ZDUNEK, DIETMAR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 529 018 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

Métodos y uso para la evaluación de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a métodos y combinaciones para evaluar al gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una causa mayor de morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Es la tercera causa de muerte en los Estados Unidos, afectando a más de 16 millones de personas en EEUU, y la cuarta causa de muerte en los países desarrollados. Se prevén en las próximas décadas incrementos sostenidos de la prevalencia y mortalidad de la EPOC. La EPOC es un trastorno inflamatorio crónico de los pulmones caracterizado por una restricción del flujo de aire que no es totalmente reversible. El factor de riesgo principal de EPOC es el tabaquismo activo. La EPOC se desarrolla lentamente e incluye el desarrollo de enfisema, que se caracteriza por la destrucción y agrandamiento de los alveolos y la bronquitis crónica. Se asocia además a tos y flemas en las vías respiratorias pequeñas. En su estado estable, la EPOC se trata con broncodilatadores, agentes anticolinérgicos y esteroides inhalados o sistémicos. También se utiliza la teofilina y el oxígeno y está altamente recomendado dejar de fumar.

Las exacerbaciones de la EPOC son una característica común y se reconocen clínicamente por la disnea incrementada, la tos y el cambio en la cantidad de esputo. Entre los signos acompañantes de la enfermedad se incluyen la fiebre y las mialgias (Reilly J.J. *et al.*, página 1.640, en: Harrison Principles of Internal Medicine, 17a ed., página 1.635 y siguientes). Actualmente las exacerbaciones de la EPOC se tratan según un algoritmo basado en los síntomas clínicos (leves, moderados o graves) y la presencia de factores de riesgo (Sethi S. *et al.*, NEJM 359:2355-2365, 2008). Además, actualmente se discute qué pacientes requieren hospitalización y quiénes pueden mantenerse como un paciente ambulatorio (Niewoehner D.E., NEJM 362:1407-1416, 2010). Además, una importante barrera a la evaluación de los pacientes es una falta de marcadores biológicos modificables que puedan utilizarse como variables de sustitución de resultados clínicos tales como la exacerbación y la mortalidad.

En los últimos años se ha conocido que las exacerbaciones de la EPOC están causadas por infecciones víricas y bacterianas y que las manifestaciones clínicas son el resultado de la infección misma y de la respuesta del huésped (Sethi *et al.*, *supra*). Los agentes infecciosos predominantes son *H. influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, a título de ejemplos de bacterias, y los rinovirus, a título de ejemplo de virus. Las exacerbaciones de la EPOC afectan periódicamente a vías respiratorias grandes y pequeñas, aunque también pueden implicar los alveolos, incluyendo los neumocitos de tipo 2, que son la fuente principal de proteínas surfactantes. Además, las infecciones que provocan exacerbaciones de la EPOC pueden convertirse en sistémicas y evolucionar a sepsis (Sethi S. *et al.*, *supra*). De hecho, algunos estudios recientes indican que tanto los péptidos natriuréticos (NT-pro BNP) como la troponina T representan marcadores para un resultado pobre a los 30 días pero no a 1 año en pacientes con exacerbaciones de EPOC (Chang C.L. *et al.*, Thorax 66:764-768, 2011). La base fisiopatológica del fenómeno observado no ha sido aclarada más allá de la presencia e importancia de la participación cardiaca en la EPOC.

En la solicitud de patente internacional nº WO2006/097244, se dan a conocer marcadores de la EPOC tales como SpB. El documento es silencioso respecto a la utilización de muestras de personas sin historia de insuficiencia cardiaca.

Por lo tanto, existe una necesidad de medios para evaluar adicionalmente el estadio de enfermedad y para estratificar los pacientes con EPOC exacerbado con el fin de formar subgrupos apropiados para proporcionarles el cuidado adecuado. De acuerdo con lo anteriormente expuesto es un objetivo de la presente invención proporcionar un método para evaluar la exacerbación de la EPOC y/o para estratificar los pacientes para la terapia de la EPOC.

55 **DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION**

Los métodos y usos de la presente invención generalmente se llevan a cabo *in vitro*. Cada uno de los métodos y usos definidos posteriormente puede consistir de la etapa o etapas descritas. Cada uno de los métodos y usos definidos posteriormente puede incluir las etapas indicadas e incluir además etapas adicionales. El médico puede haber obtenido muestras del paciente, que también pueden denominarse muestras de ensayo, en las que se lleva a cabo un método o uso definido en la presente memoria. Los métodos y usos definidos a continuación pueden llevarse a cabo utilizando cualquier equipo adecuado en cualquier contexto deseado, tal como un laboratorio. Típicamente los resultados del método son revisados o analizados por un médico con fines diagnósticos.

La invención en su forma más amplia está definida por las reivindicaciones independientes 1 y 7:

1. Un método para determinar la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un sujeto, comprendiendo el método la detección de la cantidad de pro-proteína surfactante pulmonar tipo B (proSP-B) o una parte eficaz de la misma, en un muestra del sujeto, en el que una cantidad incrementada de proSP-B, o una parte de la misma, respecto a un valor umbral indica una gravedad elevada de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en la que la muestra es una muestra de sangre de un ser humano que no presenta historia de insuficiencia cardiaca, y en el que un valor superior a 35 pg/ml de proSP-B y un valor superior a 65 pg/ml de la parte de proSP-B definida por las posiciones aminoácidas 285 a 334 de la secuencia SEC ID n° 1 indica una gravedad incrementada de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

7. El uso *in vitro* de un agente de unión específico para proSP-B, o una parte eficaz del mismo, para la evaluación de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un sujeto, comprendiendo el uso la detección de la cantidad de proSP-B, o una parte de la misma, en una muestra de sangre de un ser humano mediante el uso del agente de unión, en el que el ser humano no presenta una historia de insuficiencia cardiaca, en el que un valor superior a aproximadamente 35 pg/ml de proSP-B y un valor superior a 65 pg/ml de la parte de proSP-B definida por las posiciones aminoácidas 285 a 334 de la secuencia SEC ID n° 1 indica una gravedad incrementada de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Se definen realizaciones preferentes en las reivindicaciones dependientes 2 a 6.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se entenderá mejor haciendo referencia a la descripción detallada considerada conjuntamente con los ejemplos no limitativos y los dibujos adjuntos.

La figura 1 ilustra una vista general de los niveles de NT-proBNP, proSP-B, el fragmento C-terminal de proSP-B y CRP de pacientes con EPOC exacerbada sin (grupo A, 32 individuos) y con (grupo B, 32 individuos) síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) utilizado en un estudio ejemplar.

La figura 2 muestra los datos individuales de los 32 pacientes de EPOC con EPOC exacerbada sin SRIS de la que la fig. 1 proporciona una vista general.

La figura 3 muestra los datos individuales de los 32 pacientes de EPOC con EPOC exacerbada sin SRIS de la que la fig. 1 proporciona una vista general.

La figura 4 ilustra datos de un grupo de sujetos de control (i) sin enfermedad cardiovascular (grupo 1), (ii) con enfermedad cardiovascular y sin indicación de insuficiencia cardiaca clínica (grupo 1) e (iii) enfermedad cardiovascular e insuficiencia cardiaca clínica, utilizados en el estudio ejemplar (grupo 3).

La figura 5 muestra la correlación entre los valores de NT-proBNP y los valores de proSP-B.

La figura 6 muestra la correlación entre los valores de proSP-B y los valores del fragmento C-terminal de proSP-B.

La figura 7 ilustra la correlación entre los valores obtenidos utilizando el ensayo de la troponina T sensible (Roche Diagnostics) y los valores de proSP-B.

La figura 8 ilustra la correlación entre los valores obtenidos utilizando el ensayo de la troponina T sensible (Roche Diagnostics) y los valores de NT-proBNP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el inesperado resultado de que puede diagnosticarse una exacerbación de la EPOC basándose en los niveles de proSP-B en el sujeto. Sin restringirse a ninguna teoría se supone que de esta manera se evalúa la participación de los bronquios y alveolos de pequeño tamaño en la enfermedad pulmonar obstructiva grave.

Un método de la invención es un método para evaluar la gravedad de la EPOC en un sujeto. También se hace referencia en la presente memoria a un incremento de la gravedad de la EPOC como exacerbación de la EPOC. Resulta difícil evaluar una exacerbación de la EPOC, lo que provoca que las elecciones de tratamiento y el tipo de cuidado resulte extremadamente difícil. Tanto la NT-proBNP como la troponina T han sido identificados como importantes biomarcadores de la gravedad de la EPOC y el resultado clínico. Sin embargo, sigue sin estar claro si estos marcadores biológicos, en la presente memoria también denominados simplemente marcadores, representan la enfermedad subyacente o un indicio de las complicaciones de la EPOC (Chang *et al.*, *supra*, 2011). El presente aspecto de la invención añade un elemento importante a la evaluación de dichos pacientes: la participación de las vías respiratorias y los alveolos de pequeño tamaño (no identificados mediante las técnicas estándares de obtención de imágenes). Este aspecto mejora la evaluación de la EPOC exacerbada y facilita la toma de decisiones con respecto al tipo de cuidado y al tipo y grado del tratamiento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "incremento" de gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva se utiliza de manera relativa, es decir, en comparación con los síntomas y la gravedad de la enfermedad que se conocen de un determinado sujeto. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva" típicamente se refiere a una exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva, en particular una exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, tal como una exacerbación aguda de la enfermedad pulmonar obstructiva, incluyendo una exacerbación aguda de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la determinación de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva en algunas realizaciones de cualquier método o uso según la presente invención se refiere a la determinación de si se ha producido una exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica. En la técnica se conoce como exacerbación a un incremento de la gravedad de una enfermedad, en particular de una enfermedad crónica. De acuerdo con ello, una exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva es un deterioro de la enfermedad pulmonar obstructiva. Típicamente una exacerbación es un incremento agudo de la severidad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica o un deterioro agudo de la enfermedad pulmonar obstructiva. Generalmente una exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva requiere una modificación de la terapia. Tal como también se explica en mayor detalle a continuación sobre un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva, una exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva se ve típicamente acompañada de un incremento de la tos, el esputo y la disnea. La exacerbación de la enfermedad pulmonar obstructiva se trata mediante la administración de un broncodilatador y/o la aplicación sistémica de un corticoesteroide. En el caso de un incremento fuerte de la gravedad de los síntomas, puede resultar necesaria la administración de oxígeno.

La gravedad de una enfermedad pulmonar obstructiva estable, en contraste con un incremento agudo de la gravedad, se clasifica además en la técnicas según la puntuación GOLD (ver, por ejemplo, Harrison, Principles of Internal Medicine, 17a ed. (Tabla 254-1), capítulo 254). Entre los criterios para la evaluación de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva según dicha clasificación en términos de la función pulmonar se incluyen la proporción de volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF_1) y la capacidad vital forzada (CVF), así como el VEF_1 predicho para determinar el VEF_1 en % de la predicción. En términos de signos clínicos, se utiliza la tos y la producción de esputo para clasificar la gravedad de la enfermedad. Como orientación general se aplica la clasificación siguiente: estadio I: tos de fumador, poca o ninguna falta de aliento, ningún signo clínico de EPOC, VEF_1 superior a 80% de la predicción. Estadio II: falta de aliento al realizar esfuerzos, tos productiva de esputo, algunos signos clínicos de EPOC, VEF_1 de 50% a 80% de la predicción. Estadio III: falta de aliento con esfuerzo suave, VEF_1 de 30% a 50% de la predicción. Estadio IV: falta de aliento con esfuerzo suave, insuficiencia cardiaca derecha, VEF_1 inferior a 30% de la predicción.

A continuación se supone que un sujeto conocido presenta enfermedad pulmonar obstructiva leve, que puede considerarse enfermedad pulmonar obstructiva de baja gravedad. Tal como también se explica posteriormente, en dicho caso la enfermedad pulmonar obstructiva sin gravedad incrementada se manifiesta en forma de tos y producción de esputo excesivos, habitualmente acompañados de falta de aliento, es decir disnea. La enfermedad pulmonar obstructiva de bajo nivel de gravedad se caracteriza por la presencia de obstrucción del flujo de aire, tal como en forma de bronquitis crónica. Se define la bronquitis crónica como la secreción excesiva de moco bronquial acompañada de tos diaria durante 3 ó más meses en un periodo de 2 o más años consecutivos. La enfermedad pulmonar obstructiva progresa de una forma leve pasando por formas de gravedad más elevada hasta una forma grave, de manera que las formas leves también pueden denominarse estadio temprano, mientras que las formas graves pueden denominarse estadio tardío. Una forma grave de la enfermedad pulmonar obstructiva puede implicar una complicación, tal como una infección sistémica (ver posteriormente).

Puede considerarse gravedad incrementada de la enfermedad pulmonar obstructiva a un empeoramiento de los síntomas más allá de las variaciones diarias. En particular, una gravedad incrementada de la enfermedad pulmonar obstructiva se ve acompañada por disnea incrementada, estando presente la disnea en reposo en los grados de máxima gravedad. Además, típicamente se produce una frecuencia o gravedad incrementada de la tos, y/o un volumen incrementado del esputo o un cambio en el carácter del esputo. Los grados de gravedad más alta de la enfermedad pulmonar obstructiva se caracterizan además por uno o más de entre neumonía, hipertensión pulmonar, insuficiencia cardiaca derecha, así como insuficiencia respiratoria crónica.

La espirometría, que puede considerarse una medición de la respiración, puede utilizarse para evaluar la función pulmonar. Típicamente la espirometría incluye medir el volumen y/o el flujo de aire que puede inhalarse y exhalarse. En la enfermedad pulmonar obstructiva de baja gravedad puede determinarse un volumen de cierre anormal y un caudal mesoespiratorio reducido. A grados más altos de gravedad, puede observarse una reducción del volumen espiratorio forzado. La capacidad vital forzada se ve marcadamente reducida en los grados elevados de gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva. Además, puede determinarse una reducción de la proporción entre el volumen espiratorio forzado y la capacidad vital en estadios de gravedad más elevada de la enfermedad. En los grados elevados de gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva, generalmente se produce atrapamiento aéreo, que resulta en un incremento de la proporción entre el volumen residual y la capacidad pulmonar total. Además, se

produce un incremento del volumen residual y un incremento de la capacidad pulmonar total en los estadios de elevada gravedad de la enfermedad.

5 Según si domina o no la bronquitis crónica, se distinguen dos patrones de síntomas en la EPOC de gravedad elevada: el tipo A, conocido como "soplador rosado" ("pink puffer" en inglés) y el tipo B, conocido como "abotargado azul" ("blue bloater" en inglés). En el tipo A, la bronquitis crónica no es el signo visible predominante observado por un sujeto. Tal como se ha indicado anteriormente, la disnea es, en la enfermedad de baja gravedad, la principal queja del paciente en el tipo A. Los niveles de hemoglobina generalmente son normales, es decir 120 a 150 g/l y la SaO₂ en reposo se encuentra a niveles normales. La PaO₂ generalmente es de entre 65 y 75 mmHg (aproximadamente de entre 8.500 y 10.000 Pa) y la PaCO₂ es de entre 35 y 40 mmHg (aproximadamente de entre aproximadamente 4.500 y aproximadamente 5.300). En la radiografía torácica puede detectarse hiperinflación con diafragmas aplanados. La capacidad pulmonar total generalmente se encuentra incrementada, posiblemente marcadamente incrementada. La adaptabilidad pulmonar estática, es decir, el cambio de volumen para una presión aplicada dada, típicamente se encuentra incrementada. Puede observarse una desaturación de oxígeno nocturno leve a moderada, que típicamente no se asocia a apnea del sueño obstructiva. En el tipo B la queja predominante del sujeto es la tos crónica, típicamente acompañada de disnea leve. Con frecuencia se produce edema periférico. Los niveles de hemoglobina generalmente se incrementan hasta valores de aproximadamente 150 a 180 g/l y la PaCO₂ generalmente se encuentra elevada, hasta valores de aproximadamente 50 a 60 mmHg (entre aproximadamente 6.600 y aproximadamente 8.000 Pa). En radiografía torácica típicamente se observan más marcas intersticiales, mientras que típicamente no se produce aplanamiento del diafragma. La capacidad pulmonar total generalmente es normal, posiblemente ligeramente incrementada. La adaptabilidad pulmonar estática típicamente es normal. Puede observarse desaturación de oxígeno nocturna grave, con frecuencia asociada a apnea del sueño obstructiva.

25 Un método para evaluar la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva según la presente invención implica el análisis de una muestra del sujeto *in vitro*. Típicamente la muestra es o incluye líquido corporal del sujeto. La muestra puede ser, en algunas realizaciones, una de entre una muestra de sangre completa, una muestra de plasma, una muestra de líquido linfático y una muestra de suero. En algunas realizaciones, el método puede incluir proporcionar una muestra del sujeto. La muestra puede obtenerse en cualquier punto temporal deseado antes de llevar a cabo el método de la invención. Generalmente el intervalo de tiempo entre la toma de la muestra y la realización del método de la invención se selecciona para permitir el análisis de proSP-B intacto o una parte eficaz de proSPB. En algunas realizaciones, la muestra se ha obtenido el mismo día o en los dos últimos días, tal como el día anterior. La muestra puede haber sido obtenida, por ejemplo, 72 horas o menos, tal como 60 horas o menos, 48 horas o menos, 32 horas, 24 horas ó 12 horas antes de la puesta en práctica del método de la invención y mantenerse a aproximadamente la temperatura ambiente, es decir, a aproximadamente 18°C. La muestra también puede haberse mantenido a una temperatura inferior a la temperatura ambiente, por ejemplo puede haberse mantenido a una temperatura comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 18°C, tal como entre aproximadamente 4°C y aproximadamente 18°C, incluyendo a aproximadamente 15°C o menos, o a 10°C o menos, tal como a aproximadamente 4°C o a aproximadamente 8°C. En algunas realizaciones, la muestra se ha obtenido en la misma semana, tal como 7 días o menos, 6 días o menos, 5 días o menos, 4 días o menos, 3 días o menos, 2 días o menos, 32 horas o menos, 24 horas o menos, 12 horas o menos antes de la puesta en práctica del método de la invención y se ha mantenido en forma líquida a una temperatura de aproximadamente 12°C o menos, tal como a aproximadamente 10°C o menos, a aproximadamente 8°C o menos, incluyendo, por ejemplo, a aproximadamente 4°C. El sujeto del que se ha obtenido la muestra generalmente es un mamífero, tal como un conejo, un ratón, una rata, un cobaya, un hámster, un perro, un cerdo, una vaca, una cabra, una oveja, un caballo, un macaco, un gibón o un ser humano.

50 El término "aproximadamente" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un valor dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular según determinará el experto ordinario en la materia, que dependerá en parte de cómo se mide o se determina el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar 1 ó menos, ó más de 1 desviación estándar, según la práctica de la técnica. El término "aproximadamente" se utiliza además para indicar que la cantidad o valor en cuestión puede ser el valor designado o algún otro valor que es aproximadamente igual. El término pretender indicar que valores similares inducirán resultados o efectos equivalentes según la invención. En este contexto, "aproximadamente" puede referirse a un intervalo superior e inferior en hasta 10%, tal como hasta 5%, hasta 2%, hasta 1%, hasta 0,5% o hasta 0,1% respecto a un valor dado.

60 En algunas realizaciones, la muestra del individuo es una muestra congelada. Generalmente la muestra se congela en los intervalos de tiempo anteriormente indicados, por ejemplo entre 0 y aproximadamente 48 ó entre 0 y aproximadamente 42 horas, y/o en los puntos temporales anteriormente ejemplificados, tal como aproximadamente 48 horas, aproximadamente 36 horas o menos, tras obtenerse la muestra del individuo y mantenerse a temperatura ambiente. En el caso de que la muestra se encuentre esencialmente vacía de células, tal como en el caso de una muestra de suero o de plasma, la muestra puede llevarse hasta una temperatura inferior al punto de congelación. En

el caso de que la muestra incluya células en las que no se pretenda reducir su número en la muestra, en algunas realizaciones puede resultar deseable mantener estas células por lo menos esencialmente intactas para poner en práctica un método según la invención. En este tipo de realización puede formarse una muestra congelada mediante la congelación de una muestra obtenida tras añadir un agente crioprotector, tal como DMSO, glicerol y/o hidroxietilalmidón. A título de ejemplo ilustrativo, puede utilizarse DMSO a una concentración final comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 10%, tal como aproximadamente 2%, aproximadamente 4%, aproximadamente 5% o aproximadamente 10% de DMSO. Típicamente, la muestra se congela a continuación a una velocidad controlada hasta una temperatura inferior a -50°C, momento en el que la muestra puede, por ejemplo, almacenarse, incluyendo el almacenamiento a largo plazo, a una temperatura inferior a -130°C, tal como -160°C, por ejemplo en nitrógeno líquido, durante periodos de tiempo prolongados. En el caso de que la muestra sea una muestra de la que se hayan eliminado por lo menos esencialmente las células, la muestra también puede almacenarse a una temperatura inferior a 0°C sin adición de un agente crioprotector. La muestra puede llevarse, por ejemplo, hasta una temperatura de aproximadamente -5°C, aproximadamente -10°C, aproximadamente -20°C, aproximadamente -50°C, aproximadamente -80°C o menos.

Tal como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones la muestra puede empobrecerse en número de células. La reducción del número de células de la muestra puede, en algunas realizaciones, incluir técnicas generales de eliminación de células tales como la centrifugación, la filtración o la cromatografía celular. En algunas realizaciones de un método según la invención una muestra tal como es proporcionada por el individuo se empobrece en eritrocitos, en algunas realizaciones se elimina por lo menos esencialmente en eritrocitos, en caso necesario. El empobrecimiento o eliminación de los eritrocitos puede resultar necesario, por ejemplo en algunas realizaciones en las que la muestra es de sangre completa o de células sanguíneas. La lisis de los eritrocitos puede llevarse a cabo osmóticamente o químicamente. La lisis osmótica resulta adecuada en el contexto de la presente invención ya que los eritrocitos se lisan a una osmolaridad a la que los leucocitos permanecen intactos. En la técnica, típicamente se utiliza una solución de cloruro amónico para la lisis osmótica, que además puede incluir bicarbonato potásico y/o EDTA. Puede utilizarse un reactivo disponible comercialmente, tal como la solución de lisado FCM de Santa Cruz (nº de pedido sc-3621), el tampón de lisis de glóbulos rojos Erythrolyse de AbD Serotec o la solución de lisis RBC de 5 PRIME. La lisis química de los eritrocitos puede llevarse a cabo utilizando, por ejemplo, un solvente orgánico tal como éter dietílico o cloroformo, y/o un surfactante, una solución que contiene cobre o mediante la adición de determinadas toxinas bacterianas o animales. Tras la lisis de los eritrocitos, pueden recogerse las células sanguíneas remanentes, por ejemplo mediante centrifugación. El empobrecimiento en células o la eliminación de las mismas puede llevarse a cabo, en algunas realizaciones, dentro de un intervalo de tiempo de aproximadamente 12 horas o menos después de la obtención de la muestra de un sujeto, tal como en aproximadamente 8 horas o menos, en aproximadamente 6 horas o menos, en aproximadamente 5 horas o menos, en aproximadamente 4 horas o menos, en aproximadamente 3 horas o menos, en aproximadamente 2 horas o menos o en aproximadamente una hora o menos.

Un método según la invención incluye la detección de la cantidad de pro-proteína B asociada a surfactante pulmonar (proSP-B), o una parte eficaz de la misma, que puede incluir la parte C-terminal de proSPB (ver posteriormente) en la muestra. La proteína proSP-B puede ser cualquier variante o isoforma respectiva de la especie respectiva, por ejemplo el ser humano. La proteína puede ser, por ejemplo, la proteína humana de número de acceso P07988 de Swissprot/Uniprot (versión 147 el 22 de febrero de 2012), correspondiente a SEC ID nº 1. Esta proteína puede estar codificada, por ejemplo, por el ARNm de número de acceso de GenBank NM_198843 (versión NM_198843.2; GI:288856296) o el ARNm de número de acceso de GenBank NM_000542 (versión NM_000542.3, GI: 288856298). El gen correspondiente puede ser, en algunas realizaciones, el gen humano SFTPB con el ID génico de GenBank: 6439 (de 4 de febrero de 2012). La proteína puede ser, en algunas realizaciones, la proteína de conejo de número de acceso P15285 de Swissprot/Uniprot (versión 96 el 19 de octubre de 2011). La proteína también puede ser la proteína de rata de número de acceso P22355 de Swissprot/Uniprot (versión 93 el 21 de septiembre de 2011). La proteína puede estar codificada, en algunas realizaciones, por el gen de rata SFTPB con el ID génico de GenBank: 192155 (de 4 de febrero de 2012). La proteína puede ser, en algunas realizaciones, la proteína bovina de número de acceso P15781 de Swissprot/Uniprot (versión 88 el 21 de septiembre de 2011). La proteína puede estar codificada, en algunas realizaciones, por el gen bovino SFTPB con el ID génico de GenBank: 507398 (de 28 de febrero de 2012). La proteína también puede ser la proteína de ratón de número de acceso P50405 de Swissprot/Uniprot (versión 89 el 16 de noviembre de 2011). La proteína puede ser, en algunas realizaciones, la proteína de perro de número de acceso P17129 de Swissprot/Uniprot (versión 90 el 21 de septiembre de 2011). La proteína puede ser, en algunas realizaciones, la proteína de oveja de número de acceso Q9TU81 de Swissprot/Uniprot (versión 40 el 5 de octubre de 2011). La proteína también puede ser la proteína porcina de número de acceso P15782 de Swissprot/Uniprot (versión 73 el 27 de julio de 2011). La proteína puede ser, en algunas realizaciones, la proteína de cobaya de número de acceso 035489 de Swissprot/Uniprot (versión 53 el 21 de septiembre de 2011). Es conocida la existencia de varias variantes naturales de la proteína proSP-B humana de número de acceso P07988 de Swissprot/Uniprot debido a un polimorfismo de un solo nucleótido. Dichas variantes se encuentra listadas en Swissprot/Uniprot entrada P07988, tal como, por ejemplo VAR_006948, VAR_013099, VAR_006950, VAR_006949,

VAR_036856 y VAR_013100. El término proSP-B tal como se utiliza en la presente memoria pretende incluir dichas variantes.

5 El término "variante" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un péptido o proteína con una secuencia de aminoácidos que difiere de la proteína en cuestión debido a una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos. Una variante puede presentar una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de por lo menos aproximadamente 60%, por lo menos aproximadamente 70%, por lo menos aproximadamente 75%, por lo menos aproximadamente 80%, por lo menos aproximadamente 85%, por lo menos aproximadamente 90%, por lo menos aproximadamente 92%, por lo menos aproximadamente 95%, por lo menos aproximadamente 96%, por lo menos aproximadamente 97%, por lo menos aproximadamente 98% o por lo menos aproximadamente 99% respecto a una forma natural correspondiente de la proteína respectiva. Una variante puede ser una variante alélica o cualquier homólogo, parólogo u ortólogo específico de especie. Una variante también puede ser un fragmento de la proteína correspondiente, por ejemplo proSP-B, incluyendo un fragmento de los tipos anteriormente indicados de variante, con la condición de que estos fragmentos presentan las propiedades inmunológicas y biológicas esenciales de la forma predominante conocida de la proteína natural correspondiente. Una variante puede presentar, por ejemplo, propiedades inmunológicas (es decir, composición de epítomos) comparables a las de una forma proteica conocida. De esta manera, una variante típicamente puede ser reconocida por una pareja de unión utilizada para la determinación de la concentración de la proteína. Un fragmento es, en algunas realizaciones, un producto de degradación de la forma conocida de la proteína, por ejemplo proSP-B. Una variante también puede diferir debido a modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación o la miristilación, o presentar un patrón de glucosilación diferente.

La expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia" con respecto a las secuencias de aminoácidos dadas a conocer en la presente memoria se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que es idéntico a los residuos aminoácidos en una secuencia de referencia, por ejemplo una molécula de proSP-B, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede realizarse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, ALIGN o Megalign (DNASTAR). El experto en la materia podrá determinar los parámetros apropiados para medir las alineaciones, incluyendo cualesquiera algoritmos necesarios para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Lo mismo es cierto para las secuencias de nucleótidos dadas a conocer en la presente memoria.

La SP-B madura es secretada al espacio alveolar, en donde se encuentra principalmente en forma de homodímero. SP-B es una proteína que se encuentra incluida en el surfactante pulmonar, una mezcla compleja de proteínas y lípidos. SP-B resulta esencial para la función del surfactante pulmonar, incluyendo la regulación de la tensión superficial en los pulmones durante la respiración. El surfactante pulmonar forma una película continua en la interfaz líquido-aire de los alveolos, lo que resulta fundamental para la respiración. Permite la respiración normal mediante la reducción de la tensión superficial en la interfaz aire/agua en los alveolos. Proporciona además la primera línea de defensa frente a microbios inhalados en los pulmones. SP-B incrementa la velocidad de adsorción de los fosfolípidos a la interfaz aire/agua, reduce la tensión superficial al interferir con las fuerzas de atracción que actúan entre las moléculas de agua y presenta propiedades antiinflamatorias. Se cree que SP-B estimula la formación rápida de la película alveolar. Sp-B es anfipático y en gran medida, hidrofóbico.

La materia hidrofóbica ("que aleja el agua"), presenta una tendencia a separarse del agua. En contraste, la materia hidrofílica ("que atrae al agua") generalmente contiene moléculas que pueden formar interacciones dipolo-dipolo con moléculas de agua y, de esta manera, presentar una elevada humectabilidad con el agua (ver también posteriormente). Habitualmente la materia hidrofóbica es apolar y presenta una distribución uniforme de la densidad electrónica. Un término relacionado es la indicación lipofílico ("que atrae las grasas"). La materia lipofílica atrae los compuestos orgánicos no polares, tales como aceites o grasas. Se entiende que, de manera general, los términos "hidrofóbico" y "lipofílico" no son necesariamente sinónimos. Por ejemplo, los compuestos perfluorocarbonados son tanto hidrofóbicos como oleofóbicos, es decir, sin afinidad para los aceites. Por consiguiente, dichos compuestos presentan una tendencia a separarse tanto del agua como de los hidrocarburos (aunque de los últimos en menor grado que del agua). Sin embargo, en el contexto de la presente invención, "hidrofóbico" y "lipofílico" pueden utilizarse de manera general intercambiamente. Un compuesto anfifílico, también denominado anfipático, presenta propiedades tanto hidrofílicas como hidrofóbicas. Generalmente, este tipo de compuesto presenta partes hidrofílicas y partes hidrofóbicas.

La forma madura de la proteína asociada a surfactante de tipo B difiere de proSP-B en la falta de un péptido de señal N-terminal, en la falta de un propéptido N-terminal a continuación y en la falta de un propéptido C-terminal. Además, proSP-B es glucosilado, mientras que los sitios de glucosilación correspondientes no se encuentran

presentes en la SP-B madura. La SPB humana madura presenta una longitud de 70 aminoácidos, mientras que la proSP-B humana presenta 176 aminoácidos N-terminales adicionales y 102 aminoácidos C-terminales adicionales.

5 Una parte efectiva de proSP-B es un péptido que presenta, incluyendo que consiste de, una secuencia de aminoácidos que define la parte C-terminal de proSPB, tal como el cuarto C-terminal de proSPB. Se recuerda que el extremo C-terminal de proSPB difiere del extremo C-terminal de la SPB madura en que proSPB presenta una secuencia de propéptido, que define los aminoácidos 280 a 381 de la proteína humana de número de acceso P07988 de Swissprot/Uniprot. En realizaciones típicas, una parte efectiva de proSPB presenta una parte de por lo menos aproximadamente 25, incluyendo por lo menos aproximadamente 30, por lo menos aproximadamente 35, por lo menos aproximadamente 40, por lo menos aproximadamente 45 ó por lo menos aproximadamente 50 aminoácidos del dominio de saposina B de tipo 3, definido por los aminoácidos 295 a 370 de número de acceso P07988 de Swissprot/Uniprot. Típicamente una secuencia de aminoácidos respectiva se sitúa dentro de la mitad N-terminal del dominio de saposina B de tipo 3. Típicamente una parte efectiva de proSPB incluye además 5 ó más, incluyendo 10 ó más, aminoácidos del extremo C-terminal del dominio de saposina B de tipo 2 de proSPB, que se define por las posiciones aminoácidas correspondientes a los aminoácidos 204 a 281 de la secuencia de número de acceso P07988 de Swissprot/Uniprot. En una realización, una parte efectiva de proSPB incluye, incluyendo que consiste en, las posiciones aminoácidas que corresponden a las posiciones aminoácidas 279 a 381 de la secuencia de número de acceso P07988 de Swissprot/Uniprot. En una realización, una parte efectiva de proSPB incluye, incluyendo que consiste en, las posiciones aminoácidas que corresponden a las posiciones aminoácidas 279 a 334 de la secuencia de número de acceso P07988 de Swissprot/Uniprot. En algunas realizaciones, la parte efectiva de proSPB es monomérica. En algunas realizaciones, la parte efectiva de proSPB es dimerica, definiendo por ejemplo un homodímero.

25 Un método de la invención es un método de diagnóstico o ayuda en el diagnóstico de una condición asociada a la exacerbación de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un sujeto. El término exacerbación pretende presentar su significado ordinario, referido al empeoramiento, deterioro, escalado, exacerbación o brote de la enfermedad (*supra*), y puede utilizarse intercambiamente con dichos términos. Los términos "diagnosticar" y "diagnóstico" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a la evaluación de la presencia o ausencia de una condición médicamente relevante y en particular se refieren al procedimiento de identificación de una condición médica basándose en los resultados de un procedimiento diagnóstico, incluyendo por sus signos y síntomas. El diagnóstico puede incluir procedimientos tales como el cribado para la predisposición a una condición médicamente relevante, tal como el empeoramiento de la enfermedad pulmonar obstructiva, el cribado para la indicación de una condición médicamente relevante, el cribado para una condición médicamente relevante y/o el diagnóstico clínico o patológico de una condición médicamente relevante. Generalmente el sujeto sufre de una sintomatología incrementada de la enfermedad, en particular distrés. Un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica puede estar asociado a una infección bacteriana o vírica. Un método relacionado de la invención es un método de diagnóstico o ayuda en el diagnóstico de una gravedad elevada de la enfermedad pulmonar obstructiva. Se entiende que un diagnóstico/evaluación respectiva implica una valoración que posteriormente puede resultar ser de precisión inferior a 100% para un individuo dado. Dicha evaluación debe considerarse, en algunas realizaciones, como una indicación del equilibrio de probabilidades y no como una previsión sólida.

45 En algunas realizaciones de cualquier método según la invención, el sujeto del que se origina la muestra, por ejemplo del que se obtiene o se ha obtenido la muestra, es conocido que sufre de un trastorno o daño pulmonar adicional (por ejemplo daños en la membrana alveolo-capilar) aparte de la enfermedad pulmonar obstructiva. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no sufre de neumonía, sepsis, transfusión masiva, traumatismos múltiples y/o pancreatitis. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no sufre de la aparición de una condición autoinmunitaria, tal como rechazo pulmonar post-transplante o una infección que resulta en una respuesta inflamatoria. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no presenta contenido gástrico aspirado. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no ha sido expuesto a un gas nocivo o tóxico (por ejemplo un solvente o vapor), humo de tabaco o polvo, un herbicida o un compuesto farmacéutico que es tóxico para el pulmón, tal como metotrexato o bleomicina. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no ha sido sometido a terapia de radiación de los pulmones o de un órgano contiguo. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no sufre de una infección que puede conducir a daños pulmonares, tal como una infección sistémica no asociada a la enfermedad pulmonar obstructiva, tal como urosepsis. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no sufre de una lesión pulmonar aguda, incluyendo el síndrome de distrés respiratorio agudo o adulto ("SDRA") En algunas realizaciones el sujeto es conocido que no sufre de anorexia, incluyendo el mal de altura. En algunas realizaciones, el sujeto es conocido que no sufre de insuficiencia cardíaca o de un incidente cardíaco agudo, tal como síndrome coronario agudo, angina de pecho o infarto de miocardio.

60 En un método según la invención, se detecta en la muestra la cantidad de proSP-B, o una parte efectiva de la misma. El término "detectar" o "detección", utilizado en la presente memoria en combinación con el término "cantidad", se entiende que se refiere de manera general a un nivel cuantitativo y no cualitativo. A este respecto, los términos "valor", "cantidad", "nivel" y "concentración" son utilizados intercambiamente en la presente memoria. De

acuerdo con lo anteriormente expuesto, el método incluye una cuantificación de proSP-B, es decir, se determina el nivel de proSP-B. Dicha medición puede basarse, por ejemplo, en medios espectroscópicos (por ejemplo RMN), resonancia del plasmón superficial, medios fotoquímicos, fotométricos, fluorométricos, radiológicos, enzimáticos o termodinámicos. El medio de medición utilizado se selecciona generalmente para que presente una sensibilidad que permita la detección de proSP-B a niveles del orden del valor umbral, en particular con una sensibilidad que permita determinar si los niveles de proSP-B son superiores o inferiores al valor umbral. Típicamente puede ponerse en contacto una pareja de unión de proSP-B con la muestra. En algunas realizaciones, se deja que se forme un complejo entre proSP-B y la pareja de unión. El nivel de unión de la pareja de unión que, por ejemplo, forma un complejo con proSP-B puede cuantificarse con el fin de evaluar la cantidad de proSP-B presente. Antes de detectar la cantidad de pareja de unión, en algunas realizaciones puede eliminarse de la muestra la pareja de unión no unida. Puede utilizarse una pareja de unión respectiva de proSP-B en combinación con un marcador detectable.

Dicha pareja de unión de proSP-B presenta una afinidad detectable y especificidad para proSP-B. Típicamente la unión se considera específica en el caso de que la afinidad de unión sea superior a 10^{-6} M. Una pareja de unión de proSP-B presenta, en algunas realizaciones, una afinidad de aproximadamente 10^{-8} M o superior o de aproximadamente 10^{-9} M o superior. El término "específico" se entiende que indica que la pareja de unión se dirige contra, se une a, o reacciona con proSP-B. De esta manera, estar dirigido, unirse a, o reaccionar con incluye que la pareja de unión se una específicamente a proSP-B. El término "específicamente" en el presente contexto se refiere a que la pareja de unión reacciona con proSP-B y/o una parte del mismo, aunque por lo menos esencialmente no con otra proteína. La expresión "otra proteína" incluye cualquier proteína, incluyendo proteínas estrechamente relacionadas u homólogas de proSP-B contra las que se dirige la pareja de unión. La expresión "no se une esencialmente" se refiere a que la pareja de unión no se une a otra proteína, es decir, muestra una reactividad cruzada inferior a aproximadamente 30%, tal como inferior a aproximadamente 20%, inferior a aproximadamente 10%, incluyendo inferior a aproximadamente 9, 8, 7, 6 ó 5%, en comparación con la afinidad para proSP-B. Puede someterse a ensayo si la pareja de unión reacciona específicamente tal como se ha definido anteriormente en la presente memoria, de entre otras maneras mediante la comparación de la reacción de una pareja de unión respectiva con proSP-B y la reacción de la pareja de unión con otra u otras proteínas. La "unión específica" también puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis de transferencia western, ensayos ELISA, RIA, ECL, IRMA, FACS, IQC y barridos peptídicos.

Una pareja de unión respectiva de proSP-B puede ser una inmunoglobulina, un fragmento de la misma, una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina o un aptámero. Son ejemplos de fragmentos de inmunoglobulina (recombinante), fragmentos Fab, fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpos o anticuerpos de dominio único (Holt L.J. *et al.*, Trends Biotechnol. 21, 11, 484-490, 2003). Un ejemplo de una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina es una muteína basada en un polipéptido de la familia de la lipocalina (documento n° WO 03/029462, Beste *et al.*, Proc. Ntal. Acad. Sci. USA 96:1898-1903, 1999). Las lipocalinas, tales como la proteína de unión a bilina, la lipocalina humana asociada a la gelatinasa de neutrófilos, la apolipoproteína D humana o la glucodelina, presentan sitios de unión a ligando naturales que pueden modificarse de manera que se unan a regiones proteicas pequeñas seleccionadas que se conocen como haptenos. Son ejemplos de otras moléculas proteicas de unión los denominados "glubodies" (ver el documento n° WO 96/23879), proteínas basadas en el andamiaje de anquirina (Mosavi L.K. *et al.*, Protein Science 13, 6, 1435-1448, 2004) o andamiaje cristalino (documento n° WO 01/04144), las proteínas descritas en Skerra, J. Mol. Recognit. 13:167-187, 2000, una proteína basada en una pluralidad de dominios de receptor de clase A de lipoproteína de baja densidad (RLBD-A), una adnectina, una tetranectina y un avímero. Los avímeros contienen los denominados dominios A que se encuentran presentes como cadenas de múltiples dominios en varios receptores de superficie celular (Silverman J. *et al.*, Nature Biotechnology 23:1556-1561, 2005). Una molécula que forma un complejo con una pareja de unión respectiva de proSP-B de manera similar puede ser una inmunoglobulina, un fragmento de la misma o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina, tal como se ha explicado anteriormente. De esta manera, en una realización ejemplar, la detección de la cantidad de proSP-B puede llevarse a cabo utilizando un primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente a proSP-B, así como un segundo anticuerpo o fragmento de anticuerpo capaz de unirse específicamente al primer anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

El término "anticuerpo" tal como se utiliza en la presente memoria se entiende que incluye una inmunoglobulina y un fragmento de inmunoglobulina que es capaz de unirse específicamente a una proteína seleccionada, por ejemplo proSP-B, así como una molécula de unión proteica respectiva con funciones de tipo inmunoglobulina. A título de ejemplo ilustrativo, un anticuerpo puede ser una inmunoglobulina de cadena pesada de camello. A título de ejemplos no limitativos adicionales, un anticuerpo puede ser un dominio de tipo EGF, un dominio Kringle, un dominio de fibronectina de tipo I, un dominio de fibronectina de tipo II, un dominio de fibronectina de tipo III, un dominio PAN, un dominio G1a, un dominio SRCR, un dominio de inhibidor de tripsina pancreática de Kunitz/bovina, tendamistat, un dominio de inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal, un dominio Trefoil (tipo P), un dominio de tipo C de factor de von Willebrand, un dominio similar a anafilatoxina, un dominio CUB, una repetición de tiroglobulina de tipo I, un dominio de clase A de receptor de LDL, un dominio Sushi, un dominio Link, un dominio de trombospondina de tipo I,

un dominio de inmunoglobulina o un dominio similar a inmunoglobulina (ver anteriormente para ejemplos adicionales). En algunas realizaciones, un anticuerpo es un aptámero, incluyendo un Spiegelmer[®], descrito en, por ejemplo, el documento nº WO 01/92655. Un aptámero típicamente es una molécula de ácidos nucleicos que puede seleccionarse de entre un grupo de ácidos nucleicos aleatorios basándose en su capacidad de unirse a otras moléculas seleccionadas, tales como péptidos, proteínas, moléculas de ácidos nucleicos o células. Los aptámeros, incluyendo los Spiegelmeros, son capaces de unirse a moléculas tales como péptidos, proteínas y compuestos de bajo peso molecular. Los Spiegelmers[®] están compuestos de isómeros L de oligonucleótidos naturales. Los aptámeros se construyen mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o mediante tecnología SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial). La afinidad de los spiegelmeros para sus moléculas diana con frecuencia se encuentra en el intervalo pico- a nano-molar y, de esta manera, es comparable a la de las inmunoglobulinas. Un aptámero también puede ser un péptido. Un péptido aptámero consiste de un dominio peptídico variable corto, unido en ambos extremos a un andamiaje proteico.

El término "fragmento" en referencia a un polipéptido, tal como una inmunoglobulina, o una molécula de unión proteica, se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos presente en un polipéptido correspondiente, con la condición de que sea más corta que la secuencia de longitud completa y con la condición de que sea capaz de llevar a cabo la función de interés de la proteína, en el caso de una inmunoglobulina de unión específica a la diana deseada, por ejemplo un antígeno (proSP-B, por ejemplo). La expresión "fragmento de inmunoglobulina" se refiere a una parte de una inmunoglobulina, con frecuencia la región hipervariable y partes de las cadenas pesadas y ligeras circundantes que muestran afinidad de unión específica para una molécula particular. Una región hipervariable es una parte de una inmunoglobulina que se une físicamente al polipéptido diana.

Una inmunoglobulina puede ser monoclonal o policlonal. El término "policlonal" se refiere a inmunoglobulinas que son poblaciones heterogéneas de moléculas de inmunoglobulinas derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno o un derivado antigénico funcional del mismo. Para la producción de inmunoglobulinas policlonales pueden inmunizarse uno o más de entre diversos animales huésped mediante inyección con el antígeno. Pueden utilizarse diversos adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica, según la especie de huésped. Las "inmunoglobulinas monoclonales" o "anticuerpos monoclonales" son poblaciones sustancialmente homogéneas de inmunoglobulinas contra un antígeno particular. Pueden obtenerse mediante cualquier técnica que permita la producción de moléculas de inmunoglobulina por líneas celulares continuas en cultivo. Las inmunoglobulinas monoclonales pueden obtenerse mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Köhler *et al.*, Nature 256:495-497, 1975, y patente US nº 4.376.110). Puede aislarse, enriquecerse o purificarse a partir de un organismo procariótico o eucariótico una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina con afinidad de unión específica únicamente para proSP-B. Algunos métodos rutinarios conocidos por el experto en la materia permiten la producción de tanto inmunoglobulinas como fragmentos de inmunoglobulina y moléculas de unión proteicas con funciones de tipo inmunoglobulina, tanto en organismos procarióticos como eucarióticos.

En mayor detalle, puede aislarse una inmunoglobulina mediante la comparación de su afinidad de unión para una proteína de interés, por ejemplo proSP-B, con su afinidad de unión para otros polipéptidos. Pueden generarse formas humanizadas de los anticuerpos de la presente invención utilizando uno de los procedimientos conocidos de la técnica, tales como la quimerización o la injertación de CDR. En general, las técnicas para la preparación de anticuerpos monoclonales e hibridomas son bien conocidas de la técnica. Puede inmunizarse cualquier animal, tal como una cabra, un ratón o un conejo, que es conocido que produce anticuerpos, utilizando el polipéptido seleccionado, por ejemplo proSP-B. Los métodos de inmunización son bien conocidos de la técnica. Entre dichos métodos se incluyen la inyección subcutánea o intraperitoneal del polipéptido. El experto en la materia reconocerá que la cantidad de polipéptido utilizada para la inmunización y el régimen de inmunización variarán basándose en el animal que se inmuniza, incluyendo la especie de mamífero inmunizada, su estado inmunológico y el peso corporal del mamífero, así como la antigenicidad del polipéptido y el sitio de inyección.

El polipéptido puede modificarse o administrarse en un adyuvante con el fin de incrementar la antigenicidad del péptido. Los métodos para incrementar la antigenicidad de un polipéptido son bien conocidos de la técnica. Entre dichos procedimientos se incluyen acoplar al antígeno una proteína heteróloga (tal como globulina o β -galactosidasa) o mediante la inclusión de un adyuvante durante la inmunización.

Típicamente se extrae sangre de los mamíferos inmunizados y el suero de cada muestra de sangre se somete a ensayo para anticuerpos particulares utilizando ensayos de cribado apropiados. A título de ejemplo ilustrativo, pueden identificarse inmunoglobulinas anti-proSP-B mediante inmunoprecipitación de lisados celulares marcados con ¹²⁵I a partir de células expresantes de proSP-B (ver Sánchez-Madrid *et al.*, 1986, y Hemler *et al.*, 1987). Las inmunoglobulinas anti-proSP-B también pueden identificarse mediante citometría de flujo, por ejemplo mediante la medición de la tinción fluorescente de células Ramos incubadas con un anticuerpo que se cree reconoce proSP-B.

Para las inmunoglobulinas monoclonales, se extraen de los animales inmunizados linfocitos, típicamente esplenocitos, fusionados con una línea celular inmortal, típicamente células de mieloma, tales como células de

mieloma SP2/0-Ag14, y se deja que se conviertan en células de hibridoma productoras de inmunoglobulinas monoclonales. Típicamente, la línea celular inmortal, tal como una línea celular de mieloma, se deriva de la misma especie de mamífero que los linfocitos. Son líneas celulares inmortales ilustrativas las líneas celulares de mieloma de ratón que son sensibles a medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT").

5 Típicamente las células de mieloma de ratón sensibles a HAT se fusionan con esplenocitos de ratón utilizando polietilenglicol de peso molecular 1.500 ("PEG 1500"). Las células de hibridoma resultantes de la fusión seguidamente pueden seleccionarse utilizando medio HAT, que elimina las células de mieloma no fusionadas o fusionadas improproductivamente (los esplenocitos no fusionados mueren tras varios días porque no han sido transformados).

10 Puede utilizarse cualquiera de entre varios métodos bien conocidos de la técnica para identificar una célula de hibridoma que produce una inmunoglobulina con las características deseadas. Típicamente, los sobrenadantes de cultivo de las células de hibridoma se criban para inmunoglobulinas contra el antígeno. Entre los métodos adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el cribado de los hibridomas con un ensayo de ELISA, el análisis de transferencia western o el radioinmunoensayo (Lutz *et al.*, Exp. Cell Res. 175:109-124, 1988). Los hibridomas preparados para producir inmunoglobulinas anti-proSP-B pueden cribarse, por ejemplo, sometiendo a ensayo el sobrenadante del cultivo de hibridoma para anticuerpos secretados que presenten la capacidad de unirse a una línea celular expresante de proSP-B recombinante. Para producir homólogos de anticuerpos que se encuentren comprendidos dentro del alcance de la invención, incluyendo, por ejemplo, homólogos de anticuerpo anti-proSP-B que sean inmunoglobulinas intactas, las células de hibridoma positivas en dichos ensayos de cribado pueden cultivarse en un medio nutritivo bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que las células de hibridoma secreten las inmunoglobulinas monoclonales al medio de cultivo. Las técnicas de cultivo de tejidos y los medios de cultivo adecuados para las células de hibridoma son bien conocidos de la técnica. El sobrenadante de cultivo de hibridoma condicionado puede recogerse y, por ejemplo las inmunoglobulinas anti-proSP-B,

15 opcionalmente pueden purificarse adicionalmente mediante métodos bien conocidos. Alternativamente, las inmunoglobulinas deseadas pueden producirse mediante inyección de las células de hibridoma en la cavidad peritoneal de un ratón no inmunizado. Las células de hibridoma proliferan en la cavidad peritoneal, secretando la inmunoglobulina, que se acumula en forma de líquido ascites. La inmunoglobulina puede recolectarse extrayendo el líquido ascites de la cavidad peritoneal con una jeringa.

20 Se clonan hibridomas que secretan las inmunoglobulinas deseadas y se determina la clase y subclase utilizando procedimientos conocidos de la técnica. Para las inmunoglobulinas policlonales, se aíslan antisueros que contienen inmunoglobulinas a partir del animal inmunizado y se criban para la presencia de inmunoglobulinas con la especificidad deseada utilizando uno de los procedimientos anteriormente descritos. Los anticuerpos anteriormente descritos también pueden inmovilizarse sobre un soporte sólido. Entre los ejemplos de dichos soportes sólidos se incluyen plásticos tales como policarbonato, carbohidratos complejos como agarosa y sefarosa, resinas acrílicas tales como poliacrilamida y perlas de látex. Las técnicas para acoplar anticuerpos a dichos soportes sólidos son bien conocidas de la técnica.

25 Se dispone de una pluralidad de tecnologías convencionales para seleccionar una inmunoglobulina, fragmento de inmunoglobulina o molécula de unión proteica. Li *et al.* (Organic & Biomolecular Chemistry 4:3420-3426, 2006), por ejemplo, han demostrado cómo un fragmento Fv de cadena sencilla capaz de formar un complejo con un adaptador de ADN seleccionado puede obtenerse utilizando la expresión fágica. Las técnicas de expresión, por ejemplo, permiten la generación de inmunoglobulinas y ligandos construidos con afinidad elevada para una molécula diana seleccionada. De esta manera, también resulta posible expresar una matriz de péptidos o proteínas que sólo difieren ligeramente, típicamente mediante manipulación genética. De esta manera resulta posible cribar y posteriormente hacer evolucionar proteínas o péptidos en términos de las propiedades de interacción y los parámetros biofísicos. Pueden aplicarse *in vitro* rondas iterativas de mutación y selección.

30 La tecnología de expresión *in vitro* para la selección de péptidos y proteínas se basa en un enlace físico entre el péptido o proteína y un ácido nucleico codificante del mismo. Se ha establecido para este fin un gran panel de técnicas, siendo las más comúnmente utilizadas la expresión fágica/vírica, la expresión ribosómica, la expresión en superficie celular, "péptidos sobre plásmidos", la expresión de ARNm, la expresión de ADN y la compartimentalización *in vitro*, incluyendo la expresión en micropérlas (para revisiones ver, por ejemplo, Rothe A. *et al.*, FASEB J. 20:1599-1610, 2006; Sergeeva A. *et al.*, Advanced Drug Delivery Reviews 58:1622-1654, 2006).

35 También se encuentran disponible diferentes medios de unir físicamente una proteína o péptido y un ácido nucleico. La expresión en una célula con una molécula de superficie celular, la expresión como polipéptido de fusión con una proteína de cubierta vírica/fágica, un complejo *in vitro* estabilizado de una molécula de ARN, el ribosoma y el polipéptido respectivo, el acoplamiento covalente *in vitro* mediante una molécula de puomicina o mediante micropérlas son ejemplos de maneras de unir la proteína/péptido y el ácido nucleico utilizadas actualmente en la técnica. Una técnica de expresión adicional se basa en una emulsión de agua en aceite. Las gotas de agua sirven como compartimientos en cada uno de los cuales se transcribe y se traduce un único gen (Tawfik D.S. y Griffiths

- A.D., Nature Biotech. 16:652-656, 1998; solicitud de patente nº US 2007/0105117). El enlace físico entre el péptido o proteína y el ácido nucleico (codificante del mismo) proporciona la posibilidad de recuperar el ácido nucleico codificante de la proteína o péptido seleccionado. En comparación con técnicas tales como la inmunoprecipitación, en las técnicas de expresión, de esta manera, no sólo pueden identificarse o seleccionarse parejas de unión de una molécula diana seleccionada, sino que puede recuperarse y utilizarse para el procesamiento adicional el ácido nucleico de dichas parejas de unión. De esta manera, las técnicas actuales de expresión proporcionan medios para, por ejemplo, la identificación de dianas y cabezas de serie y de optimización de las mismas. Potencialmente pueden cribarse a gran escala amplísimas bibliotecas de péptidos o proteínas, por ejemplo de anticuerpos.
- 5 Tal como se ha indicado anteriormente, puede acoplarse un marcador detectable a una pareja de unión de proSP-B o a una molécula que forma un complejo con la pareja de unión de proSP-B. Un marcador detectable respectivo, que puede acoplarse a una pareja de unión de proSP-B o a una molécula que forma un complejo con la misma, puede ser un marcaje ópticamente detectable, un fluoróforo o un cromóforo. Entre los ejemplos de marcajes adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, una molécula orgánica, un enzima, una fracción radioactiva, fluorescente y/o cromogénica, una fracción luminiscente, un hapteno, digoxigenina, biotina, un complejo metálico, un metal y oro coloidal. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, puede utilizarse un pigmento fluorescente excitable, un marcaje radioactivo, incluido por ejemplo en un aminoácido radioactivo, una proteína fluorescente o un enzima, por ejemplo para detectar el nivel de CD62L o el nivel de PSGL-1. Entre los ejemplos de pigmentos fluorescentes adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, isotiocianato de fluoresceína, 5,6-carboximetil-fluoresceína, Cascade Blue[®], Oregon Green[®], rojo Texas, nitroben-2-oxa-1,3-diazol-4-ilo, coumarina, cloruro de dansilo, rodamina, aminometil-coumarina, DAPI, eosina, eritrosina, BODIPY[®], pireno, lisamina, xanteno, acridina, una oxazina, ficoeritrina, un pigmento Cy, tal como Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5PE, Cy5.5, Cy7, Cy7PE o Cy7APC, un pigmento Alexa, tal como Alexa 647, y PBN (pigmento básico naftol). Entre los ejemplos de proteína fluorescente adecuada se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, EGFP, esmeralda, EYFP, una ficobiliproteína tal como ficoeritrina (PE) o aloficocianina, proteína fluorescente roja monomérica (PFRm), Naranja_m, Ciruela_m y Cereza_m. En algunas realizaciones, puede utilizarse una proteína fluorescente fotocambiable tal como Dronpa, bsDronpa y Padron (Andresen M. *et al.*, Nature Biotechnology 26, 9, 1035, 2008). Respecto a los enzimas adecuados, pueden servir como ejemplos ilustrativos, la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de soja o la peroxidasa de rábano picante. Entre los marcajes radioactivos típicos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P y ³³P. Puede detectarse un marcaje radioactivo mediante cualquier método conocido y apropiado, tal como una película fotosensible o una placa de fósforo fotoestimulable ("Phosphorimager"). En algunas realizaciones, entre los métodos de detección pueden incluirse la electroforesis, la HPLC, la citometría de flujo, la espectroscopía de correlación de fluorescencia o una forma modificada de dichas técnicas. Algunas o la totalidad de dichas etapas puede ser parte de un sistema automatizado de separación/detección.
- 10 15 20 25 30 35
- En algunas realizaciones, entre los métodos de detección pueden incluirse la electroforesis, la HPLC, la citometría de flujo, la espectroscopía de correlación de fluorescencia o una forma modificada de dichas técnicas. Algunas o la totalidad de dichas etapas puede ser parte de un sistema automatizado de separación/detección.
- 40 La determinación de la cantidad de proSP-B en la muestra puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica adecuada disponible. Un ejemplo ilustrativo de una técnica adecuada a este respecto es un ensayo de radiomarcaje, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un inmunoensayo enzimático, tal como un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), precipitación (particularmente inmunoprecipitación), un ensayo enzimático inmunológico de tipo sándwich, un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia de tipo sándwich (ECLIA), un fluoroinmunoensayo de disociación incrementada por lantánidos (DELFA), un ensayo de proximidad de centelleo (SPA), turbidimetría, nefelometría, turbidimetría incrementada por látex o nefelometría, o un ensayo inmunológico de fase sólida. Pueden utilizarse métodos adicionales conocidos de la técnica (tales como la electroforesis en gel, la electroforesis en gel 2D, la electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), transferencia western y espetrometría de masas), solos o en combinación con marcaje u otros métodos de detección tal como se indica en la presente memoria.
- 45 50 55
- Aunque un RIA se basa en la medición de la radioactividad asociada a un complejo formado entre una inmunoglobulina o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina y un antígeno, un ELISA se basa en la medición de una reacción enzimática asociada a un complejo formado entre una inmunoglobulina y una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina y un antígeno. Típicamente un ensayo de radiomarcaje o un inmunoensayo enzimático implica una o más etapas de separación en las que una pareja de unión de, por ejemplo, proSP-B, que no ha formado un complejo con proSP-B, es eliminada, dejando únicamente de esta manera pareja de unión de proSP-B, que ha formado un complejo con proSP-B. Lo anterior permite la generación de señales específicas originadas por la presencia de proSP-B.
- 60 Un ensayo ELISA o RIA puede ser competitivo para medir la cantidad de proSP-B, es decir, la cantidad de antígeno. Por ejemplo, se mezcla un antígeno marcado enzimáticamente, con una muestra de ensayo que contiene antígeno, el cual compete para una cantidad limitada de inmunoglobulina o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina. El antígeno reaccionado (nido) seguidamente se separa del material libre y se estima su actividad enzimática mediante la adición de sustrato. Un método alternativo para la medición del antígeno es la

técnica de sándwich de doble inmunoglobulina/molécula de unión proteica. En esta modificación, se recubre una fase sólida con inmunoglobulina específica o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina. A continuación lo anterior se hace reaccionar con la muestra procedente del sujeto, la cual contiene el antígeno. A continuación, se añade inmunoglobulina específica/molécula de unión proteica marcada enzimáticamente, seguida del sustrato del enzima. De esta manera se 'captura' el 'antígeno' en la muestra de ensayo y se inmoviliza sobre la fase sólida sensibilizada, en donde puede inmovilizar la inmunoglobulina/molécula de unión proteica marcada enzimáticamente. Esta técnica es análoga a los ensayos inmunoradiométricos.

En un método ELISA indirecto, se inmoviliza un antígeno mediante adsorción pasiva sobre la fase sólida. Seguidamente puede incubarse un suero de ensayo con la fase sólida y cualquier inmunoglobulina en el suero de ensayo forma un complejo con el antígeno sobre la fase sólida. De manera similar, puede incubarse una solución de una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina con la fase sólida, permitiendo la formación de un complejo entre el antígeno sobre la fase sólida y la molécula de unión proteica. Tras el lavado para eliminar los componentes de suero no reaccionados, una inmunoglobulina anti-inmunoglobulina anti-molécula de unión proteica, unida a un enzima, se pone en contacto con la fase sólida y se incuba. En el caso de que se seleccione como segundo reactivo una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina, se utiliza una molécula de unión proteica respectiva que se une específicamente con la molécula de unión proteica o con la inmunoglobulina dirigida contra el antígeno. Se forma un complejo entre la segunda molécula de unión proteica o inmunoglobulina y la primera molécula de unión proteica o inmunoglobulina, unida al antígeno. Un nuevo lavado elimina el material no reaccionado. En el caso del RIA, se detectan las señales de radioactividad. En el caso del ELISA, se añade el sustrato del enzima. Su cambio de color será una medida de la cantidad de complejo inmovilizado en el que participa el antígeno, la cual es proporcional al nivel de anticuerpo en la muestra de ensayo.

En otra realización, la inmunoglobulina o la molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina puede inmovilizarse sobre una superficie, tal como la superficie de una perla de polímero (*supra*) o recubrirse sobre la superficie de un dispositivo, tal como una placa de polímero o una placa de vidrio. Como resultado, los complejos inmunológicos pueden separarse fácilmente de otros componentes presentes mediante simplemente el lavado de la superficie, por ejemplo las perlas o la placa. Éste es el método más común utilizado actualmente en la técnica y se denomina RIA o ELISA de fase sólida. La presente realización puede resultar particularmente útil para determinar la cantidad de proSP-B. De manera general, en cualquier realización de un ensayo de radiomarcaje o de un inmunoensayo enzimático, puede utilizarse la adsorción pasiva a la fase sólida en la primera etapa. La adsorción de otros reactivos puede evitarse mediante la inclusión de agentes humectantes en todas las etapas posteriores de lavado e incubación. Puede resultar ventajoso llevar a cabo el lavado para evitar el arrastre de reactivos de una etapa a la siguiente.

En la técnica se han utilizado otras modificaciones diversas del ELISA. Por ejemplo un sistema en el que la segunda molécula de unión proteica o la inmunoglobulina utilizada en el método de tipo sándwich de doble anticuerpo es de una especie diferente, y ésta seguidamente se hace reaccionar con un conjugado de anti-inmunoglobulina y enzima o un conjugado de anti-molécula de unión proteica y enzima. Esta técnica incorpora la ventaja potencial de que evita el marcateo de la inmunoglobulina o molécula de unión proteica específica, que puede ser escasa y de baja potencia. Esta misma técnica puede utilizarse para someter a ensayo una inmunoglobulina o molécula de unión proteica en la que únicamente se disponga de un antígeno impuro; los antígenos reactivos específicos son seleccionados por el anticuerpo inmovilizado sobre la fase sólida.

En otro ejemplo de un ensayo ELISA para el antígeno, un antígeno específico es inmovilizado en una superficie, por ejemplo se utiliza una placa, y seguidamente la superficie se incuba con una mezcla de inmunoglobulinas o moléculas de unión proteicas de referencia y una muestra de ensayo. En el caso de que no haya antígeno en la muestra de ensayo, la inmunoglobulina o molécula de unión proteica de referencia se fijará a una superficie sensibilizada con antígeno. En el caso de que haya antígeno en la solución de ensayo, éste se combinará con la inmunoglobulina o molécula de unión proteica de referencia, que seguidamente no podrá reaccionar con la fase sólida sensibilizada. La cantidad de inmunoglobulina/molécula de unión proteica unida en este caso está indicada por un conjugado de anti-globulina/anti-molécula de unión marcado con enzima y sustrato de enzima. El nivel de inhibición de la degradación del sustrato en la muestra de ensayo (en comparación con el sistema de referencia) es proporcional a la cantidad de antígeno en el sistema de ensayo.

Tal como se ha indicado anteriormente, determinar la cantidad de proSP-B en la muestra típicamente implica la formación de señales, por ejemplo señales generados por un marcador detectable (*supra*) que pueden cuantificarse. La cuantificación de las señales con el fin de determinar la cantidad de proSP-B en la muestra puede llevarse a cabo mediante la comparación de las señales obtenidas con las de una o más mediciones de referencia. Una medición de referencia respectiva generalmente se basa en la señal generada por una cantidad conocida de proSP-B. Dicha cantidad conocida de proSP-B puede encontrarse presente, por ejemplo, en una muestra con una composición que sea similar a la de la muestra del paciente, en la que debe determinarse la cantidad de proSP-B. Puede utilizarse una muestra de referencia respectiva para definir una muestra de referencia externa. En algunas realizaciones de un

método de la invención, puede utilizarse adicionalmente o alternativamente una muestra de referencia interna. Dicha muestra de referencia interna es una muestra obtenida del sujeto en un punto del tiempo anterior. Puede determinarse la cantidad de proSP-B en dicha muestra para identificar los cambios en los niveles de proSP-B en el sujeto.

5 En el método según la invención, por ejemplo un método para evaluar la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva en un sujeto, puede compararse la cantidad de proSP-B determinada en la muestra con un valor umbral. Dicho valor umbral puede, en algunas realizaciones, ser un valor umbral predeterminado. En algunas realizaciones, el valor umbral se basa en la cantidad de proSP-B en una muestra de control. Una muestra de control respectiva
10 puede presentar cualquier condición que difiera respecto a la medición principal de la muestra misma. Dicha muestra de control puede ser o incluir una muestra del líquido corporal correspondiente como muestra del sujeto. Una muestra de control puede ser, por ejemplo, una muestra, tal como una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero, de un sujeto que es conocido que no sufre de enfermedad pulmonar obstructiva. Una muestra de control también puede ser de un sujeto que es conocido que no sufre de enfermedad pulmonar
15 obstructiva exacerbada. En algunas realizaciones, una muestra de control respectiva de un sujeto del mismo grupo de edad. En algunas realizaciones, una muestra de control respectiva es de un sujeto que es conocido que no presenta una enfermedad de confusión; en algunas realizaciones, es de un sujeto que es conocido que no presenta ninguna enfermedad.

20 En algunas realizaciones, un valor umbral es una colección de datos de una pluralidad de muestras de control, que también pueden denominarse muestras de referencia. En dichas realizaciones, el valor umbral puede fijarse en una diferencia significativa entre el control y la muestra del sujeto de interés. El término "significativo" se utiliza para indicar que el nivel de incremento es estadísticamente relevante. A título de ejemplo ilustrativo, pueden haberse obtenido del sujeto de interés una pluralidad de mediciones, incluyendo una pluralidad de muestras. A continuación,
25 puede determinarse el valor de p. Un valor de p de 0,05, 0,02, 0,01 ó inferior puede considerarse que indica la existencia de una diferencia. En algunas realizaciones, un incremento significativo es una desviación de un valor de una muestra de ensayo respecto de un valor de una muestra de control de aproximadamente 2 veces o más, incluyendo de 3 veces o más, tal como de entre por lo menos aproximadamente 5 y aproximadamente 10 veces o incluso superior.

30 En algunas realizaciones, el valor umbral se basa en un valor de control o de referencia obtenido concomitantemente con el valor de la muestra del sujeto. En algunas realizaciones se determina un valor de control o de referencia respectivo en un punto temporal diferente, por ejemplo en un punto temporal anterior a la medición de la muestra del sujeto. Se entiende que los términos control y referencia pueden ser, en algunas realizaciones, un
35 intervalo de valores.

La comparación entre un valor umbral, que puede ser un valor umbral predeterminado, puede llevarse a cabo manualmente, semiautomáticamente o de una manera totalmente automatizada. En algunas realizaciones, la comparación puede ser asistida por ordenador. Una comparación asistida por ordenador puede utilizar valores
40 almacenados en una base de datos como referencia para comparar un valor obtenido o una cantidad determinada, por ejemplo mediante un algoritmo implementado por ordenador. De manera similar, puede llevarse a cabo una comparación con una medición de referencia manualmente, semiautomáticamente o de una manera totalmente automatizada, incluyendo de una manera asistida por ordenador.

45 Puede fijarse un valor umbral predeterminado, en algunas realizaciones, basándose en los datos recogidos de pacientes que es conocido que sufren de EPOC sin exacerbaciones. En algunas realizaciones, puede utilizarse un determinado percentil de dichos datos como valor umbral. El intervalo de los valores de un conjunto de datos obtenido de dichos pacientes puede dividirse en 100 partes iguales, es decir, pueden determinarse porcentajes del intervalo. Un percentil representa el valor dentro del intervalo respectivo bajo el que se encuentra un determinado
50 porcentaje de los datos, en otras palabras el porcentaje de los valores que son inferiores a dicho valor. Por ejemplo, el percentil 95 es el valor bajo el que se encuentra el 95 por ciento de los datos. En algunas realizaciones, puede considerarse que un nivel de proSP-B se encuentra incrementada o elevado en el caso de que sea superior al percentil 90, superior al percentil 92, superior al percentil 93, superior al percentil 94, superior al percentil 95, superior al percentil 96, superior al percentil 97, superior al percentil 98 ó superior al percentil 99.

55 En algunas realizaciones, el valor medio de los datos de pacientes que es conocido que sufren de EPOC sin exacerbaciones puede determinarse y utilizarse para determinar un valor umbral. A título de ejemplo ilustrativo, el valor de la desviación estándar o desviación estándar relativa, en algunas realizaciones multiplicada por un factor, puede ser superior o inferior a 1. En algunas realizaciones, puede añadirse al valor medio determinado un múltiple
60 de la desviación estándar o desviación estándar relativa, tal como 1,2, 1,5 ó 2 veces la desviación estándar. En algunas realizaciones, establecer un valor umbral predeterminado incluye la recogida de los pacientes que es conocido que sufren de EPOC sin exacerbaciones durante un periodo de tiempo, tal como una pluralidad de meses. Los niveles medios de proSP-B, desviación estándar y desviación estándar relativa en tiempos dados pueden

calcularse para los pacientes con el fin de determinar un intervalo de valores de proSP-B asociado a la EPOC sin exacerbaciones de la misma. En algunas realizaciones, puede utilizarse como valor umbral predeterminado una media de un número seleccionado, tal como 2, 3, 4, 5 ó más de los niveles más altos de proSP-B determinados durante el tiempo. En algunas realizaciones, puede determinarse el valor medio de todos los datos recogidos en diferentes puntos temporales y utilizarse para determinar un valor umbral, por ejemplo mediante la adición de la desviación estándar, la desviación estándar relativa o, por ejemplo, un múltiplo de la misma (*supra*). Tras recoger el resultado de ensayo de un paciente que debe evaluarse, se compara con el valor umbral. Se determinan las diferencias estadísticas entre el resultado de ensayo y el valor umbral con el fin de identificar las varianzas significativas entre ellos.

La cantidad de proSP-B determinada en una muestra de un sujeto o a partir de una muestra de un sujeto puede compararse con una única muestra de control o con una pluralidad de muestras de control, tal como una muestra de un sujeto de control, de cualquier manera adecuada. A título de ejemplo ilustrativo, el nivel de proSP-B en una muestra de control puede caracterizarse como un valor promedio (media) emparejado a un valor de desviación estándar, por ejemplo en un punto temporal dado. En algunas realizaciones, el nivel de proSP-B en un sujeto puede considerarse incrementado en el caso de que sea una desviación estándar o más superior al valor promedio del nivel de expresión correspondiente determinado en una o más muestras de control. En algunas realizaciones, el nivel determinado de proSP-B se considera incrementado en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 1,5 desviaciones estándares superior o inferior, incluyendo aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro o más desviaciones estándares superior o inferior al valor promedio determinado en una muestra de control. En algunas realizaciones, la cantidad determinada de proSP-B se considera diferente en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 1,2 veces o más superior o inferior, incluyendo aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces o más superior o inferior al nivel de la proteína determinado en una muestra de control. En algunas realizaciones, el nivel determinado de proSP-B se considera incrementado en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 0,8 veces o menos, incluyendo aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 20% o menos respecto al nivel de proSP-B determinado en una muestra de control.

En el caso de que, por ejemplo, se detecte un nivel de proSP-B superior a, por ejemplo un valor umbral predeterminado, ello puede indicar un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva. Un nivel de proSPB superior a un valor umbral puede indicar una condición en la que el sujeto sufre de EPOC exacerbada grave. En el caso de que se detecte un nivel de proSP-B que es inferior a un valor umbral predeterminado, ello puede indicar que no se ha producido ningún incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva.

De manera similar, el método descrito anteriormente puede utilizarse para diagnosticar la gravedad de la EPOC en un sujeto (*supra*) que se sospecha o que se conoce que sufre de un incremento de la gravedad de la EPOC. La detección de la cantidad de proSP-B y la comparación de la misma con un valor umbral puede llevarse a cabo tal como se ha indicado anteriormente. Un nivel de proSP-B superior a un valor umbral predeterminado puede indicar una condición en la que el sujeto sufre de EPOC exacerbada grave. Un nivel de proSP-B inferior a un valor umbral predeterminado puede indicar en algunas realizaciones una condición en la que el sujeto sufre de EPOC exacerbada moderada.

En un método según la invención tal como se ha indicado anteriormente, el sujeto del que se origina la muestra es generalmente conocido que presenta enfermedad pulmonar obstructiva. Una cantidad incrementada de proSP-B, o de una parte de la misma, respecto al valor umbral, indica un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva, y viceversa. Un método tal como se ha descrito anteriormente puede ser además, en algunas realizaciones, un método para evaluar la probabilidad de supervivencia de un sujeto con enfermedad pulmonar obstructiva. Es generalmente conocido que el sujeto presenta enfermedad pulmonar obstructiva. Una cantidad incrementada de proSP-B, o de una parte de la misma, respecto al valor umbral, podría indicar una baja probabilidad de supervivencia de la enfermedad pulmonar obstructiva.

En algunas realizaciones, la cantidad de proSP-B en una muestra se detecta iterativamente. En algunas realizaciones, la detección repetida se lleva a cabo en diferentes muestras del mismo individuo. En algunas realizaciones, se lleva a cabo una pluralidad de mediciones en una pluralidad de muestras del mismo paciente. En cada una de las muestras se determina el nivel de expresión de proSP-B. Típicamente el nivel de expresión determinado en cada una de las muestras se compara con un valor umbral, tal como se ha detallado anteriormente. En algunas realizaciones, la pluralidad de muestras del mismo individuo se recoge durante un periodo de tiempo en determinados intervalos de tiempo, incluyendo en intervalos de tiempo predeterminados. A título de ejemplo ilustrativo, puede obtenerse muestras del mismo sujeto a intervalos de tiempo de aproximadamente 72 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 32 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 2 horas,

aproximadamente 1 hora, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 25 minutos, aproximadamente 20 minutos, aproximadamente 15 minutos o menos. Dicha realización puede considerarse un método de seguimiento de la cantidad de proSP-B. Pueden utilizarse muestras emparejadas en algunas realizaciones con el fin de determinar un valor umbral para cada punto temporal correspondiente. Puede determinarse el valor promedio y calcularse la desviación estándar para cada punto temporal dado. Un valor determinado en la muestra del sujeto que caiga fuera de la media más 1 desviación estándar puede ser indicativo, por ejemplo, de una gravedad elevada de la enfermedad pulmonar obstructiva.

El seguimiento de la cantidad de proSP-B puede incluirse en el contexto del seguimiento de una terapia, por ejemplo para evaluar la eficacia de la misma o para evaluar la respuesta de un sujeto a un determinado tratamiento.

En realizaciones en las que la muestra es una muestra de sangre, plasma o suero humano de un paciente sin historia de insuficiencia cardíaca, un valor umbral adecuado puede ser un valor de aproximadamente 35 ng/ml de proSP-B. De manera similar, para una muestra de sangre, plasma o suero humano de un paciente sin historia de insuficiencia cardíaca, un valor umbral adecuado puede ser un valor de aproximadamente 65 ng/ml de la parte de proSP-B que se define como, o que corresponde a, las posiciones aminoácidas 285 a 334 de la secuencia de Swissprot/Uniprot número de acceso P07988. Un valor superior a aproximadamente 35 ng/ml de proSP-B, incluyendo superior a aproximadamente 40 ng/ml, superior a aproximadamente 45 ng/ml o superior a aproximadamente 50 ng/ml de proSP-B, podría indicar un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva. Un valor superior a aproximadamente 65 ng/ml, incluyendo superior a aproximadamente 70 ng/ml, superior a aproximadamente 75 ng/ml, superior a aproximadamente 80 ng/ml, superior a aproximadamente 85 ng/ml, superior a aproximadamente 90 ng/ml, superior a aproximadamente 95 ng/ml, superior a aproximadamente 100 ng/ml, superior a aproximadamente 105 ng/ml, superior a aproximadamente 110 ng/ml o superior a aproximadamente 115 ng/ml de la parte efectiva respectiva de proSP-B puede indicar un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva. A este respecto, un paciente sin historia de insuficiencia cardíaca es un paciente que no ha sufrido previamente de insuficiencia cardíaca o un sujeto del que no se conocen suficientes síntomas, que permitiría el diagnóstico de la incidencia de insuficiencia cardíaca o en el que se indicaría una evaluación de si deberían llevarse a cabo uno o más procedimientos/ensayos que permitiesen un diagnóstico de incidencia o no incidencia de insuficiencia cardíaca.

Tal como se ha explicado anteriormente, la enfermedad pulmonar obstructiva progresa de formas moderadas a graves. A este respecto, los presentes inventores han observado una correlación general entre la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva y el nivel de proSP-B. De esta manera, un nivel más alto de proSP-B es, en realizaciones típicas, una indicación de una mayor gravedad de la enfermedad. A título de ejemplo, para una muestra de sangre, plasma o suero humano de un paciente sin historia de insuficiencia cardíaca, una gravedad elevada de la enfermedad puede inferirse a partir de un valor de proSP-B que es igual o superior a aproximadamente 100 ng/ml, tal como igual o superior a aproximadamente 120 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 140 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 150 pg/ml, igual o superior a aproximadamente 160 pg/ml, igual o superior a aproximadamente 170 pg/ml, igual o superior a aproximadamente 180 pg/ml, igual o superior a aproximadamente 190 ng/ml o igual o superior a aproximadamente 200 ng/ml. En consecuencia, para una muestra de sangre, plasma o suero humano de un paciente sin historia de insuficiencia cardíaca, una gravedad elevada de la enfermedad puede inferirse a partir de un valor de la parte de proSP-B definida por o que corresponde a las posiciones aminoácidas 285 a 334 de la secuencia de Swissprot/Uniprot número de acceso P07988 igual o superior a aproximadamente 220 ng/ml, tal como igual o superior a aproximadamente 250 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 270 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 300 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 320 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 340 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 360 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 380 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 400 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 420 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 440 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 460 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 480 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 500 ng/ml, igual o superior a aproximadamente 520 ng/ml o igual o superior a aproximadamente 540 ng/ml.

Un método tal como se ha descrito anteriormente puede incluir además la detección de la cantidad del fragmento N-terminal de 76 aminoácidos del péptido natriurético cerebral (NT-proPNC) en la muestra. En algunas realizaciones, un método según la invención puede incluir la detección de la cantidad de péptido natriurético cerebral (PNC) en la muestra. En algunas realizaciones, un método tal como se ha descrito anteriormente puede incluir la detección de la cantidad de troponina T en la muestra. En algunas realizaciones, un método tal como se ha descrito anteriormente puede incluir la detección de la cantidad de troponina I en la muestra. En una realización, un método respectivo incluye la detección de la cantidad de NT-proPNC y troponina T en la muestra. En una realización, un método respectivo incluye la detección de la cantidad de NT-proPNC y troponina I en la muestra. Además, la cantidad o cantidades de NT-proPNC, troponina T y/o troponina I, según resulte aplicable, en la muestra se comparan con un valor umbral. Una cantidad incrementada de NT-proPNC, respecto al valor umbral, es adicionalmente indicativa de una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar. De manera similar, una cantidad incrementada de troponina T y/o troponina I, respecto al valor umbral, es adicionalmente indicativa de una complicación de la

enfermedad obstructiva pulmonar. Las explicaciones anteriormente proporcionadas de las técnicas de detección, los modos de medición y el establecimiento y uso de uno o más valores umbral se aplican *mutatis mutandis* a la determinación de los niveles de NT-proPNC, troponina T y troponina I.

- 5 El péptido natriurético cerebral, también conocido como péptido natriurético B o péptido natriurético de tipo B, puede ser cualquier variante o isoforma respectiva de la especie respectiva, por ejemplo el ser humano. La proteína puede ser, por ejemplo, la proteína humana de Swissprot/Uniprot número de acceso P16860 (versión 124 el 22 de febrero de 2012). La troponina T puede ser cualquier variante o isoforma respectiva de la especie respectiva, por ejemplo el ser humano. La proteína puede ser, por ejemplo, la isoforma cardíaca humana de la proteína, que presenta el número de acceso P45379 de Swissprot/Uniprot (versión 123 el 22 de febrero de 2012). La troponina I puede ser cualquier variante o isoforma respectiva de la especie respectiva, tal como el ser humano. La proteína puede ser la isoforma cardíaca humana de la proteína, que presenta el número de acceso P19429 de Swissprot/Uniprot (versión 124 el 22 de febrero de 2012).
- 10
- 15 De acuerdo con lo anterior, un método que incluye, por ejemplo, la determinación de la cantidad de proSP-B y NT-proPNC, un método que incluye la determinación de la cantidad de proSP-B y troponina T, un método que incluye la determinación de la cantidad de proSP-B y troponina I, o un método que incluye la determinación de la cantidad de proSP-B, NT-proPNC y troponina T y/o troponina I es, en algunas realizaciones, un método en el que se está diagnosticando una complicación de la enfermedad obstructiva crónica. En algunas realizaciones de dicho método, la muestra es una muestra de un ser humano sin historia de insuficiencia cardíaca.
- 20

En algunas realizaciones de un método según la invención, en las que se determina un nivel de NT-proPNC y/o un nivel de troponina T, la muestra se origina, por ejemplo se ha obtenido de, un sujeto que es conocido que no sufre de función renal alterada o reducida. Una función reducida de los riñones puede resultar en una acumulación de NT-proPNC y/o troponina T, causando de esta manera niveles elevados de los mismos. En algunas realizaciones de un método según la invención, en las que se determina un nivel de proSP-B, la muestra se origina, por ejemplo se ha obtenido de, un sujeto que es conocido que no sufre de función renal alterada o reducida.

25

En el caso de que la muestra sea una muestra procedente de un ser humano que no presenta una historia de insuficiencia cardíaca, una cantidad incrementada de NT-proPNC, respecto al valor umbral, es adicionalmente indicativa de una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar. De manera similar, una cantidad incrementada de troponina T y/o troponina I, respecto al valor umbral, es adicionalmente indicativa de una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar. Un valor superior a aproximadamente 220 pg/ml de NT-proBNP, incluyendo superior a aproximadamente 250 pg/ml, superior a aproximadamente 270 pg/ml, superior a aproximadamente 300 pg/ml, superior a aproximadamente 320 pg/ml, superior a aproximadamente 350 pg/ml, superior a aproximadamente 370 pg/ml o superior a aproximadamente 400 pg/ml de proSP-B podría indicar una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar. Un valor superior a aproximadamente 3 pg/ml de troponina T, incluyendo superior a aproximadamente 5 pg/ml, superior a aproximadamente 7 pg/ml, superior a aproximadamente 8 pg/ml, superior a aproximadamente 9 pg/ml, superior a aproximadamente 10 pg/ml, superior a aproximadamente 11 pg/ml o superior a aproximadamente 12 pg/ml de troponina T podría indicar una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar.

30

35

40

En el caso de que en un método según la invención la muestra sea una muestra procedente de un ser humano que no presenta una historia de insuficiencia cardíaca, el valor umbral se basa ventajosamente en muestras obtenidas previamente del sujeto, es decir en un punto del tiempo en que el sujeto es conocido que no sufría de una gravedad elevada de enfermedad obstructiva pulmonar. En algunas realizaciones, la muestra procede de un ser humano que presenta una historia de insuficiencia cardíaca y se sospecha que el ser humano sufre de un estado de enfermedad obstructiva pulmonar de gravedad incrementada. Una cantidad incrementada de proSP-B, respecto al valor umbral, indica que el sujeto sufre de enfermedad obstructiva pulmonar exacerbada. Una cantidad incrementada de NT-proPNC, respecto al valor umbral, es adicionalmente indicativa de una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar.

45

50

La insuficiencia cardíaca es un síndrome común bien conocido de la técnica. La insuficiencia cardíaca puede ser del lado derecho y/o del lado izquierdo. A este respecto, la disfunción ventricular izquierda es la causa principal de insuficiencia ventricular derecha. Un sujeto con insuficiencia cardíaca izquierda generalmente presenta síntomas de gasto cardíaco bajo y presión venosa pulmonar elevada, típicamente asociada a disnea. La falta de aliento es la queja más común de los sujetos que sufren de insuficiencia ventricular izquierda, con frecuencia acompañada de tos crónica que puede pasarse por alto con facilidad. La fatiga y la intolerancia al ejercicio también son síntomas comunes informados por los pacientes con insuficiencia cardíaca izquierda. Tal como puede observarse, por ejemplo, de la similitud de los síntomas con los síntomas de la enfermedad obstructiva pulmonar, los primeros estadios de la insuficiencia cardíaca pueden permanecer ocultos como insuficiencia cardíaca, es decir no ser diagnosticados, en particular en el caso de que no se conozca historia de insuficiencia cardíaca. Además, los síntomas de los estadios leves de la insuficiencia cardíaca, tales como la clase I y la clase II según la clasificación de la New York Heart

55

60

Association (NYHA), por ejemplo la fatiga, pueden interpretarse erróneamente como astenia primaveral o atribuirse a una condición diferente, tal como la depresión o una enfermedad maligna. En algunas realizaciones en las que se aplica un método según la presente invención, de esta manera debe considerarse que puede haberse seleccionado un valor umbral inapropiado. Como salvaguarda puede resultar ventajoso bajo dichas circunstancias utilizar muestras obtenidas del mismo sujeto en un punto temporal anterior (*supra*) como referencia.

Una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar puede ser cualquier complicación conocida de la EPOC. Típicamente la complicación es una infección sistémica. Una complicación respectiva puede ser, en algunas realizaciones, una exacerbación aguda de la EPOC, que se pone de manifiesto como un incremento abrupto de los síntomas. La respuesta del sistema inmunológica a la infección sistémica se conoce como síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (SRIS). En algunas realizaciones la complicación es la sepsis. Tanto la SRIS como la sepsis pueden ser una respuesta a cualquier clase de microorganismo, incluyendo, aunque sin limitación, bacterias, tanto Gram-negativas como Gram-positivas, hongos y virus. Se entiende que en un estado respectivo es en gran medida la respuesta inflamatoria misma la que puede conducir a daños en los tejidos y a la muerte, y no la infección. El síndrome se acompaña de la activación de varios tipos de células, incluyendo linfocitos, macrófagos, células dendríticas, células endoteliales, plaquetas y neutrófilos. La SRIS es una respuesta inflamatoria excesiva que puede caracterizarse por una liberación de numerosos mediadores proinflamatorios, con frecuencia se observa una producción elevada de citoquinas, tales como TNF-alfa, IL-1, IL-6, IL-8 y PAF. La dilatación de los vasos sanguíneos, seguida de la adhesión masiva de neutrófilos a las paredes de capilares, la activación de los neutrófilos, que conduce a la liberación de proteasas y radicales de oxígeno pueden conducir a daños en las paredes de los capilares. Además, la vasodilatación prolongada y la mayor permeabilidad capilar pueden resultar en la entrada de plasma en los tejidos. La vasodilatación prolongada resulta además en una resistencia vascular disminuida que, a su vez, provoca hipotensión. Además, la activación de la ruta de la coagulación sanguínea y una regulación negativa concurrente de los mecanismos anticoagulatorios causa la formación de coágulos dentro de los vasos sanguíneos en todo el cuerpo (coagulación intravascular diseminada). La permeabilidad capilar incrementada y el daños a los capilares de los alveolos pulmonares puede resultar en inflamación aguda, edema pulmonar y la pérdida de intercambio gaseoso. A esto se le denomina síndrome del distrés respiratorio agudo (SDRA). La cascada de sucesos anteriormente indicada puede resultar en choque séptico irreversible, fallo orgánico de múltiples sistemas y la muerte.

Para individuos humanos de 16 ó más años, se diagnostica SRIS sin complicaciones orgánicas en el caso de que se den dos o más de los criterios siguientes: temperatura corporal inferior a 36°C o superior a 38°C, taquicardia con una tasa cardiaca superior a aproximadamente 90 latidos por minuto, taquipnea con más de 20 respiraciones por minuto o una presión arterial parcial de dióxido de carbono inferior a 4,3 kPa, recuentos leucocitarios inferiores a 4.000 células/mm³ (4x10⁹ células/l) o superior a 12.000 células/mm³ (12x10⁹ células/l) o superior a 10% de neutrófilos inmaduros (formas de bandas).

La rápida identificación de SRIS y en particular de sepsis y sus microorganismos causativos es la base del tratamiento exitoso. Por desgracia, ambos pueden resultar difíciles con los métodos actualmente disponibles clínicamente. Por lo tanto, el experto en la materia apreciará que un método según la invención en el que se determinen los niveles de proSP-B y uno o más de entre NT-proPNC, troponina T y troponina I, proporcionará un medio rápido y fiable de diagnosticar SRIS.

La sepsis, así como la SRIS grave, es conocido que implican alteraciones cardiacas. Además, es conocido que NT-proPNC, PNC, troponina T y troponina I se encuentran elevada en los pacientes con daños cardiacos e insuficiencia cardiaca. Sin restringirse a ninguna teoría en particular, el resultado de los inventores que los niveles incrementados de estas proteínas indica una complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar tal como SRIS podría apuntar a una participación cardiaca en los estadios del SRIS anteriores al SRIS grave.

Con respecto a la fijación de un valor umbral para NT-proPNC, PNC, troponina T y troponina I, resultan aplicables *mutatis mutandis* las explicaciones anteriormente proporcionadas sobre la utilización de valores de muestra de control y los cálculos. De esta manera, con una pluralidad de muestras de control en comparación con un valor en una muestra de NT-proPNC, PNC, troponina T y/o troponina I, un valor de p de 0,05, 0,02, 0,01 ó inferior puede considerarse que indica una diferencia, o un valor superior a, por ejemplo, el percentil 90, el percentil 92, el percentil 93, el percentil 94, el percentil 95, el percentil 96, el percentil 97, el percentil 98 ó el percentil 99, así como, por ejemplo, un valor de dos veces o más, incluyendo de 3 veces o más, tal como de entre por lo menos aproximadamente 5 y aproximadamente 10 veces el valor del marcador adicional en la muestra, puede considerarse un nivel elevado.

Tal como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona además la utilización de un agente de unión para la evaluación de la gravedad de la enfermedad obstructiva pulmonar en un sujeto. Lo anteriormente indicado con respecto a un método para la determinación de la gravedad de la enfermedad obstructiva pulmonar en un sujeto resulta aplicable *mutatis mutandis* a un uso correspondiente. En dicho uso, la cantidad de proSP-B determinada en

la muestra puede compararse con un valor umbral, que puede ser, en algunas realizaciones, un valor umbral predeterminado. Tal como se ha explicado anteriormente, en algunas realizaciones, el valor umbral se basa en la cantidad de proSP-B en una muestra de control (*supra*), que puede ser, por ejemplo, de un sujeto diferente que es conocido que no sufre de enfermedad obstructiva pulmonar, de un sujeto diferente que es conocido que no sufre de enfermedad obstructiva pulmonar exacerbada o del mismo sujeto en un tiempo en el que es conocido que el sujeto no presenta una gravedad incrementada de la enfermedad obstructiva pulmonar. Un valor umbral puede, en algunas realizaciones, ser una colección de datos de una pluralidad de muestras de control (*supra*). Tal como se ha explicado anteriormente, en el caso de que se haya determinado un valor de p de una pluralidad de mediciones, un valor de p de 0,05, 0,02, 0,01 ó inferior puede considerarse que indica una diferencia. En algunas realizaciones, una desviación de un valor de una muestra de ensayo respecto a un valor de una muestra de control de aproximadamente 2 veces o más, incluyendo de 3 veces o más, tal como de entre por lo menos aproximadamente 5 y aproximadamente 10 veces o incluso superior, puede considerarse un incremento significativo. Tal como se ha explicado anteriormente, en algunas realizaciones, puede utilizarse un determinado percentil de una colección de datos como valor umbral, por ejemplo un nivel de proSP-B superior al percentil 90, superior al percentil 92, superior al percentil 93, superior al percentil 94, superior al percentil 95, superior al percentil 96, superior al percentil 97, superior al percentil 98 o superior al percentil 99 puede considerarse como incrementado o elevado. En algunas realizaciones, el valor umbral puede basarse en que el valor de la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una pluralidad de mediciones de control y/o muestras de control, desviación estándar o desviación estándar relativa, por ejemplo, se multiplique por un factor, que puede ser superior o inferior a 1, tal como 1,2, 1,5 ó 2. En algunas realizaciones, puede utilizarse una media de un número seleccionado, tal como 2, 3, 4, 5 ó más de los niveles más altos de proSP-B determinados, por ejemplo en el tiempo, como un valor umbral predeterminado.

En algunas realizaciones, el nivel determinado de proSP-B se considera incrementado en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 1,5 desviaciones estándares superior o inferior, incluyendo aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro o más desviaciones estándares superior o inferior al valor promedio determinado en una muestra de control. En algunas realizaciones, la cantidad determinada de proSP-B se considera diferente en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 1,2 veces o más superior o inferior, incluyendo aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces o más superior o inferior al nivel de la proteína determinado en una muestra de control. En algunas realizaciones, el nivel determinado de proSP-B se considera incrementado en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 0,8 veces o menos, incluyendo aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 20% o menos respecto al nivel de proSP-B determinado en una muestra de control.

En algunas realizaciones, además de detectar la cantidad de proSP-B, o una parte efectiva de la misma, se detecta en la muestra una cantidad de NT-proPNC (*supra*), la cantidad de troponina T o troponina I, y la cantidad de proteína C-reactiva (PRC). La proteína C reactiva, también conocida como PTX1, puede ser cualquier variante o isoforma respectiva de la especie respectiva, por ejemplo el ser humano. La proteína puede ser, por ejemplo, la proteína humana de número de acceso P02741 de Swissprot/Uniprot (versión 152 el 22 de febrero de 2012).

Un método respectivo es un método para estratificar un sujeto para la terapia de la enfermedad obstructiva pulmonar. Los términos "estratificar" y "estratificación" tal como se utilizan en la presente memoria indican en un aspecto que los individuos se asignan a grupos con características similares, tales como un nivel de la enfermedad obstructiva pulmonar. A título de ejemplo ilustrativo, los individuos pueden estratificarse en categorías de riesgo, por ejemplo de si el individuo presenta o no una enfermedad en la que deban considerarse cambios potencialmente mortales. Los términos "estratificar" y "estratificación" tal como se utilizan en la presente memoria indican otro aspecto que los individuos se asignan a grupos con características similares, tales como un nivel de la enfermedad obstructiva pulmonar. Los grupos pueden ser, por ejemplo, para el ensayo, prescripción, suspensión o abandono de uno o más cualesquiera de un fármaco, cirugía, dieta, ejercicio o intervención. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones de un método o uso según la invención, un sujeto puede estratificarse en un subgrupo de un ensayo clínico de una terapia. Tal como se ha explicado anteriormente, en el contexto de la presente invención, proSP-B, NT-proPNC, PNC, troponina T y PRC pueden utilizarse para la estratificación de la enfermedad obstructiva pulmonar.

Los términos "estratificar" y "estratificación" según la invención generalmente incluyen identificar los sujetos que requieren una alteración de su terapia actual o futura. El término incluye evaluar, por ejemplo determinar, qué terapia requiere un sujeto que sufre de enfermedad obstructiva pulmonar. Por lo tanto, en el contexto de la presente invención, la estratificación puede basarse en el riesgo de salud que implica el estado de un sujeto de la enfermedad obstructiva pulmonar. Un método o uso según la invención puede servir además en la estratificación del riesgo de cualquier condición relacionada con EPOC para un sujeto. Un método para estratificar un sujeto para la terapia de la enfermedad obstructiva pulmonar según la invención incluye detectar la cantidad de proSP-B o una parte efectiva de la misma, NT-proPNC, troponina T y PRC tal como se ha indicado anteriormente. Tal como se ha explicado

anteriormente, en algunas realizaciones de manera general, puede utilizarse ventajosamente una pareja de unión de proSP-B para cribar para los pacientes de riesgo que presentan una gravedad más elevada de la EPOC. Tal como resultará evidente a partir de lo anterior, los términos "estratificar" y "estratificación" incluyen la estadificación de los sujetos. El estadio de la enfermedad obstructiva pulmonar en términos de la gravedad de la enfermedad y/o el grado de exacerbación puede evaluarse utilizando un método según la invención, así como el grado de complicación de la enfermedad obstructiva pulmonar.

El término "estratificación" según la invención generalmente incluye identificar los sujetos que no requieren hospitalización y terapia antibiótica inmediata, identificar los sujetos que podrían requerir la hospitalización y la terapia antibiótica inmediata, así como identificar los sujetos que requieren una vigilancia intensiva y terapia de antibióticos. El término incluye evaluar, por ejemplo determinar, qué terapia requiere un sujeto que sufre de enfermedad obstructiva pulmonar.

A este respecto, el uso de marcadores biológicos para la estratificación de pacientes es un procedimiento bien establecido de la técnica. Este procedimiento incluye o consiste de relacionar una o más subpoblaciones de pacientes, caracterizadas por una determinada característica, en el contexto de la presente invención el nivel de proteínas particulares, con un tratamiento particular. El objetivo general de la estratificación es hacer corresponder los pacientes con las terapias que es más probable que resulten efectivas y seguras. En un contexto más general, estratificar los pacientes puede incluir la evaluación de la historia y evaluación física del paciente, en combinación con ensayos de laboratorio basados en un método de la presente invención, y la observación clínica. Se entiende que estratificar los pacientes sólo es viable en el caso de que existan múltiples opciones de tratamiento con respuestas heterogéneas para la enfermedad. En el contexto de la presente invención, puede ajustarse la terapia de la enfermedad obstructiva pulmonar y la vigilancia del paciente. Una visión general de la estratificación del paciente y la medicación estratificada se proporciona en Trusheim M.R. *et al.*, Nature Reviews Drug Discovery 6, 4, 287-293, 2007.

Un método para estratificar un sujeto para la terapia de la enfermedad obstructiva pulmonar según la invención incluye detectar la cantidad de proSP-B o una parte efectiva de la misma, tal como se ha indicado anteriormente. La cantidad de NT-proPNC o PNC, troponina T o troponina I, y PRC, puede determinarse de una manera correspondiente, utilizando las técnicas y métodos anteriormente indicados. Los niveles inferiores a niveles altos de cada uno de NT-proPNC o PNC, troponina T o troponina I, proSP-B y PRC en la muestra indican que el sujeto no requiere vigilancia intensiva ni terapia de antibióticos. Los niveles bajos de cada uno de proSP-B, NT-proPNC o PNC, troponina T o troponina I y PRC indican que un sujeto no requiere vigilancia intensiva ni terapia de antibióticos. De manera similar, los niveles altos de proSP-B, los niveles bajos de NT-proPNC o PNC, los niveles bajos de troponina T o troponina I y los niveles intermedios de PRC indican que un sujeto no requiere vigilancia intensiva ni terapia de antibióticos. Los niveles altos de proSP-B, los niveles altos o muy altos de NT-proPNC o PNC, los niveles altos o muy altos de troponina T o troponina I y los niveles altos de PRC indican que un sujeto puede requerir por lo menos uno de entre vigilancia intensiva y terapia de antibióticos. Los niveles altos de proSP-B, los niveles muy altos de NT-proPNC, los niveles muy altos de troponina T o troponina I y los niveles muy altos de PRC indican que la condición del sujeto debe ser monitorizada y que el sujeto requiere terapia de antibióticos, a la que el sujeto no muestra ninguna resistencia. Los niveles muy elevados de cada uno de NT-proPNC o PNC, y troponina T o troponina I, y los niveles altos de proSP-B y PRC en la muestra respecto al valor umbral correspondiente indican que el sujeto requiere vigilancia intensiva y/o terapia de antibióticos.

Un nivel bajo de NT-proPNC típicamente es un valor inferior a aproximadamente 125 pg/ml, tal como inferior a aproximadamente 115 pg/ml, inferior a aproximadamente 100 pg/ml o inferior a aproximadamente 90 pg/ml. Un nivel intermedio de NT-proPNC típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 125 pg/ml y aproximadamente 500 pg/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 130 pg/ml y aproximadamente 500 pg/ml, de entre aproximadamente 150 pg/ml y aproximadamente 480 pg/ml o en el intervalo de entre aproximadamente 170 pg/ml y aproximadamente 450 pg/ml. Un nivel elevado de NT-proPNC típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 500 pg/ml y aproximadamente 1.500 pg/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 520 pg/ml y aproximadamente 1.450 pg/ml, de entre aproximadamente 550 pg/ml y aproximadamente 1.400 pg/ml o en el intervalo de entre aproximadamente 580 pg/ml y aproximadamente 1.350 pg/ml. Un nivel muy elevado de NT-proPNC típicamente es un valor superior a aproximadamente 1.500 pg/ml, tal como superior a aproximadamente 1.550 pg/ml o superior a aproximadamente 1.600 pg/ml. Un nivel bajo de troponina T típicamente es un valor inferior a aproximadamente 3 pg/ml, tal como inferior a aproximadamente 2,8 pg/ml o inferior a aproximadamente 2,5 pg/ml. Un nivel intermedio de troponina T típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 3 pg/ml y aproximadamente 7 pg/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 3,2 pg/ml y aproximadamente 6,8 pg/ml o un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 3,5 pg/ml y aproximadamente 6,5 pg/ml. Un nivel elevado de troponina T típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 7 pg/ml y aproximadamente 20 pg/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 7,2 pg/ml y aproximadamente 19,8 pg/ml, en el intervalo de entre aproximadamente 7,5 pg/ml y aproximadamente 19,5 pg/ml,

en el intervalo de entre aproximadamente 8 pg/ml y aproximadamente 19 pg/ml o en el intervalo de entre aproximadamente 8,5 pg/ml y aproximadamente 18,5 pg/ml. Un nivel muy elevado de troponina T típicamente es un valor superior a aproximadamente 20 pg/ml, tal como superior a aproximadamente 20,5 pg/ml, superior a aproximadamente 21 pg/ml, superior a aproximadamente 22 pg/ml o superior a aproximadamente 25 pg/ml.

5 Un nivel bajo de proSP-B típicamente es un valor inferior a aproximadamente 35 ng/ml, tal como inferior a aproximadamente 34 ng/ml, inferior a aproximadamente 32 ng/ml o inferior a aproximadamente 30 ng/ml. Un nivel intermedio de proSP-B típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 35 ng/ml y aproximadamente 70 ng/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 36 ng/ml y aproximadamente 68 ng/ml, de entre aproximadamente 38 ng/ml y aproximadamente 65 ng/ml o en el intervalo de entre aproximadamente 40 ng/ml y aproximadamente 63 ng/ml. Un nivel elevado de proSP-B típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 70 ng/ml y aproximadamente 150 ng/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 72 ng/ml y aproximadamente 145 ng/ml, de entre aproximadamente 75 ng/ml y aproximadamente 140 ng/ml o en el intervalo de entre aproximadamente 77 ng/ml y aproximadamente 135 ng/ml. Un nivel muy elevado de proSP-B típicamente es un valor superior a aproximadamente 150 ng/ml, tal como superior a aproximadamente 155 ng/ml o superior a aproximadamente 160 ng/ml. Un nivel bajo de PRC típicamente es un valor inferior a aproximadamente 3 mg/ml, tal como inferior a aproximadamente 2,8 mg/l o inferior a aproximadamente 2,5 mg/ml. Un nivel intermedio de PRC típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 15 mg/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 3,2 mg/ml y aproximadamente 14,5 mg/ml o de entre aproximadamente 3,5 mg/ml y aproximadamente 14 mg/l. Un nivel elevado de PRC típicamente es un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 15 mg/ml y aproximadamente 40 mg/ml, tal como un valor comprendido en el intervalo de entre aproximadamente 15,5 mg/ml y aproximadamente 38 mg/l, de entre aproximadamente 15 mg/l y aproximadamente 35 mg/l o en el intervalo de entre aproximadamente 15,5 mg/l y aproximadamente 32 mg/l. Un nivel muy alto de PRC típicamente es un valor superior a aproximadamente 40 mg/l, tal como superior a aproximadamente 42 mg/l o superior a aproximadamente 45 mg/l.

En el método de estratificación de un sujeto para la terapia de la enfermedad obstructiva pulmonar, puede compararse con un valor umbral la cantidad de proSP-B, NT-proPNC o PNC, troponina T o troponina I, y PRC. Dicho valor umbral puede, en algunas realizaciones, ser un valor umbral predeterminado con respecto al marcador respectivo. En algunas realizaciones, el valor umbral se basa en la cantidad de proSP-B en una muestra de control. Una muestra de control respectiva puede presentar cualquier condición que difiera respecto a la medición principal de la muestra misma. Dicha muestra de control puede ser o incluir una muestra del líquido corporal correspondiente como muestra del sujeto. Una muestra de control puede ser, por ejemplo, una muestra, tal como una muestra de sangre, una muestra de plasma o una muestra de suero, de un sujeto que es conocido que no sufre de enfermedad pulmonar obstructiva. Una muestra de control también puede ser de un sujeto que es conocido que no sufre de enfermedad pulmonar obstructiva exacerbada. En algunas realizaciones, una muestra de control respectiva es de un sujeto del mismo grupo de edad. En algunas realizaciones, una muestra de control respectiva es de un sujeto que es conocido que no presenta una enfermedad de confusión; en algunas realizaciones, es de un sujeto que es conocido que no presenta ninguna enfermedad.

En algunas realizaciones, un valor umbral es una colección de datos de una pluralidad de muestras de control (*supra*). Tal como se ha explicado anteriormente, el valor umbral puede fijarse en una diferencia significativa entre el control y la muestra del sujeto de interés. Por ejemplo, un valor de p de 0,05, 0,02, 0,01 ó inferior puede considerarse que indica la existencia de una diferencia (*supra*). En algunas realizaciones, un incremento significativo es una desviación de un valor de una muestra de ensayo respecto de un valor de una muestra de control de aproximadamente 2 veces o más, incluyendo de 3 veces o más, tal como de entre por lo menos aproximadamente 5 y aproximadamente 10 veces o incluso superior.

Lo anteriormente indicado respecto a la fijación y origen de un valor de control, que puede consistir o basarse en una pluralidad de valores individuales, que pueden utilizarse resulta aplicable *mutatis mutandis* a un método de estratificación de un sujeto para la terapia de la enfermedad obstructiva pulmonar. En algunas realizaciones, un percentil tal como un nivel de un marcador biológico seleccionado puede considerarse como incrementado o elevado en el caso de que sea superior al percentil 90, superior al percentil 92, superior al percentil 93, superior al percentil 94, superior al percentil 95, superior al percentil 96, superior al percentil 97, superior al percentil 98 ó superior al percentil 99. En algunas realizaciones, el valor umbral puede basarse en que el valor de la desviación estándar o la desviación estándar relativa de una pluralidad de mediciones de control y/o muestras de control, desviación estándar o desviación estándar relativa, por ejemplo, se multiplique por un factor, que puede ser superior o inferior a 1, tal como 1,2, 1,5 ó 2. En algunas realizaciones, puede utilizarse una media de un número seleccionado, tal como 2, 3, 4, 5 ó más de los niveles más altos de un marcador biológico seleccionado determinados, como valor umbral predeterminado.

En algunas realizaciones, el valor medio de los datos de pacientes que es conocido que sufren de EPOC sin exacerbaciones puede determinarse y utilizarse para determinar un valor umbral. A título de ejemplo ilustrativo, el valor de la desviación estándar o desviación estándar relativa, en algunas realizaciones multiplicada por un factor, puede ser superior o inferior a 1. En algunas realizaciones, puede añadirse al valor medio determinado un múltiplo de la desviación estándar o desviación estándar relativa, tal como 1,2, 1,5 ó 2 veces la desviación estándar. En algunas realizaciones, establecer un valor umbral predeterminado incluye la recogida de los pacientes que es conocido que sufren de EPOC sin exacerbaciones durante un periodo de tiempo, tal como una pluralidad de meses. Los niveles medios de proSP-B, desviación estándar y desviación estándar relativa en tiempos dados pueden calcularse para los pacientes con el fin de determinar un intervalo de valores de proSP-B asociado a la EPOC sin exacerbaciones de la misma. En algunas realizaciones, puede utilizarse como valor umbral predeterminado una media de un número seleccionado, tal como 2, 3, 4, 5 ó más de los niveles más altos de proSP-B determinados durante el tiempo. En algunas realizaciones, puede determinarse el valor medio de todos los datos recogidos en diferentes puntos temporales y utilizarse para determinar un valor umbral, por ejemplo mediante la adición de la desviación estándar, la desviación estándar relativa o, por ejemplo, un múltiplo de la misma (*supra*). Tras recoger el resultado de ensayo de un paciente que debe evaluarse, se compara con el valor umbral. Se determinan las diferencias estadísticas entre el resultado de ensayo y el valor umbral con el fin de identificar las varianzas significativas entre ellos.

La cantidad de proSP-B determinada en una muestra de un sujeto o a partir de una muestra de un sujeto puede compararse con una única muestra de control o con una pluralidad de muestras de control, tal como una muestra de un sujeto de control, de cualquier manera adecuada. A título de ejemplo ilustrativo, el nivel de proSP-B en una muestra de control puede caracterizarse como un valor promedio (media) emparejado a un valor de desviación estándar, por ejemplo en un punto temporal dado. En algunas realizaciones, el nivel de proSP-B en un sujeto puede considerarse incrementado en el caso de que sea una desviación estándar o más superior al valor promedio del nivel de expresión correspondiente determinado en una o más muestras de control. En algunas realizaciones, el nivel determinado de proSP-B se considera incrementado en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 1,5 desviaciones estándares superior o inferior, incluyendo aproximadamente dos, aproximadamente tres, aproximadamente cuatro o más desviaciones estándares superior o inferior al valor promedio determinado en una muestra de control. En algunas realizaciones, la cantidad determinada de proSP-B se considera diferente en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 1,2 veces o más superior o inferior, incluyendo aproximadamente 1,5 veces, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 2,5 veces, aproximadamente 3 veces, aproximadamente 3,5 veces, aproximadamente 4 veces, aproximadamente 5 veces o más superior o inferior al nivel de la proteína determinado en una muestra de control. En algunas realizaciones, el nivel determinado de proSP-B se considera incrementado en el caso de que el valor obtenido sea aproximadamente 0,8 veces o menos, incluyendo aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, aproximadamente 30%, aproximadamente 25%, aproximadamente 20% o menos respecto al nivel de proSP-B determinado en una muestra de control.

En el caso de que, por ejemplo, se detecte un nivel de proSP-B superior a, por ejemplo un valor umbral predeterminado, ello puede indicar un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva. Un nivel de proSPB superior a un valor umbral puede indicar una condición en la que el sujeto sufre de EPOC exacerbada grave. En el caso de que se detecte un nivel de proSP-B que es inferior a un valor umbral predeterminado, ello puede indicar que no se ha producido ningún incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva.

Tal como se ha explicado anteriormente, en realizaciones en las que la muestra es una muestra de un ser humano que presenta una historia de insuficiencia cardiaca, un valor umbral se basa ventajosamente en muestras obtenidas del sujeto en un punto temporal anterior, es decir un punto temporal en el que es conocido que el sujeto no sufre de enfermedad obstructiva crónica o por lo menos un punto temporal en el que es conocido que el sujeto no ha sufrido de una gravedad elevada de enfermedad obstructiva pulmonar.

En la presente memoria se proporciona además una combinación de una pluralidad de anticuerpos, que puede incluir una o más inmunoglobulinas y/o una o más moléculas de unión proteicas. La combinación incluye una primera inmunoglobulina o una molécula de unión proteica que es específica para proSP-B. La combinación incluye además una segunda inmunoglobulina o molécula de unión proteica. La segunda inmunoglobulina o molécula de unión proteica es, en algunas realizaciones, específica para NT-proPNC o para PNC. En algunas realizaciones, la segunda inmunoglobulina o molécula de unión proteica es específica para troponina T o para troponina I. La segunda inmunoglobulina o molécula de unión proteica es, en algunas realizaciones, específica para PRC. En una realización, la combinación incluye una inmunoglobulina o una molécula de unión proteica específica para proSP-B, una inmunoglobulina o molécula de unión proteica específica para NT-proPNC o para PNC, una inmunoglobulina o molécula de unión proteica específica para troponina T o para troponina I, y una inmunoglobulina o molécula de unión proteica que, en algunas realizaciones, es específica para PRC.

En algunas realizaciones la combinación se proporciona en forma de un kit. El kit incluye un primer recipiente que incluye la primera inmunoglobulina o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina, que es específica para proSP-B. El kit incluye además un segundo recipiente que incluye la segunda inmunoglobulina o una molécula de unión proteica. En una realización, el kit incluye un recipiente que incluye una inmunoglobulina o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina, que es específica para proSP-B. El kit incluye además un recipiente que incluye una inmunoglobulina o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina, que es específica para NT-proPNC o para PNC. El kit incluye además un recipiente que incluye una inmunoglobulina o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina, específicas para troponina T o para troponina I. Además, el kit incluye un recipiente que incluye una inmunoglobulina o una molécula de unión proteica con funciones de tipo inmunoglobulina específicas para PRC. El kit puede incluir además instrucciones y/o referencias que indican que un paciente debe ser evaluado y/o estratificado mediante un método descrito en la presente memoria, y/o instrucciones sobre cómo poner en práctica un método tal como se define en la presente memoria. Puede incluir además controles positivos y/o negativos que permitan una comparación con el control. El kit puede permitir la evaluación del progreso del tratamiento de un paciente y de la presencia de enfermedad obstructiva pulmonar exacerbada. Puede utilizarse un kit respectivo para poner en práctica un método según la presente invención. Puede incluir uno o más dispositivos para alojar los componentes anteriormente indicados, mientras se pone en práctica un método de la invención y posteriormente.

Con el fin de que la invención se entienda fácilmente y se ponga en práctica, a continuación se describen realizaciones particulares mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

EJEMPLOS

Pacientes y métodos:

1. Pacientes:

Se incluyó un total de 71 pacientes con EPOC exacerbada en el estudio; todos los pacientes presentaban disnea incrementada, esputo purulento y fiebre de por lo menos 38,5 grados centígrados. La radiografía torácica reveló signos radiográficos de neumonía. De esta manera el diagnóstico final fue de EPOC exacerbada.

Debido a que la EPOC y las enfermedades cardiovasculares comparten factores de riesgo similares, también se incluyeron en el estudio 158 pacientes con enfermedad cardiovascular documentada que no presentaban ningún trastorno pulmonar concomitante y que no presentaban evidencias de insuficiencia cardíaca clínica. Además, también se sometieron a ensayo 31 pacientes con insuficiencia cardíaca clínica y sin trastorno pulmonar concomitante.

2. Métodos:

Se sometieron a ensayo NT-proPNC, troponina T y PRC utilizando ensayos disponibles comercialmente (Roche Diagnostics) y proSP-B se determinó utilizando ensayos prototipo de Elecsys. El límite inferior de detección en el ensayo de troponina T utilizado fue de 1 pg/ml. Todos los demás ensayos se llevaron a cabo utilizando ensayos de laboratorio estándares y criterios de evaluación establecidos. La obtención de imágenes se llevó a cabo utilizando métodos rutinarios.

2.1 Ensayo para la medición de proSP-B

2.1.1 Anticuerpos utilizados

El ensayo de proSP-B utiliza un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proSP-B (extremo N-terminal) como anticuerpo de captura y un anticuerpo monoclonal de ratón anti-proSP-B (extremo C-terminal) como reactivo de detección. El principio de ensayo era un formato de tipo sándwich. El anticuerpo de la prosequencia N-terminal (clon 1.14.133) se une a un epítipo incluido en la secuencia peptídica comprendida entre las posiciones aminoácidas 160 a 169 de proSP-B. El anticuerpo contra la prosequencia C-terminal (clon 1.7.41) se une a un epítipo incluido en la secuencia peptídica comprendida entre las posiciones aminoácidas 323 a 334 de proSP-B. La detección se basa en un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) utilizando un complejo de tris(bipiridil)rutenio (II) como marcaje.

2.1.2 Procedimiento de ensayo

El anticuerpo de captura biotinilado (80 ml), el anticuerpo de detección marcado con rutenio (80 ml) y muestra o material estándar (10 ml) se incubaron en fase homogénea durante 9 minutos a 37°C. Las concentraciones en la solución madre era de 1,7 mg/ml para el anticuerpo de captura biotinilado y de 1,2 mg/ml para el anticuerpo de

detección rutenilado, respectivamente. Tras los primeros nueve minutos, se añadieron 30 ml de perlas recubiertas con estreptavidina y se dejó que tuviera lugar la unión de los complejos inmunológicos formados con las micropartículas durante una incubación adicional de 9 minutos. Tras la segunda incubación, la mezcla de reacción se transfirió a la celda de medición, en donde se capturaron las perlas en la superficie del electrodo con un imán. Se lavó la celda de medición para eliminar el marcaje no unido y se rellenó con tampón de detección que contenía Tris-propilamina. Tras aplicar voltaje al electrodo, se detectó la luz de quimioluminiscencia emitida se detectó con un fotomultiplicador. Los resultados se determinaron a partir de una curva de calibración de 2 puntos. La concentración correspondiente para proSP-B se proporciona en pg/ml.

2.2 Ensayo para la medición de proSP-B C-terminal

2.2.1 Anticuerpos utilizados

El ensayo de proSP-B utiliza un primer anticuerpo monoclonal de ratón anti-proSP-B (extremo C-terminal) como anticuerpo de captura y un segundo anticuerpo monoclonal de ratón anti-proSP-B (extremo C-terminal) como reactivo de detección. El principio de ensayo era un formato de tipo sándwich. El anticuerpo de la primera prosequencia C-terminal (clon 1.7.41) se une a un epítipo incluido en la secuencia peptídica comprendida entre las posiciones aminoácidas 323 a 334 de proSP-B. El anticuerpo contra la segunda prosequencia C-terminal (clon 1.3.9) se une a un epítipo incluido en la secuencia peptídica comprendida entre las posiciones aminoácidas 285 a 294 de proSP-B. La detección se basa en un inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA) utilizando un complejo de tris(bipiridil)rutenio (II) como marcaje.

El anticuerpo de captura biotilado (MAB 1.7.41) (80 ml), el anticuerpo de detección marcado con rutenio (MAB 1.3.9) (80 ml) y muestra o material estándar (10 ml) se incubaron en fase homogénea durante 9 minutos a 37°C. Las concentraciones en la solución madre eran de 1,5 mg/ml para el anticuerpo de captura biotilado y de 1,0 mg/ml para el anticuerpo de detección rutenilado, respectivamente. Tras los primeros nueve minutos, se añadieron 30 ml de perlas recubiertas con estreptavidina y se dejó que tuviera lugar la unión de los complejos inmunológicos formados con las micropartículas durante una incubación adicional de 9 minutos. Tras la segunda incubación, la mezcla de reacción se transfirió a la celda de medición, en donde se capturaron las perlas en la superficie del electrodo con un imán. Se lavó la celda de medición para eliminar el marcaje no unido y se rellenó con tampón de detección que contenía Tris-propilamina. Tras aplicar voltaje al electrodo, se detectó la luz de quimioluminiscencia emitida se detectó con un fotomultiplicador. Los resultados se determinaron a partir de una curva de calibración de 2 puntos. La concentración correspondiente para proSP-B C-terminal se proporciona en pg/ml.

3. Análisis de muestras clínicas

En una primera etapa se seleccionaron pacientes respecto al cumplimiento los criterios de SRIS (síndrome de respuesta inflamatoria sistémica), que se define a partir de dos o más de los criterios siguientes: fiebre de más de 38 grados centígrados o hipotermia (inferior a 36 grados), taquipnea, taquicardia y leucocitosis (superior a 12.000) o leucopenia (inferior a 4.000). Se observó fiebre, ausencia de leucocitosis y presencia de leucopenia en 32 pacientes (grupo B) y ausencia de la misma en 32 pacientes (Grupo A) de un total de 65 pacientes de los que se disponía de información. En la fig. 1 se resumen los datos para ambos grupos.

Tal como puede observarse en la Tabla en la fig. 1, los pacientes de EPOC exacerbada con criterios de SRIS presentaban valores más elevados de NT-proPNC, troponina T, PRC y proSP-B. Se proporcionan casos individuales de pacientes del Grupo A y del Grupo B para los marcadores listados en la fig. 2 y en la fig. 3, respectivamente. Los datos obtenidos de la población de control se muestran en la fig. 4. Tal como se observa a partir de la fig. 4, los pacientes con y sin enfermedad cardiovascular y sin historia de insuficiencia cardiaca mostraban valores de proSPB inferiores a 35 (26 a 55) pg/ml y niveles de fragmento c de proSP-B inferiores a 65 (45-105) pg/ml, indicando que los niveles superiores a dichos niveles de referencia son indicativos de participación pulmonar asociada a la EPOC; en el caso de insuficiencia cardiaca clínica preexistente se requieren para la toma de decisiones los valores de proSP-B antes de la exacerbación. Se aplican consideraciones similares a NT-proPNC y troponina T.

4. Conclusión

Tal como resulta evidente a partir de los resultados del estudio, proSP-B y el fragmento C de proSP-B reconocen la implicación de los neumocitos de tipo 2 en la EPOC exacerbada y, de esta manera, una complicación pulmonar no reconocida por la radiografía torácica. Se demostró que proSP-B presentaba niveles más elevados en pacientes que cumplían los criterios de SRIS que en pacientes que no los cumplían y, de esta manera, podría representar un signo temprano de un daño pulmonar agudo, que podría ser subclínico o clínico, no reconocido por los otros métodos. Tal como se muestra en la figura, posteriormente, proSP-B y fragmento C de proSP-B proporcionan información idéntica.

La fuente de NT-proPNC y troponina T sensible es incierta. Entre las posibles fuentes se incluyen enfermedad arterial coronaria e insuficiencia cardiaca concomitantes; sin embargo, no se observó una buena correlación con la función ventricular izquierda evaluada mediante ecocardiografía; una EPOC en estadio similar podría resultar en hipertensión pulmonar secundaria; sin embargo, no se observó una buena correlación con la función ventricular derecha. El hecho de que los pacientes con signos de SRIS presentan concentraciones más altas de NT-proPNC y troponina T apunta al hecho de que NT-proPNC y troponina T representan marcadores tempranos de inflamación sistémica, concretamente en aquellos pacientes sin ausencia cardiaca previa.

Las figuras 6 a 8 representan una correlación entre proSP-B y NT-proPNC y troponina T sensible. Tal como resulta evidente a partir de estas figuras, existe una correlación entre proSP-B y ambos marcadores; sin embargo, esta correlación no es muy fuerte, lo que indica que cada uno de estos marcadores es independiente.

Tal como se ha descrito de manera general anteriormente, la clasificación de la EPOC exacerbada resulta difícil basándose en los signos y síntomas clínicos, al igual que la recuperación frente a los patógenos y la decisión de tratamiento.

A la luz de la presente invención puede añadirse la evaluación del daño pulmonar a la evaluación de la EPOC en la que los criterios de SRIS más allá de la leucocitosis y la leucopenia resultan de poca ayuda. Los datos obtenidos en el presente estudio indican que los niveles elevados de NT-proPNC y troponina T con frecuencia no están relacionados con enfermedades cardiacas subyacentes tales como la EAC o la hipertensión arterial pulmonar, sino que resultan de una complicación de la EPOC. En este contexto, debe considerarse el incremento de proSP-B como la participación de las vías respiratorias pequeñas y los alveolos, posiblemente como signo de un daño pulmonar agudo temprano y podría predisponer a neumonía secundaria.

Lo anterior resulta en el algoritmo proporcionado en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1: estratificación de individuos

2. Riesgo	NT-proBNP	Troponina T _{as}	proSP-B	PRC
Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
Intermedio	Bajo	Bajo	alto	Intermedio
Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Muy alto	Muy alto	Muy alto	Alto	Alto

Mientras que los pacientes de riesgo bajo e intermedio no requieren hospitalización y terapia inmediata de antibióticos, lo anterior debe considerarse con cuidado en los pacientes de riesgo elevado y muy elevado. Los pacientes de riesgo muy elevado requieren vigilancia intensiva, terapia de antibióticos de amplio espectro y ensayos de resistencia.

El listado o comentario de un documento anteriormente publicado en la presente memoria no debe considerarse necesariamente como reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o que es conocimiento general común.

La invención descrita ilustrativamente en la presente memoria puede poner en práctica convenientemente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no dadas a conocer concretamente en la presente memoria. De esta manera, por ejemplo, los términos "comprende", "incluye", "contiene", etc., deben interpretarse en sentido amplio y sin limitación. Las formas singulares, tales como "un", "una", "el" o "la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, la expresión "por lo menos" antes de una serie de elementos debe entenderse que se refiere a cada elemento en la serie. Las expresiones "por lo menos uno" y "por lo menos uno de entre" incluyen, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco o más elementos. Las variaciones ligeras superiores e inferiores a los intervalos indicados pueden utilizarse para conseguir sustancialmente los mismos resultados que los valores dentro de los intervalos. Además, a menos que se indique lo contrario, la descripción de los intervalos se pretende como un intervalo continuo, que incluye todos y cada uno de los valores entre los valores mínimo y máximo.

REIVINDICACIONES

1. Método para determinar la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un sujeto, comprendiendo el método la detección de la cantidad de pro-proteína surfactante pulmonar tipo B (proSP-B) o una parte eficaz de la misma, en una muestra del sujeto, en el que una cantidad incrementada de proSP-B, o una parte de la misma, respecto a un valor umbral indica una gravedad elevada de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, en la que la muestra es una muestra de sangre de un ser humano que no presenta historia de insuficiencia cardíaca, y en el que un valor superior a 35 pg/ml de proSP-B y un valor superior a 65 pg/ml de la parte de proSP-B definida por las posiciones aminoácidas 285 a 334 de la secuencia SEC ID nº 1 indica una gravedad incrementada de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además detectar la cantidad de por lo menos un marcador adicional de (i) péptido natriurético cerebral (PNC), (ii) el fragmento N-terminal de 76 aminoácidos de péptido natriurético cerebral (NT-proPNC), (iii) troponina T y (iv) troponina I en la muestra, en el que una cantidad incrementada de PNC, NT-proPNC, troponina T y/o troponina I respecto a un valor umbral para el marcador adicional indica adicionalmente una complicación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la complicación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica es una infección sistémica.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende detectar repetidamente la cantidad de proSP-B, o una parte eficaz de la misma, en una muestra del sujeto.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la detección de la cantidad de proSP-B o de una parte de la misma comprende poner en contacto la muestra con un agente de unión, siendo el agente de unión específica para proSP-B.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el sujeto es un ser humano que ha sufrido previamente insuficiencia cardíaca clínica y en el que la muestra de control es una de entre una muestra de sangre, una muestra de plasma y una muestra de suero procedentes del mismo sujeto obtenidas en un tiempo en el que era conocido que el sujeto (i) no presentaba enfermedad pulmonar obstructiva crónica, o (ii) no presentaba un incremento de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.
7. Uso *in vitro* de un agente de unión específico para proSP-B, o una parte eficaz de la misma, para la evaluación de la gravedad de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica en un sujeto, comprendiendo el uso la detección de la cantidad de proSP-B, o una parte de la misma, en una muestra de sangre de un ser humano mediante el uso del agente de unión, en el que el ser humano no presenta una historia de insuficiencia cardíaca, en el que un valor superior a aproximadamente 35 pg/ml de proSP-B y un valor superior a 65 pg/ml de la parte de proSP-B definida por las posiciones aminoácidas 285 a 334 de la secuencia SEC ID nº 1 indica una gravedad incrementada de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

Fig.1

Grupo	A	Grupo B
NT-proPNC (pg/ml)	161 (75-1.116)	572 (410-2.644)
Troponina T_{as} (pg/ml)	6,8 (3,0-20,7)	18 (7,0-52,0)
ProSP-B (ng/ml)	89 (56-218)	173 (106-228)
Fragmento C de proSP-B (ng/ml)	203 (118-573)	431 (240-585)
PRC (mg/l)	16,4 (2,7-28,5)	38,6 (13,5-97,8)

Fig. 2

Grupo A	ng/ml	ng/ml	proPNC	TnT_as	PRC	EAC	IC
ID pat.	proSP-B	frag. C proSP-B	pg/ml	pg/ml	mg/l	Sí/No	Sí/No
I-39/1	96.74	261.54	47	4	13	no	no
I-42/1	90.97	175.31	82	3	6	no	sí
I-45/1	29.29	51.50	145		17	no	no
I-48/1	39.76	54.97	93	0	20	no	no
I-62/1	100.19	252.42	237	2	0	no	no
I-63/1	824.35	1857.76	17599	42	3	sí	no
I-64/1	48.23	111.83	72	6	3	no	no
II-002/1	54.09	178.76	2404	13	44	sí	no
II-003/1	260.31	1028.58	1403	58	62	no	no
II-006/1	38.00	52.19	184	0	16	no	no
II-019/1	32.41	89.26	79	7	17	no	no
II-020/1	105.34	260.94	506	11	159	sí	sí
II-021/1	76.10	144.17	158	26	0	no	no
II-025/1	73.89	98.12	32	0	0	no	no
II-039/1	195.87	606.48	51	19	17	no	no
II-071/1	88.06	247.34	38	7	18	no	no
II-072/1	241.25	508.05	2520	11	27	sí	no
II-085/1	346.74	1059.73	290	3	207	sí	sí
II-093/1	275.13	691.72	6527	46	52	no	sí
II-131/1	79.54	143.34	2779	23	24	sí	no
II-139/1	58.97	124.19	53	0	0	sí	no
II-200/1	83.92	182.13	20	0	7	no	no
II-214/1	78.72	197.23	1342	22	3	sí	sí
II-219/1	32.89	49.71	164	0	3	no	sí
II-231/1	41.52	102.52	122	8	130	no	no
II-242/1	242.24	988.29	890	19	23	sí	no
II-250/1	287.07	936.19	62	3	5	sí	no
II-262/1	187.96	540.96	325	43	125	sí	no
III-049/1	133.52	311.00	116	3	4	no	no
III-086/1	78.28	118.45	1920	3	4	sí	no

Fig. 3

Grupo B	proSP-B	frag. C proSP-B	proPNC	TnT_as	PRC	EAC	IC
ID. pat.	ng/ml	ng/ml	pg/ml	pg/ml	mg/l	Sí/No	Sí/No
I-02/1	666.50	1335.85	10429	51	45	sí	sí
I-37/1	214.87	476.75	2395	26	70	no	no
I-38/1	141.16	240.19	272	2	135	no	no
I-43/1	229.52	484.92	13646	151	187	no	no
I-57/1	220.76	680.50	411	29	14	no	no
I-58/1	66.92	145.68	814	14	36	no	no
I-65/1	101.72	285.06	1417	16	52	sí	no
II-001/1	107.65	235.05	318	6	120	no	no
II-012/1	250.09	585.77	2192	108	313	no	no
II-013/1	234.70	455.65	2894	28	13	no	sí
II-017/1	202.28	435.74	3043	18	24	no	no
II-018/1	204.35	709.87	1575	54	115	sí	sí
II-023/1	254.52	761.12	434	14	7	no	no
II-041/1	40.16	96.96	421	5	77	no	no
II-050/1	147.66	342.09	59	3	3	sí	no
II-053/1	165.42	645.89	572	0	39	no	no
II-058/1	112.76	329.56	15	4	0	no	no
II-075/1	226.30	549.31	105	9	36	no	no
II-122/1	143.47	1116.35	560	54	41	no	no
II-126/1	131.93	283.03	730	13	18	sí	no
II-127/1	76.24	137.89	557	12	7	no	no
II-130/1	175.20	315.54	4643	55	175	no	sí
II-132/1	121.05	466.04	208	10	21	no	no
II-135/1	243.76	421.96	16997	359	11	sí	no
II-140/1	833.54	2312.14	8758	74	9	no	sí
II-157/1	173.56	531.06	9976	83	12	sí	sí
II-175/1	175.37	431.08	432	5	194	no	no
II-183/1	72.61	204.81	310	19	127	no	no
II-211/1	69.57	157.39	478	14	0	no	sí
II-218/1	106.25	293.86	6874	34	81	no	no
II-256/1	36.19	103.23	410	3	36	sí	sí
II-266/1	402.53	1512.53	463	67	29	sí	no
II-286/2	228.61	535.06	314	40	172	no	no

Fig. 4

	NT-proPNC pg/ml	Troponina T sens pg/ml	pro SP-B ng/ml	fragmento c proSP-B ng/ml
Grupo 1 N = 79 < mediana 116 pg/ml proPNC	54 (35 - 83)	1 (0-7)	25 (20-40)	50 (34-79)
Grupo 2 N = 79 > mediana 116 pg/ml proPNC	227 (153- 292)	3 (0-9)	35 (26-55)	65 (45/105)
Grupo 3 N = 31	476 (219- 719)	7 (4-15)	50 (29-89)	104 (64-201)



