

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 502**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2012 E 12707586 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 2684052**

54 Título: **APEX como marcador de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)**

30 Prioridad:

11.03.2011 EP 11157922

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

27.07.2016

73 Titular/es:

**ROCHE DIAGNOSTICS GMBH (50.0%)
Sandhofer Straße 116
68305 Mannheim, DE y
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HAGMANN, MARIE-LUISE;
KARL, JOHANN y
RIEDLINGER, JULIA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 578 502 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

APEX como marcador de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método in vitro de ayuda en la evaluación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (=EPOC). Da a conocer la utilización de la proteína APEX1 como marcador para diferenciar la EPOC del asma. Además, se refiere especialmente a un método para predecir la EPOC del asma en una muestra derivada de un individuo mediante la medición de la proteína APEX1 en dicha muestra in vitro.

Antecedentes de la invención

15 La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad caracterizada por la inflamación crónica y la obstrucción irreversible del flujo de aire, con una caída del parámetro de función pulmonar VEF1 que es más rápida de lo normal. Lo anterior conduce a una limitación del flujo de aire hacia y desde los pulmones que causa falta de aliento. La enfermedad presenta dos aspectos patológicos principales: la bronquitis crónica, caracterizada por una hipersecreción de moco de las vías respiratorias conductoras, y enfisema, caracterizado por cambios destructivos en los alveolos. En la práctica clínica, la EPOC se define por su flujo de aire característicamente bajo en los ensayos de función pulmonar (Nathell L. et al., Respiratory Research 8:89, 2007). En contraste con el asma, dicha limitación es poco reversible y habitualmente se agrava progresivamente con el tiempo.

25 En el mundo, la EPOC fue la sexta causa principal de muerte en 1990. Se prevé que sea la cuarta causa más importante de muerte en todo el mundo en el 2030 debido a un incremento de las tasas de tabaquismo y los cambios demográficos que se están produciendo en muchos países (Mathers C.D. et al., PLoS Med. 3:e442, 2006). La EPOC es la 4º causa principal de muerte en los Estados Unidos y la carga económica de la EPOC en los Estados Unidos en 2007 fue de 42600 millones de dólares en costes sanitarios y productividad perdida.

30 La EPOC está causada por partículas nocivas o gas, comúnmente del humo del tabaco, que desencadena una respuesta inflamatoria anormal en el pulmón (Rabe K.F. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 176:532-555, 2007, y Hogg J.C. et al., N. Engl. J. Med. 350:2645-2653, 2004). La respuesta inflamatoria en las vías respiratorias mayores se conoce como bronquitis crónica, que se diagnostica clínicamente cuando se produce expulsión de esputo. En los alveolos, la respuesta inflamatoria causa la destrucción de los tejidos del pulmón, un proceso conocido como enfisema. El curso natural de la EPOC se caracteriza por agravamientos súbitos ocasionales de los síntomas conocidos como exacerbaciones agudas, la mayoría de las cuales están causadas por infecciones o contaminación del aire.

40 Muchos de los síntomas de la EPOC son compartidos por otras enfermedades respiratorias, tales como asma, bronquitis, fibrosis pulmonar y tuberculosis. El estándar de oro actual para el diagnóstico de la EPOC requiere pruebas de la función pulmonar (espirometría), que son procedimientos laboriosos y caros que sólo pueden ser realizados por un neumólogo especializado. Una prueba de espirometría, por ejemplo, es altamente dependiente de la colaboración y esfuerzo del paciente y normalmente se repite por lo menos tres veces para garantizar la reproducibilidad.

45 La bronquitis crónica puede diagnosticarse preguntando al paciente si presenta "tos productiva", es decir, una que produce esputo.

50 El asma difiere de la EPOC en su respuesta patogénica y terapéutica y, por lo tanto, debería considerarse una entidad clínica diferente. Sin embargo, algunos pacientes con asma desarrollan una limitación al flujo de aire poco reversible, que actualmente es indistinguible de la de los pacientes con EPOC, aunque a efectos prácticos son tratados como si presentasen asma. La elevada prevalencia del asma y la EPOC en la población en general resulta en la coexistencia de ambas entidades de enfermedad en muchos individuos. Lo anterior se caracteriza por una limitación significativa del flujo de aire y una respuesta importante a los broncodilatadores. En estos pacientes, el volumen espiratorio forzado en un segundo (VEF1) no vuelve a la normalidad y frecuentemente empeora con el tiempo.

55 Es conocido que los niveles séricos de PRC son significativamente más elevados en los pacientes con asma que en los controles normales (Fujita M. et al., Ann. Allergy Asthma Immunol. 99 (2007) 48-53). La CRP se incrementa en respuesta a varias condiciones infecciosas e inflamatorias y, por lo tanto, no es específica de la EPOC (Donaldson G.C., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 175:209-210, 2007). Por lo tanto, la CRP no cumple los criterios de precisión diagnóstica requeridos para ser una herramienta de cribado de la EPOC.

El método de detección actual de la EPOC, la espirometría, aparentemente resulta apropiada para la utilización

como herramienta de cribado general. La espirometría es muy cara, laboriosa y no asequible para los sistemas sanitarios para un uso general y generalizado en cribados de un gran número de personas. Además, los resultados de la misma dependen del cumplimiento del paciente.

5 Se ha descrito en la técnica que en la EPOC también se observa un incremento de los neutrófilos, macrófagos y linfocitos T (concretamente CD8⁺) en diversas partes de los pulmones, que se relaciona con el grado de limitación del flujo de aire (Saetta M. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157:822-826, 1998). Puede producirse un incremento de los eosinófilos en algunos pacientes, en particular durante las exacerbaciones (Saetta M. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150:1646-1652, 1994, y Saetta M. et al., Clin. Exp. Allergy 26:766-774, 1996). Estas células inflamatorias son capaces de liberar una diversidad de citoquinas y mediadores inflamatorios, en especial el leucotrieno-4, la interleuquina-8 y el FNT- α . Este patrón inflamatorio es marcadamente diferente del observado en pacientes con asma bronquial. Los cambios inflamatorios pueden persistir después de abandonar el tabaco. No se conocen cuáles son los mecanismos que explicarían la perpetuación de esta respuesta inflamatoria en ausencia de los sucesos inductores.

15 De esta manera, es un objetivo de la presente invención proporcionar un procedimiento simple y de buena relación coste/eficacia para las evaluaciones de la EPOC, por ejemplo para identificar los individuos que se sospecha que presentan EPOC. Con este fin debe encontrarse un marcador general de EPOC presente en la circulación que resulte detectable en los líquidos corporales (por ejemplo sangre, suero o plasma).

20 Con el fin de que resulte de utilidad, un nuevo marcador diagnóstico como marcador único debe ser comparable con otros marcadores conocidos de la técnica, o mejor. Alternativamente, un nuevo marcador debe conducir a un avance en la sensibilidad o especificidad diagnóstica, o ambas, tanto en el caso de que se utilice solo como en el caso de que se utilice en combinación con uno o más marcadores diferentes, respectivamente. La sensibilidad o especificidad predictivas de un ensayo se evalúan mejor a partir de sus características de funcionamiento de receptor, las cuales se describen en mayor detalle posteriormente.

25 La sangre completa, el suero o el plasma son las fuentes de muestra utilizadas más ampliamente en la rutina clínica. La identificación de un marcador precoz de la EPOC que ayudaría en la detección fiable de la EPOC o que proporcionaría información pronóstica temprana podría conducir a un método que ayudaría mucho en el diagnóstico y en el control de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente de mejorar la evaluación in vitro de la EPOC. Resulta especialmente importante mejorar el diagnóstico precoz de la EPOC ya que para los pacientes diagnosticados en estadios tempranos de la EPOC, las tasas de reversibilidad de los daños pulmonares son mucho más altas que para los diagnosticados en un estadio más avanzado de la enfermedad.

35 Existe una necesidad en la técnica de identificar un indicador fiable y sencillo del estado de la enfermedad EPOC (por ejemplo un marcador sustitutivo) tanto para distinguir fiablemente los síntomas de la EPOC de los de otras enfermedades respiratorias indicadas anteriormente, como para predecir cambios en la gravedad de la enfermedad, y en el avance de la enfermedad y en la respuesta a la medicación.

40 El objetivo de la presente invención es la identificación de un marcador bioquímico que pueda utilizarse en la evaluación de la EPOC in vitro. En particular, los inventores de la presente invención han investigado si puede identificarse un marcador bioquímico para la evaluación de la EPOC en una muestra de líquido corporal.

45 Descripción resumida de la invención

Ahora se ha encontrado que la utilización de la proteína APEX1 puede superar por lo menos parcialmente algunos de los problemas de los métodos disponibles para la evaluación de la EPOC actualmente conocidos.

50 Inesperadamente se ha encontrado en la presente invención que una determinación in vitro de la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa permite evaluar la EPOC. En el presente contexto se ha encontrado que una concentración elevada de dicha proteína APEX1 en dicha muestra obtenida de un individuo en comparación con una concentración de referencia para la proteína APEX1 es indicativa de la presencia de EPOC.

55 En la presente memoria se da a conocer un método in vitro para evaluar la EPOC que comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre completa la concentración de proteína APEX1 mediante un método de detección inmunológica y la utilización del resultado determinado, en particular la concentración determinada, en la diferenciación de la EPOC.

60 La invención se refiere además a un método in vitro para diferenciar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto, que comprende: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a)

con una concentración de referencia de proteína APEX1, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de EPOC.

5 En una realización adicional, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína APEX1 en la evaluación in vitro de EPOC en una muestra de suero, plasma o sangre completa, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia para la proteína APEX1 es indicativa de EPOC.

10 Se da a conocer además la utilización de un panel de marcadores que comprende la proteína APEX1 y la proteína NNMT en la evaluación in vitro de la EPOC en una muestra de suero, plasma o sangre completa, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia de proteína APEX1 es indicativa de EPOC.

15 En una realización adicional, la presente invención se refiere a la utilización del método in vitro de evaluación de EPOC según la presente invención para diferenciar la EPOC de otros tipos de enfermedad pulmonar, preferentemente del asma.

Otros aspectos y ventajas adicionales de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, a continuación.

20 Descripción detallada de la invención

25 Los inventores de la presente invención inesperadamente han podido demostrar que la proteína marcadora APEX1 resulta útil en la evaluación de la EPOC. Debido a las incertidumbres en la clasificación de los diversos estadios de daño pulmonar, y especialmente de la EPOC mediante los métodos del estado de la técnica, podría ser perfectamente que la proteína APEX1 se convierta en uno de los criterios críticos en la evaluación de los pacientes con EPOC en el futuro.

30 El método de la presente invención resulta adecuado para la evaluación de la EPOC. Se ha encontrado que las concentraciones incrementadas de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa en comparación con los controles normales son indicativas de EPOC.

35 En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro para evaluar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto humano, que comprende: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de proteína APEX1, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de EPOC.

40 La proteína ASC, "proteína similar a speck asociada a apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa" también es conocida como "diana de silenciamiento inducido por metilación 1" (TMS1) (Swiss-PROT: Q9ULZ3). La proteína ASC en el sentido de la presente invención, caracterizada por la secuencia proporcionada en SEC ID n° 1, es una proteína de 22 kDa. Los dominios de reclutamiento asociados a caspasa (CARD, por sus siglas en inglés) median en la interacción entre proteínas adaptadoras tales como APAF1 (factor activador de proteasa apoptótico 1) y la proforma de las caspasas (por ejemplo CASP-9) que participan en la apoptosis. ASC es un elemento de la familia de las proteínas adaptadoras que contienen CARD. En el documento n° WO 2006/105252 se ha demostrado que el nivel de expresión génica de ASC (=CARD-9) es indicativo para el diagnóstico de la EPOC.

45 El papel biológico y función de la proteína ARMET (rica en arginina, mutada en tumores de estadio temprano, ARP, Swiss-PROT ID: P55145) sigue sin conocerse en detalle. La proteína ARMET en el sentido de la presente invención, caracterizada por la secuencia proporcionada en SEC ID n° 2, es una proteína de 20,3 kDa. La proteína ARMET consiste de 179 aminoácidos y porta una secuencia de señal predicha (aminoácidos 1 a 21). El gen correspondiente se localiza en la banda cromosómica 3p21.1 y fue caracterizada por primera vez por Shridhar V. et al. (Oncogene 12:1931-1939, 1996). El gen se encuentra altamente conservado y puede observarse en muchas especies de mamífero, tales como la rata, el ratón, la vaca y el hámster. ARMET se ha denominado de esta manera porque los estudios iniciales sugerían que ARMET era 50 aminoácidos más larga en el extremo N-terminal portador de una región rica en argininas (Shridhar V. et al., Oncogene 12:1931-1939, 1996; Shridhar R. et al., Cancer Res. 56:5576-5578, 1996; Shridhar V. et al., Oncogene 14:2213-2216, 1997). Sin embargo, algunos estudios más recientes muestran evidencia transcrita de un marco de lectura abierta más pequeño que no codifica el tramo de argininas (Tanaka H. et al., Oncol. Rep. 7:591-593, 2000; Mizobuchi N. et al., Cell Struct. Funct. 32:41-50, 2007). Con la corrección correspondiente del tamaño de la proteína, el codón mutado inicialmente descrito (ATG50) ahora se ha identificado como codón de inicio. Petrova, P. et al. (J. Mol. Neurosci. 20:173-188, 2003) han purificado el producto del gen ARMET a partir de medio condicionado de una línea celular de astrocitos de tipo 1 mesencefálicos de rata y lo han denominado MANF (por sus siglas en inglés, factor neurotrófico derivado de astrocitos mesencefálicos). Algunos estudios más recientes han demostrado que ARMET se encuentra regulado positivamente por la "respuesta

de proteína no desplegada" (UPR, por sus siglas en inglés), un proceso que se activa al acumularse proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático (RE) (Tanaka H. et al., *Oncol. Rep.* 7:591-593, 2000; Apostolou A. et al., *Exp. Cell Res.* 34:2454-2467, 2008). Basándose en dicho estudio, ARMET se caracteriza por un nuevo mediador secretado de la ruta adaptativa de la UPR.

5 La proteína NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa, Swiss-PROT: P40261) en el sentido de la presente invención, caracterizada por la secuencia proporcionada en SEC ID nº 3, es una proteína de 29,6 kDa y presenta un punto isoeléctrico de 5,56. La NNMT cataliza la N-metilación de la nicotinamida y de otras piridinas. Esta actividad resulta importante para la biotransformación de muchos fármacos y compuestos xenobióticos. Se ha informado de que la
10 proteína se expresa predominantemente en el hígado y que se localiza en el citoplasma. La NNMT ha sido clonada a partir de ADNc de hígado humano y contiene un marco de lectura abierto de 792 nucleótidos codificante de una proteína de 264 aminoácidos con una masa molecular calculada de 29,6 kDa (Aksoy, S., et al., *J. Biol. Chem.* 269:14835-14840, 1994). Se conoce poco en la literatura sobre un papel potencial del enzima en la EPOC humana. En la *Am. J. of Respiratory and Critical Care Medicine*, 181(8):798-805, se ha observado un nivel de expresión más elevado de ARNm de NNMT en las células de músculo esquelético de los pacientes de EPOC. En un estudio se ha
15 demostrado que NNMT es un biomarcador útil para el cáncer de pulmón (CP) (*J. of Cancer Res. y Clin. Onc.* 136(9):1223-1229, 2009). En dicho estudio se ha encontrado que los niveles séricos de NNMT fueron significativamente más altos en los pacientes de CP que en pacientes de EPOC y donantes sanos.

20 La proteína endonucleasasFlap-1 (=FEN1, FEN-1), Swiss-PROT ID: P39748 en el sentido de la presente invención es una proteína nuclear de 380 aminoácidos con un peso molecular de 42,6 kDa caracterizada por la secuencia proporcionada en SEC ID nº 4. La secuencia codificante de FEN1 humana fue predicha por Murray en 1994 (Murray J.M. et al., *Mol. Cell. Biol.* 14:4878-4888, 1994) a partir de una secuencia nuevamente clonada. Basándose en la función del homólogo de levadura rad2, se ha propuesto una función en la segregación cromosómica de alta
25 fidelidad y en la reparación del daño del ADN inducido por UV. Debido a que estos son procesos fundamentales en la integridad cromosómica, los autores han propuesto también una participación de la proteína en la prevención del cáncer. El locus génico en el cromosoma humano 11 fue identificado posteriormente por Hiraoka et al. (Hiraoka L.R. et al., *Genomics* 25:220-225, 1995) y Taylor et al. (Taylor T.D. et al., *Nature* 440:497-500, 2006). Numerosos estudios se han centrado en las funciones de FEN1 y sus interacciones con el ADN (Robins P. et al., *J. Biol. Chem.* 269:28535-28538, 1994; Shen B. et al., *J. Biol. Chem.* 271:9173-9176, 1996; Hasan S. et al., *Mol. Cell* 7:1221-1231, 2001; Qiu J. et al., *J. Biol. Chem.* 277:24659-24666, 2002; y Sakurai S. et al., *EMBO J.* 24:683-693, 2005). Se han demostrado varias funciones enzimáticas en el metabolismo del ADN, incluyendo la actividad de endonucleasa que corta la estructura ramificada ("flap") 5'-protuberante generada mediante síntesis por desplazamiento al encontrarse
30 la ADN polimerasa con el extremo 5' de un fragmento de Okazaki cadena abajo. Además, FEN1 presenta también actividad de exonucleasa 5' a 3' en el ADN de doble cadena con muesca o con hueco y muestra actividad de ARNasa H. Éstas han recibido una revisión de Shen et al. (Shen, B. et al., *BioEssays* 27:717-729, 2005), o Liu et al. (Liu, Y. et al., *Annu. Rev. Biochem.* 73:589-615, 2004).

40 La endonucleasa AP (APEX1, APEX-1) (Swiss-Prot. P27695) en el sentido de la presente invención se caracteriza por la secuencia proporcionada en SEC ID nº 5. La molécula precursora no procesada consiste de 318 aminoácidos y presenta un peso molecular de 35,6 kDa. APEX1 participa en la reparación del ADN y corta los sitiosapurínicos o apirimidínicos de las cadenas de ADN. Dichos sitios abásicos son generados con relativa frecuencia de modo espontáneo o por agentes químicos o por ADN glucosilasas que eliminan bases anormales específicas.

45 Los sitios de AP son lesiones premutagénicas que impiden la replicación normal del ADN de manera que la célula contiene sistemas para identificar y reparar dichos sitios (Barzilay G. y Hickson I.D., *Bioessays* 17:713-719, 1995). Se ha identificado la estructura 3D y los aminoácidos que participan en la actividad de endonucleasa (Barzilay G. et al., *Nature Structural Biology* 2:561-567, 1995; Gorman M.A. et al., *EMBO Journal* 16:6548-6558, 1997; Beernink P. et al., *J. Mol. Biol.* 307:1023-1034, 2001). APEX1 también es un regulador redox de diversos factores de transcripción, tales como c-Fos, c-Jun, NF-KB e HIF-1. Esta actividad aparentemente es independiente de la actividad de endonucleasa. Ambas funciones se localizan en diferentes dominios de la proteína (Barzilay G. y Hickson I.D., *Bioessays* 17:713-719, 1995). La fosforilación de APEX1 por la proteína quinasa C incrementa la actividad redox, mientras que la forma no fosforilada participa en la reparación del ADN (Yacoub A. et al., *Cancer Res.* 57:5457-5459, 1997). Un sitio de fosforilación, Y 261 (según la secuencia de Swissprot) ha sido identificada por
50 Rush J. et al., (*Nature Biotech.* 23:94-101, 2005). En el documento nº WO 2006/123943 se dan a conocer métodos para la evaluación de la EPOC o del cáncer de pulmón que resultan de los efectos combinados o interactivos de dos o más variantes genéticas, y en particular para el diagnóstico del riesgo de desarrollar dichas enfermedades en sujetos utilizando un análisis de los polimorfismos genéticos.

60 La seprasa, también conocida como proteína de activación fibroblástica (=FAP, por sus siglas en inglés), en el sentido de la presente invención es una glucoproteína de 170 kDa que presenta actividad de gelatinasa y de dipeptidil-peptidasa que consiste de dos unidades de seprasa monoméricas idénticas (Pineiro-Sánchez M.L. et al., *J. Biol. Chem.* 272:7595-7601, 1997; Park J.E. et al., *J. Biol. Chem.* 274:36505-36512, 1999). El monómero de la

5 proteína seprasa unida a membrana humana comprende 760 aminoácidos y se muestra en la SEC ID nº 6. Se predice que la seprasa humana presenta sus primeros 4 residuos N-terminales en el citoplasma de los fibroblastos, seguido de un dominio transmembranal de 21 residuos seguido de un dominio catalítico C-terminal extracelular de 734 residuos (Goldstein et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1361:11-19, 1997; Scanlan M.J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:5657-5661, 1994). El experto en la materia conocerá una forma más corta de la proteína seprasa humana tan soluble como la seprasa o enzima circulante de corte de antiplasmina (=ECCA) (Lee K.N. et al., *Blood* 103:3783-3788, 2004; Lee K.N. et al., *Blood* 107:1397-1404, 2006), que comprende las posiciones aminoácidas 26 a 760 del número de acceso Q12884 de la base de datos Swissprot. El dímero de la seprasa soluble es una glucoproteína de 160 kDa que consiste de dos unidades monoméricas idénticas de la proteína seprasa soluble.

10 Piñero-Sánchez et al. (*supra*) han encontrado que una expresión incrementada de la seprasa se correlaciona con el fenotipo invasivo de las células de melanoma y carcinoma humanas. Henry L.R. et al., *Clin. Cancer Res.* 13:1736-1741, 2007, describen que los pacientes de tumor de colon humanos con niveles elevados de seprasa estromal es más probable que experimenten una progresión agresiva de la enfermedad y el potencial desarrollo de metástasis o recurrencia.

15 La dipeptidil-peptidasa IV (=DPPIV) humana, también conocida como CD26, es en el sentido de la presente invención una molécula de superficie celular de 110 kDa. La secuencia de aminoácidos de una proteína DPPIV humana comprende 766 aminoácidos y se muestra en la SEC ID nº 7 (base de datos Swissprot, nº de acceso P27487). Contiene actividad intrínseca de dipeptidil-peptidasa IV que elimina selectivamente el dipéptido N-terminal de los péptidos con prolina o alanina en la tercera posición aminoácida. Interactúa con diversas moléculas extracelular y también participa en cascadas intracelulares de transducción de señales. Las actividades multifuncionales de la DPPIV humana depende del tipo celular y de condiciones intracelulares o extracelulares que influyen sobre su papel como enzima proteolítico, receptor de superficie celular, proteína de interacción coestimuladora y mediador de la transducción de señales. La DPPIV humana presenta un dominio citoplasmático corto entre las posiciones aminoácidas 1 y 6, una región transmembranal entre las posiciones aminoácidas 7 y 28 y un dominio extracelular entre las posiciones aminoácidas 29 y 766 con actividad intrínseca de dipeptidil-peptidasa IV (DPPIV). La secuencia de aminoácidos de la dipeptidil-peptidasa IV soluble (=DPPIV soluble) humana comprende las posiciones aminoácidas 29 a 766 del número de acceso P27487 de la base de datos Swissprot. El dímero de la DPPIV soluble es una glucoproteína de 170 kDa que consiste de dos unidades monoméricas solubles idénticas de la DPPIV.

20 El "complejo soluble DPPIV/seprasa" (=DPPIV/seprasa) se refiere en el sentido de la presente invención al complejo soluble formado de un homodímero (170 kDa) de DPPIV soluble y un homodímero (160 kDa) de seprasa soluble con un peso molecular de 330 kDa. Bajo determinadas condiciones dicho complejo puede formar un doble complejo con un peso molecular de 660 kDa.

25 Tal como resultará evidente para el experto en la materia, la presente invención no debe interpretarse como limitada a la proteína de longitud completa APEX1 de SEC ID nº 5. Los fragmentos fisiológicos o artificiales de la proteína APEX1, las modificaciones secundarias de la proteína APEX1, así como las variantes alélicas de la proteína APEX1 también se encuentran comprendidas en la presente invención. Las variantes de un polipéptido se encuentran codificadas por el mismo gen, aunque pueden diferir en su punto isoeléctrico (=PI) o peso molecular (=PM), o ambos, por ejemplo como resultado del procesamiento alternativo de ARNm o de pre-ARNm. La secuencia de aminoácidos de una variante es 95% o más idéntica a la secuencia marcadora correspondiente. Los fragmentos artificiales preferentemente comprenden un péptido producido sintéticamente o mediante técnicas recombinantes, que por lo menos comprenden un epítipo de interés diagnóstico que consiste de por lo menos 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos tal como se deriva de la secuencia dada a conocer en SEC ID nº 1. Dicho fragmento puede utilizarse ventajosamente para la generación de anticuerpos o como estándar en un inmunoensayo.

30 Aparentemente en la técnica anterior no se conoce que la presencia o nivel de la proteína APEX1 en un líquido corporal presente una utilidad diagnóstica en la evaluación de la EPOC. Los inventores de la presente invención han encontrado ahora y han podido establecer que una concentración incrementada de la proteína APEX1 según se ha determinado a partir de una muestra de suero, plasma o sangre completa derivada del individuo es indicativa de EPOC.

35 La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura, tal como en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, 1989; Gait, M.J., (ed.) *Oligonucleotide Synthesis*, 1984; Freshney, R.I., (ed.), *Animal Cell Culture*, 1987; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); Ausubel, F.M., et al., (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (1987) y actualizaciones periódicas; Mullis, et al. (editores), *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (1994).

- A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la presente invención. Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1994; March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure, 4a ed., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1992; Lewin, B., Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994, ISBN 0-19-854287-9; Kendrew, J., et al. (editores), The Encyclopedia of Molecular Biology, published by Blackwell Science Ltd., 1994, ISBN 0-632-02182-9); y Meyers, R.A. (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 -8) que proporcionan al experto en la materia una guía general a muchos de los términos y expresiones utilizados en la presente solicitud.
- Tal como se utiliza en la presente memoria, cada uno de los términos siguientes presenta el significado asociado en la presente sección.
- Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un marcador" se refiere a un marcador o a más de un marcador. El término "por lo menos" se utiliza para indicar que opcionalmente puede encontrarse presente uno o más objetos adicionales.
- La expresión "uno o más" se refiere a 1 a 50, preferentemente 1 a 20, resultando preferentes también 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12 ó 15.
- El término "marcador" o la expresión "marcador bioquímico" se utilizan en la presente memoria para referirse a una molécula que debe utilizarse como diana para el análisis de una muestra de ensayo de un paciente. En una realización, son ejemplos de dichas dianas moleculares las proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contempla que incluyan variantes naturales de dichas proteínas, así como fragmentos de dichas proteínas o de dichas variantes, en particular fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables preferentemente comprenden por lo menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 ó 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. El experto en la materia reconocerá que las proteínas liberadas por las células o que se encuentran presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo durante la inflamación, y que podrían resultar degradadas o cortadas formando dichos fragmentos. Determinados marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que puede ser activada posteriormente mediante proteólisis. Tal como apreciará el experto en la materia, también pueden encontrarse presentes proteínas o fragmentos de las mismas como parte de un complejo. Dicho complejo también puede utilizarse como marcador en el sentido de la presente invención. Además, o alternativamente, un polipéptido marcador o una variante del mismo puede portar una modificación post-traducciona. Las modificaciones post-traduccionales preferentes son la glucosilación, la acilación y/o la fosforilación.
- El término "marcaje" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier sustancia que es capaz de producir una señal mediante detección directa o indirecta.
- Para la detección directa, el grupo de marcaje o marcaje adecuado para la utilización en la presente invención puede seleccionarse de entre cualesquiera grupos marcadores detectables conocidos, incluyendo, aunque sin limitarse a ellos, cromógenos, fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos), compuestos electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, pigmentos, pigmentos fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, coumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), partículas coloidales metálicas y no metálicas y partículas de látex polimérico orgánico. Otros ejemplos de grupos de marcaje son los complejos metálicos luminiscentes, tales como los complejos de rutenio o de europio; enzimas, por ejemplo los utilizados para ELISA y los isótopos radioactivos.
- Los sistemas de detección indirecta comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo el anticuerpo de detección, se marque con un primer elemento de una pareja de unión bioafín. Son ejemplos de parejas de unión adecuadas hapteno o antígeno/anticuerpo, biotina o análogos de biotina, tales como aminobiotina, iminobiotina o destiobiotina/avidina o estreptavidina, azúcar/lectina, ácido nucleico o análogo de ácido nucleico/ácido nucleico complementario y receptor/ligando, por ejemplo receptor de hormona esteroidea/hormona esteroidea. Los elementos de la primera pareja de unión preferentes comprenden hapteno, antígeno y hormona. Resultan especialmente preferentes haptenos como la digoxina y la biotina y los análogos de los mismos. El segundo componente de dicha pareja de unión, por ejemplo un anticuerpo, estreptavidina, etc., habitualmente se marca para permitir la detección directa, por ejemplo los marcajes indicados anteriormente.
- La expresión "evaluación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica" o "evaluación de la EPOC" se utiliza para indicar que el método según la presente invención solo o conjuntamente con otros marcadores o variables, por ejemplo, ayuda al médico a establecer o a confirmar la ausencia o la presencia de EPOC. El método resultará útil, por ejemplo, para establecer o confirmar la ausencia o la presencia de EPOC.

- Un "marcador de EPOC" en el sentido de la presente invención es un marcador que, como marcador único, o en caso de que se combine con el marcador APEX1, añade información relevante en la evaluación de la EPOC a la cuestión diagnóstica investigada. La información se considera relevante o de valor aditivo en el caso de que, a una especificidad dada, la sensibilidad, o la especificidad a una sensibilidad dada, respectivamente, en la evaluación de la EPOC, pueda mejorarse mediante la inclusión de dicho marcador en un panel de marcadores (una combinación de marcadores) que ya comprende el marcador APEX1. Preferentemente, la mejora de la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significación de $p=0,05$, $0,02$, $0,01$ ó inferior.
- El término "muestra" o "muestra de ensayo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica obtenida de un individuo para el propósito de la evaluación in vitro. En los métodos de la presente invención, la muestra o muestra del paciente puede comprender en una realización de la presente invención cualquier líquido corporal. Las muestras preferentes son líquidos corporales, tales como suero, plasma o sangre completa, siendo el suero o el plasma los más preferentes.
- La proteína APEX1, en particular las formas solubles de proteína APEX1, se determinan in vitro en una muestra apropiada.
- Preferentemente, la muestra se deriva de un sujeto humano, por ejemplo de un paciente de EPOC o de un paciente en riesgo de EPOC o de una persona que se sospecha que presenta EPOC. También preferentemente, se determina APEX1 en una muestra de suero o plasma.
- La expresión "muestra de referencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una muestra biológica proporcionada a partir de un grupo de referencia de individuos aparentemente sanos para el propósito de la evaluación in vitro. La expresión "concentración de referencia" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un valor establecido en un grupo de referencia de individuos aparentemente sanos.
- Es conocido por el experto en la materia que los resultados de las mediciones de la etapa (a) según el método o métodos de la presente invención se comparan con una concentración de referencia. Dicha concentración de referencia puede determinarse utilizando una muestra de referencia negativa, una muestra de referencia positiva, o una muestra de referencia mixta que comprende uno o más de dichos tipos de control. Una muestra de referencia negativa preferentemente comprende una muestra de no fumadores, fumadores de control sin diagnóstico de EPOC o asma, o diversas combinaciones de los mismos. Una muestra de referencia positiva preferentemente comprende una muestra de un sujeto con el diagnóstico de EPOC.
- La expresión "comparar la concentración determinada con una concentración de referencia" se utiliza meramente para ilustrar adicionalmente lo que de todas maneras ya resulta evidente para el experto en la materia. Se establece una concentración de referencia en una muestra de control. La muestra de control puede ser una muestra de control interna o externa. En una realización se utiliza una muestra de control interna, es decir, se evalúa el nivel o niveles del marcador en la muestra de ensayo, así como en otra u otras muestras obtenidas del mismo sujeto con el fin de determinar si se han producido cambios en el nivel o niveles de dicho marcador o marcadores. En otra realización se utiliza una muestra de control externa. Para una muestra de control externa, la presencia o cantidad de un marcador en una muestra obtenida del individuo se compara con su presencia o cantidad en un individuo que es conocido que sufre, o que es conocido que presenta el riesgo de sufrir, una condición dada, o un individuo que es conocido que no presenta una condición dada, es decir, un "individuo normal". Por ejemplo, puede compararse un nivel de marcador en una muestra del paciente con un nivel que es conocido que está asociado a un curso específico de EPOC. Habitualmente el nivel del marcador de la muestra se encuentra directa o indirectamente correlacionado con un diagnóstico y el nivel del marcador se utiliza, por ejemplo, para determinar si un individuo presenta un riesgo de EPOC. Alternativamente, el nivel del marcador en la muestra puede compararse, por ejemplo, con un nivel de marcador que es conocido que se encuentra asociado a una respuesta a la terapia en pacientes con EPOC, al diagnóstico de EPOC, o como guía para la selección de un fármaco apropiado para la EPOC, para la evaluación del riesgo de progresión de la enfermedad, o en el seguimiento de los pacientes de EPOC.
- Dependiendo del uso diagnóstico pretendido, se selecciona una muestra de control apropiada y un valor de control o de referencia para el marcador establecido en la muestra. El experto en la materia apreciará que dicha muestra de control en una realización se obtiene a partir de una población de referencia con la misma distribución de edades y que no presente enfermedades de confusión. También resultará evidente para el experto en la materia que los valores absolutos del marcador establecido en una muestra de control dependerán del ensayo utilizado. Preferentemente se utilizan muestras procedentes de 100 individuos bien caracterizados procedentes de la población de referencia apropiada para establecer un valor de control (de referencia). También resulta preferente que la población de referencia seleccionada consista de 20, 30, 50, 200, 500 ó 1.000 individuos. Los individuos sanos representan una población de referencia preferente para establecer un valor de control.

- 5 Los términos "medición", "medir" o "determinar" preferentemente comprenden una medición cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. En la presente invención, la proteína APEX1 se mide en una muestra de líquido corporal. En una realización preferente, la medición es semicuantitativa, es decir, se determina si la concentración de la proteína APEX1 es superior o inferior a un valor de corte. Tal como apreciará el experto en la materia, en un ensayo de Sí (presencia) o No (ausencia), la sensibilidad del ensayo habitualmente se establece en el valor de corte.
- 10 Los valores para la proteína APEX1 determinados en un grupo de control o en una población de control se utilizan, por ejemplo, para establecer un valor de corte o un intervalo de referencia. Un valor superior al valor de corte o fuera del intervalo de referencia en su extremo superior se considera como elevado o indicativo de la presencia de EPOC.
- 15 En una realización, se establece un valor de corte fijo. Dicho valor de corte se selecciona para que corresponda a la cuestión diagnóstica de interés.
- 20 En una realización, el valor de corte se establece de manera que resulte en una especificidad del 90%; también resulta preferente establecer el valor de corte de manera que resulte en una especificidad del 95%, o también resulta preferente establecer el valor de corte en una especificidad del 98%.
- 25 En una realización, el valor de corte se establece de manera que resulte en una sensibilidad del 90%; también resulta preferente establecer el valor de corte de manera que resulte en una especificidad del 95%, o también resulta preferente establecer el valor de corte en una sensibilidad del 98%.
- 30 En una realización, los valores de proteína APEX1 determinados en un grupo de control o en una población de control se utilizan para establecer un intervalo de referencia. En una realización preferente, una concentración de la proteína APEX1 se considera elevada en el caso de que el valor determinado sea superior al percentil 90 del intervalo de referencia. En realizaciones preferentes adicionales, una concentración de la proteína APEX1 se considera elevada en el caso de que el valor determinado sea superior al percentil 95, al percentil 96, al percentil 97 o al percentil 97,5 del intervalo de referencia.
- 35 Un valor superior al valor de corte puede ser, por ejemplo, indicativo de la presencia de EPOC. Un valor inferior al valor de corte puede ser, por ejemplo, indicativo de la ausencia de EPOC.
- 40 En una realización preferente adicional, la medición de la proteína APEX1 es una medición cuantitativa. En realizaciones adicionales, la concentración de la proteína APEX1 se correlaciona con una cuestión diagnóstica subyacente.
- 45 Una muestra proporcionada por un paciente con EPOC ya confirmada en determinados contextos podría utilizarse como muestra de control positivo y preferentemente someterse a ensayo en paralelo con la muestra que debe investigarse. En dicho contexto, un resultado positivo para la proteína marcadora APEX1 en la muestra de control positivo indica que el procedimiento de ensayo ha funcionado al nivel técnico.
- 50 Tal como apreciará el experto en la materia, cualquiera de dichas evaluaciones se realiza in vitro. Posteriormente se descarta la muestra (muestra de ensayo). La muestra se utiliza únicamente para el método diagnóstico in vitro de la invención y el material de la muestra del paciente no se transfiere nuevamente al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra líquida corporal, por ejemplo suero, plasma o sangre completa.
- 55 El método según la presente invención se basa en una muestra líquida o de líquido corporal que se obtiene de un individuo o en la determinación in vitro de la proteína APEX1 en dicha muestra. Un "individuo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un solo ser humano u organismo no humano. De esta manera, los métodos y composiciones indicados en la presente memoria son aplicables a enfermedades tanto humanas como veterinarias. Preferentemente, el individuo o sujeto o paciente es un ser humano.
- 60 Preferentemente, la proteína marcadora APEX1 se determina específicamente in vitro a partir de una muestra líquida mediante la utilización de un agente de unión específica.
- 65 En una realización preferente según la presente invención, se determina la concentración de proteína APEX1. En una realización, se determina específicamente in vitro la concentración de proteína marcadora APEX1 a partir de una muestra mediante la utilización de un agente de unión específica.
- 70 Un agente de unión específica es, por ejemplo, un receptor para la proteína APEX1, una lectina de unión a la proteína APEX1, un anticuerpo contra la proteína APEX1, cuerpos peptídicos de la proteína APEX1, ligantes duales biespecíficos o formatos de anticuerpo biespecífico. Un agente de unión específica presenta una afinidad de por lo menos 10^7 l/mol para su molécula diana correspondiente. El agente de unión específica preferentemente presenta una afinidad de 10^8 l/mol, o también preferentemente, 10^9 l/mol, para su molécula diana.

- 5 El experto en la materia apreciará que el término "específico" se utiliza para indicar que otras moléculas biológicas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para la proteína APEX1, secuencia de SEC ID nº. 5. Preferentemente, el nivel de unión a una molécula biológica diferente de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es, como máximo, de sólo 10% o inferior, de sólo 5% o inferior, de sólo 2% o inferior o de sólo 1% o inferior de la afinidad para la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específica preferente satisfará los criterios de mínimo anteriormente indicados tanto para la afinidad como para la especificidad.
- 10 Son ejemplos de agentes de unión específicos, péptidos, miméticos de péptido, aptámeros, spiegelmeros, darpinas, proteínas de repetición de anquirina, dominios de tipo Kunitz, anticuerpos, anticuerpos de un solo dominio (ver: Hey T. et al., Trends Biotechnol. 23:514-522, 2005) y fragmentos monovalentes de anticuerpos.
- En determinadas realizaciones preferentes, el agente de unión específica es un polipéptido.
- 15 En determinadas realizaciones preferentes, el agente de unión específica es un anticuerpo o un fragmento monovalente de anticuerpo, preferentemente un fragmento monovalente derivado de un anticuerpo monoclonal.
- Entre los fragmentos de anticuerpo monovalente se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los fragmentos Fab, Fab'-SH, anticuerpo de dominio único, Fv y scFv, tal como se proporciona posteriormente.
- 20 El término "anticuerpo" se utiliza en la presente memoria en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales, los anticuerpos policlonales, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo los anticuerpos biespecíficos) formados a partir de por lo menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos con la condición de que muestren la actividad biológica deseada. En determinadas realizaciones preferentes, el agente de unión específica es un anticuerpo o un fragmento monovalente de anticuerpo, preferentemente un fragmento monovalente derivado de un anticuerpo monoclonal.
- 25 Un anticuerpo "aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y entre ellos pueden incluirse enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, el anticuerpo se purifica (1) a más de 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante el método de Lowry y, en algunas realizaciones, a más de 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta la homogeneidad mediante SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que no se encontrará presente por lo menos un componente del ambiente natural del anticuerpo. Sin embargo, habitualmente el anticuerpo aislado se prepara mediante por lo menos una etapa de purificación.
- 30 Los "anticuerpos nativos" habitualmente son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y cada cadena ligera también presenta puentes disulfuro intracadena espaciados regularmente. Cada cadena pesada presenta en un extremo un dominio variable (VH) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera presenta un dominio variable en un extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se encuentra alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de cadena ligera se encuentra alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que algunos residuos aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.
- 35 La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede denominarse "VH". El dominio variable de la cadena ligera puede denominarse "VL". Estos dominios generalmente son las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.
- 40 El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas partes de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se encuentra distribuida uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos.
- 45 Se concentra en tres segmentos denominados regiones hipervariables (RHV) en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se

- denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden, cada uno, cuatro regiones FR, adoptando mayoritariamente una configuración de lámina beta, conectada mediante tres RHV, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las RHV en cada cadena se mantienen en estrecha proximidad gracias a las regiones FR y, con las RHV de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5a ed., National Institute of Health, Bethesda, MD, 1991). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, sino que muestran diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en toxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a dos tipos claramente diferenciados, denominados kappa (κ) y lambda (λ), según las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.
- Dependiendo de la secuencia de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se dividen en clases diferentes. Existen cinco clases principales de inmunoglobulina: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y algunas de ellas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA1 e IgA2. Las estructuras de subunidad y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulina son bien conocidas y se describen de manera general en, por ejemplo, Abbas et al., *Cellular y Mol. Immunology*, 4a ed., W.B. Saunders, Co., 2000. Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión de mayor tamaño, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo con otra u otras proteínas o péptidos.
- Las expresiones "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se utilizan intercambiamente en la presente memoria para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo tal como se definen posteriormente. Las expresiones en particular se refieren a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.
- La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende una parte de un anticuerpo intacto, que preferentemente comprende la región de unión a antígeno del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen, los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, díacuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.
- La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento residual "Fc", una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina rinde un fragmento F(ab')₂ que presenta dos sitios de unión a antígeno y todavía es capaz de entrecruzarse con el antígeno.
- Un fragmento "Fv" es un fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión de antígeno completo. En una realización, una especie Fv de dos cadenas consiste de un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla (scFv), puede unirse covalentemente un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera mediante un conector peptídico flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la presente en una especie Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres RHV de cada dominio variable interactúan definiendo un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente las seis RHV confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende únicamente tres RHV específicas para un antígeno) presenta la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque habitualmente a una afinidad más baja que el sitio de unión completo.
- El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas ligera y pesada y también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos cuantos residuos al extremo carboxi-terminal del dominio CH1 de cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria para Fab' en la que el residuo o residuos de cisteína de los dominios cisteína portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ originalmente se producen como parejas de fragmentos Fab' que presentan cisteínas de bisagra entre ellas. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.
- Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, en los que estos dominios se encuentran presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión de antígeno. Para una revisión de scFv, ver, por ejemplo, Pluckthuen A., en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore (editores), Springer-Verlag, New York (1994), páginas 269 a 315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Mediante la utilización de un conector excesivamente corto para permitir el apareamiento los dos dominios en la misma cadena, se fuerza el apareamiento de los dominios con dominios complementarios de otra cadena y crea dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, la patente EP nº 404.097 y el documento nº WO 1993/01161; Hudson P.J. et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003, y Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993. Los triacuerpos y tetracuerpos también se encuentran descritos en Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134, 2003.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo las mutaciones naturales que pueden encontrarse presentes en cantidades menores. De esta manera, el modificador "monoclonal" caracteriza al anticuerpo como no formando una mezcla de anticuerpos discretos. En determinadas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en la que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una secuencia polipeptídica de unión a única diana de entre una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un único clon de entre una pluralidad de clones, tal como un grupo de clones de hibridoma, clones fágicos o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que una secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad para la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad in vivo, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc. y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), estando dirigido cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales contra un único determinante de un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales resultan ventajosas en el aspecto de que típicamente no se encuentran contaminadas por otras inmunoglobulinas.

Un agente de unión específica preferentemente es un anticuerpo reactivo con la SEC ID nº 5.

Para obtener los resultados dados a conocer en la presente invención pueden utilizarse anticuerpos de diversas fuentes. Los protocolos estándares para obtener anticuerpos también pueden obtenerse como métodos alternativos modernos. Los métodos alternativos para la generación de anticuerpos comprenden, entre otros, la utilización de péptidos sintéticos o recombinantes, que representan un epítipo clínicamente relevante de APEX1 para la inmunización. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con ADN, también conocida como vacunación de ADN. Claramente pueden utilizarse anticuerpos monoclonales o policlonales procedentes de especies diferentes, por ejemplo, conejos, ovejas, cabras, ratas o cobayas. Debido a que pueden producirse anticuerpos monoclonales en cualquier cantidad necesaria que presenten propiedades constantes, representan herramientas ideales para desarrollar un ensayo para la utilización clínica rutinaria.

Tal como apreciará ahora el experto en la materia, se ha identificado la proteína APEX1 como marcador que resulta útil en la evaluación de la EPOC. Pueden utilizarse diversos procedimientos inmunodiagnósticos para conseguir datos comparables a los resultados de la presente invención.

Para la determinación de la proteína APEX1, la muestra obtenida de un individuo se incuba in vitro con el agente de unión específica para APEX1 bajo condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión-APEX1. Dichas condiciones no necesitan especificarse ya que el experto en la materia sin esfuerzo inventivo podrá identificar fácilmente dichas condiciones de incubación apropiadas. Se determina la cantidad de complejo de agente de unión-APEX1 y se utiliza en la evaluación de la EPOC. Tal como apreciará el experto en la materia, existen numerosos métodos para determinar la cantidad de complejo de agente de unión específica-APEX1, la totalidad de los cuales se describe en libros de texto relevantes (ver, por ejemplo, Tijssen P., *supra*, o Diamandis E.P. y Christopoulos T.K. (editores), *Immunoassay*, Academic Press, Boston, 1996).

Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la materia. Los métodos para llevar a cabo dichos ensayos, así como las aplicaciones y procedimientos prácticos se resumen en manuales relacionados. Son ejemplos de libros de texto relacionados, Tijssen P., *Preparation of enzyme-antibody or other enzyme-macromolecule conjugates*, en: *Practice and theory of enzyme immunoassays*, páginas 221 a 278, Burdon R.H. y v. Knippenberg P.H. (editores), Elsevier, Amsterdam, 1990, y diversos volúmenes de *Methods in Enzymology*, Colowick, S.P., y Caplan, N.O. (editores), Academic Press), referidos a los métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

La presente invención se refiere además en una realización a la utilización de un anticuerpo de unión específica a la proteína APEX1 en un método según la presente invención.

5 En una realización, en un método según la presente invención, se mide la proteína APEX1 en un procedimiento de inmunoensayo.

En una realización adicional, se detecta la proteína APEX1 en un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).

10 En una realización adicional, se detecta la proteína APEX1 en un ensayo de tipo sándwich (formato de ensayo de tipo sándwich). En dicho ensayo, se utiliza un primer agente de unión para capturar la proteína APEX1 en una cara y se utiliza un segundo agente de unión específica, que se marca para que resulte directa o indirectamente detectable, en la otra cara. Los agentes de unión específicos utilizados en un formato de ensayo de tipo sándwich pueden ser anticuerpos dirigidos específicamente contra APEX1. Por otra parte, la detección puede llevarse a cabo mediante la utilización de diferentes anticuerpos de captura y marcados, es decir, anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en el polipéptido APEX1. Por otra parte, también puede llevarse a cabo un ensayo de tipo sándwich con un anticuerpo de captura y de marcaje que se dirija contra el mismo epítopo de la proteína APEX1. En dicha realización, sólo pueden detectarse formas diméricas y multiméricas de proteína APEX1. En una realización, se utiliza un anticuerpo contra la proteína APEX1 en un inmunoensayo cualitativo (APEX1 presente o ausente) o cuantitativo (se determina la cantidad de APEX1).

20 En una realización adicional, el método según la presente invención se basa en la medición de APEX1, en la que dicha medición de APEX1 se lleva a cabo en un inmunoensayo de tipo sándwich utilizando por lo menos dos anticuerpos reactivos con por lo menos dos epítomos no solapantes.

25 En una realización adicional, se detecta la proteína APEX1 en un ensayo competitivo. En dicho formato de ensayo, se utiliza un agente de unión que se une específicamente a APEX1 de SEC ID nº 5. En una mezcla, la proteína APEX1 marcada que ha sido añadida a la mezcla y APEX1 comprendida en la muestra compiten para la unión al agente de unión específica. El grado de dicha competencia puede medirse siguiendo procedimientos estándares.

30 La concentración de la proteína APEX1 en muestras de ensayo puede determinarse in vitro utilizando un ELISA específico, tal como ya se ha indicado anteriormente. Utilizando dicho formato de ensayo, los inventores han demostrado que las muestras de pacientes ya diagnosticados de EPOC mediante métodos clásicos, por ejemplo espirometría, pueden distinguirse de las muestras de individuos aparentemente sanos. Se muestran resultados en la sección de ejemplos de la presente solicitud.

35 Los inventores de la presente invención inesperadamente han podido detectar la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa. Todavía más inesperadamente, han podido demostrar que la presencia de proteína APEX1 en dicha muestra de suero, plasma o sangre completa obtenida de un individuo puede correlacionarse con la EPOC. No resulta necesaria ninguna muestra de tejido y de biopsia para utilizar el marcador APEX1 en la evaluación de la EPOC. La medición del nivel de proteína APEX1 en (por ejemplo una alícuota pequeña) de una simple muestra de suero, plasma o sangre completa se considera muy ventajosa en el campo de la EPOC.

45 En una realización preferente, se pone en práctica el método según la presente invención con suero como material de muestra. En una realización preferente adicional, se pone en práctica el método según la presente invención con plasma como material de muestra. En una realización preferente adicional, se pone en práctica el método según la presente invención con sangre completa como material de muestra.

50 En una realización preferente adicional, la presente invención se refiere a la utilización de proteína APEX1 como molécula marcadora en la evaluación in vitro de la EPOC a partir de una muestra de suero, plasma o sangre completa obtenida de un individuo.

55 El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un suceso o un proceso individual causaría la enfermedad respectiva, tal como, por ejemplo, en las enfermedades infecciosas. En todos los demás casos, el diagnóstico correcto puede resultar muy difícil, especialmente en el caso de que la etiología de la enfermedad no se comprenda completamente, tal como es el caso de la EPOC. Tal como apreciará el experto en la materia, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con una especificidad de 100% y simultáneamente con una sensibilidad de 100% para una enfermedad multifactorial dada, tal como, por ejemplo, la EPOC. Por el contrario, se utilizan marcadores bioquímicos para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo una cuestión diagnóstica subyacente, por ejemplo la presencia, ausencia o gravedad de una enfermedad. Por lo tanto, en el diagnóstico clínico rutinario, generalmente se consideran diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos conjuntamente en la evaluación de una enfermedad subyacente. Al experto en la materia estará totalmente familiarizado con los métodos matemáticos/estadísticos que se utilizan rutinariamente para calcular el riesgo relativo o probabilidad para

la cuestión diagnóstica que debe evaluarse. En la práctica clínica rutinaria, generalmente se consideran diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos conjuntamente en el diagnóstico, tratamiento y control de la enfermedad subyacente.

5 Los pacientes de EPOC tradicionalmente se tratan con broncodilatadores o esteroides y se examinan mediante espirometría para reversibilidad de la obstrucción de las vías respiratorias. En el caso de que la reversibilidad sea inferior a 15% y en particular en el caso de que presenten una larga historia de tabaquismo, se clasificarían como pacientes de EPOC.

10 Los criterios de la ATS (American Thoracic Society) para el diagnóstico de la EPOC son los siguientes:

- proporción VEF1/CVF < 0,7
- VEF1 < 70% lo predicho, < 15% reversibilidad con agonista de B2 inhalado:
- prueba de 2 semanas con prednisolona oral-reversibilidad inferior a 15% en VEF1
- Historia de tabaquismo

15 VEF1 es el volumen de aire expulsado de los pulmones en un segundo, partiendo de una posición de máxima inspiración y realizando el sujeto el máximo esfuerzo. VEF1 (%) es el VEF1 expresado como porcentaje de la capacidad vital forzada (CVF). CVF es el volumen total de aire expulsado de los pulmones partiendo de una posición de máxima inspiración con el sujeto realizando el máximo esfuerzo. Puede medirse VEF1 utilizando un espirómetro para medir el volumen de aire expulsado en el primer segundo de espiración.

20 La clasificación espirométrica de la EPOC según la ATS (American Thoracic Society)/European Respiratory Society 2004, se muestra en la Tabla 1. El estadio 0 de EPOC de la ATS actualmente ya no se utiliza en el sistema de clasificación de la ATS.

25

Tabla 1:

Estadio de la EPOC	Severidad	VEF1/CVF post-broncodilatador	% VEF1 pred
0	En riesgo [#]	> 0,7	≥ 80%
I	EPOC leve	≤ 0,7	≥ 80%
II	EPOC moderada	≤ 0,7	50% -80%
III	EPOC severa	≤ 0,7	30% -50%
IV	EPOC muy severa	≤ 0,7	< 30%

VEF1: Volumen espiratorio forzado en un segundo; CVF: Capacidad vital forzada; #: Pacientes que fuman o han sido expuestos a contaminantes, presentan tos, esputo o disnea, presentan una historia familiar de enfermedad respiratoria.

30 En la evaluación de la EPOC, la proteína marcadora APEX1 resultará ventajosa en uno o más de los aspectos siguientes: evaluación, cribado, estadificación de enfermedad, seguimiento de la progresión de la enfermedad, pronóstico, guía de la terapia y seguimiento de la respuesta a la terapia.

35 Las áreas preferentes de relevancia diagnóstica en la evaluación de un individuo que se sospecha o que se conoce que presenta EPOC son el cribado, la estadificación de la enfermedad, el seguimiento de la progresión de la enfermedad y el seguimiento de la respuesta a la terapia.

Cribado (evaluación de si los individuos presentan riesgo de desarrollar EPOC o que presentan EPOC):

40 Se define "cribado" como la aplicación sistemática de un ensayo para identificar individuos, por ejemplo individuos de riesgo, para indicadores de una enfermedad, por ejemplo la presencia de EPOC. Preferentemente, la población de cribado está compuesta de individuos que es conocido que presentan un riesgo superior al medio de sufrir EPOC. Por ejemplo, la población de cribado para la EPOC está compuesta de individuos que es conocido que presentan un riesgo superior al medio de sufrir EPOC, tal como fumadores y ex-fumadores.

45 El cribado en el sentido de la presente invención se refiere a la evaluación no sesgada de individuos respecto al riesgo de los mismos de desarrollar EPOC. En una realización, el método según la presente invención se utiliza con fines de cribado, es decir, se utiliza para evaluar sujetos humanos sin un diagnóstico previo de EPOC mediante: a) la determinación de la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) la comparación de la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de proteína APEX1, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de EPOC.

50 La medición de la proteína APEX1 ayudará al médico a evaluar la presencia o la ausencia de EPOC en un individuo

que se sospecha que presenta EPOC.

5 En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro para evaluar la presencia o ausencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto humano, que comprende: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de proteína APEX1, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de EPOC.

10 En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro para evaluar la presencia o ausencia de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto humano, que comprende: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de proteína APEX1, y c) evaluar la presencia o ausencia de EPOC basándose en la comparación de la etapa (b), en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de la presencia de EPOC.

20 En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro para evaluar la presencia o ausencia de EPOC en un sujeto humano, comprendiendo el método: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de proteína APEX1 establecida en una población de referencia, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de la presencia de EPOC. En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro para evaluar la presencia o ausencia de EPOC en un sujeto humano, comprendiendo el método: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con un valor de corte para la proteína APEX1 establecido en una población de referencia, en la que una concentración de proteína APEX1 inferior al valor de corte es indicativa de la ausencia de EPOC.

30 En una realización adicional, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína APEX1 en la evaluación in vitro de EPOC en una muestra de suero, plasma o sangre completa, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia para la proteína APEX1 es indicativa de EPOC.

35 En una realización preferente, dicha muestra según la utilización se selecciona de entre el grupo que consiste de suero, plasma y sangre completa.

40 En una realización adicional, la presente invención se refiere a la utilización de la proteína APEX1 en la evaluación in vitro de la EPOC en una muestra de suero, plasma o sangre completa, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia para la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa es indicativa de la presencia de EPOC.

45 Una realización de la presente invención se refiere al cribado de una población con el fin de distinguir entre individuos que probablemente no presentan EPOC y los individuos que probablemente presentan EPOC. A continuación el último grupo de individuos podría someterse a procedimientos diagnósticos adicionales, por ejemplo mediante pruebas de función pulmonar, espirometría u otros medios adecuados.

50 En una realización, el método in vitro según la presente invención se caracteriza porque tiene lugar la evaluación de la proteína APEX1 para clasificar un paciente según presente riesgo de EPOC para tomar decisiones clínicas, particularmente para el tratamiento posterior utilizando medicación para el tratamiento o terapia de la EPOC, y para el tratamiento o la terapia de infección/enfermedades inflamatorias de las vías respiratorias y el pulmón, así como para el control de la terapia de tratamiento antibiótico o de anticuerpos terapéuticos.

55 En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro para evaluar si un individuo presenta riesgo de desarrollar EPOC, comprendiendo las etapas de: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) evaluar dicho riesgo del individuo de desarrollar EPOC mediante la comparación de la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de proteína APEX1, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa para el individuo de que presenta riesgo de desarrollar EPOC.

60 Estadificación de pacientes

La concentración de APEX1 puede utilizarse como ayuda para clasificar los individuos investigados en el grupo de individuos que son clínicamente "normales" en un grupo de pacientes en riesgo de presentar EPOC y un grupo de

pacientes que presenta EPOC. La concentración de APEX1 puede utilizarse además para agrupar los pacientes en los estadios 0 a IV según el sistema de clasificación de la ATS (American Thoracic Society/European Respiratory Society, clasificación de 2004, mostrada en la Tabla 1). El experto en la materia concebirá otros sistemas de clasificación de la EPOC disponibles. Los resultados experimentales para la utilización de la proteína APEX1 para clasificar un paciente de EPOC en un estadio de EPOC se muestran en el Ejemplo 4 y en las figs. 3 y 4.

Pronóstico

Los indicadores pronósticos pueden definirse como características clínicas, patológicas o bioquímicas de los pacientes de EPOC que predicen con una determinada probabilidad el resultado de la enfermedad. Su utilización principal es en la ayuda a la planificación racional del control de un paciente, es decir, para evitar el infratratamiento de una enfermedad agresiva o el sobretatamiento de una enfermedad indolente, respectivamente.

Debido a que el nivel de proteína APEX1 por sí solo contribuye significativamente a la diferenciación de los pacientes de EPOC respecto a los controles sanos o a otras enfermedades del pulmón, por ejemplo asma, bronquitis, fibrosis pulmonar y tuberculosis, preferentemente para diferenciar la EPOC del asma, debe esperarse que ayudará a evaluar el pronóstico de los pacientes que sufren de EPOC. La concentración de proteína APEX1 probablemente se combinará con los resultados de las pruebas de función pulmonar o espirometría.

Diferenciación de EPOC y asma

En una realización adicional, el método según la presente invención se utiliza para diferenciar la EPOC de otros tipos de enfermedad pulmonar, preferentemente el asma.

También resulta preferente utilizar la proteína APEX1 para diferenciar la EPOC de otros tipos de enfermedad pulmonar, por ejemplo el asma, la bronquitis, la fibrosis pulmonar y la tuberculosis, preferentemente para diferenciar la EPOC del asma. Inesperadamente los inventores han encontrado que la utilización de una combinación de marcadores de un marcador específico de EPOC, preferentemente APEX1, y un marcador de inflamación seleccionado de entre el grupo que consiste de PRC, interleuquina-6, amiloide sérico A, S100 y selectina-E, puede conducir a diferenciar entre la EPOC y otras enfermedades inflamatorias del pulmón, por ejemplo el asma y la inflamación aguda o crónica del pulmón, respectivamente. Los resultados experimentales para la proteína APEX1 y la proteína PRC se muestran en la sección de ejemplos.

Seguimiento de la progresión de la enfermedad

Actualmente resulta muy difícil predecir con una probabilidad razonable si un paciente diagnosticado con EPOC presenta un estado más o menos estable o si la enfermedad progresará o no.

La progresión de la enfermedad, es decir de la EPOC, puede evaluarse mediante el seguimiento in vitro de la concentración de la proteína APEX1 en las muestras de ensayo, especialmente extrayendo una o más muestras consecutivas. Tal como se apreciará, un incremento del nivel de proSP-B C-terminal con el tiempo es indicativo de progresión de la enfermedad.

Seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia

El método según la presente invención, utilizado en el seguimiento del paciente, puede utilizarse para seguir los pacientes y, por ejemplo, para ayudar a evaluar la eficacia de un tratamiento para la EPOC.

El seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia puede ponerse en práctica, por ejemplo, estableciendo el nivel pre- y post-terapéutico del marcador para la proteína APEX1, y mediante la comparación del nivel pre- y post-terapéutico del marcador.

Puede evaluarse in vitro la respuesta de un paciente a un tratamiento para la EPOC mediante el seguimiento de la concentración de la proteína APEX1 en muestras de ensayo con el tiempo.

El nivel de proteína APEX1 aparentemente resulta apropiado para el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia. De esta manera, la presente invención se refiere además a la utilización de la proteína APEX1 en el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia, en el que un nivel reducido de la proteína APEX1 es un indicador positivo de un tratamiento eficaz de la EPOC.

Combinaciones de marcadores

Por lo tanto, la presente invención se refiere en una realización a la utilización de la proteína APEX1 como marcador

de un panel de marcadores para la evaluación de la EPOC. Dicho panel de marcadores comprende la proteína APEX y uno o más marcadores adicionales de la EPOC. Determinadas combinaciones de marcadores resultarán ventajosas, por ejemplo, en el cribado para la EPOC.

- 5 Tal como apreciará el experto en la materia, existen muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores para mejorar la respuesta a la cuestión diagnóstica investigada.

10 Los marcadores bioquímicos pueden determinarse individualmente o, en una realización de la invención, pueden determinarse simultáneamente, por ejemplo, utilizando un chip o una tecnología de matrices basada en perlas. Las concentraciones de los marcadores biológicos seguidamente se interpretan de modo independiente, por ejemplo utilizando un valor de corte individual para cada marcador, o se combinan para la interpretación.

15 Tal como apreciará el experto en la materia, la etapa de correlación del nivel de un marcador con una determinada probabilidad o riesgo puede llevarse a cabo y conseguirse de diferentes maneras.

20 Preferentemente, la concentración determinada de proteína APEX1 y el otro u otros marcadores se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Pueden combinarse valores de marcadores con la determinación de APEX1 mediante cualquier método matemático apropiado del estado de la técnica.

25 Preferentemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de aplicar dicho algoritmo matemático o dicha función logística preferentemente es un único valor. Dependiendo de la cuestión diagnóstica subyacente, dicho valor puede correlacionarse fácilmente con, por ejemplo, el riesgo para un individuo de sufrir EPOC o para otros usos diagnósticos deseados que resulten útiles en la evaluación de pacientes que presentan EPOC. De un modo preferente, dicha función logística se obtiene mediante:
 a) la clasificación de los individuos en grupos, por ejemplo en individuos normales, individuos en riesgo de EPOC, pacientes con inflamación aguda o crónica de pulmón, etc., b) identificación de marcadores que difieren significativamente entre estos grupos mediante análisis univariante, c) análisis de regresión logística para evaluar los valores discriminantes independientes de los marcadores que resultan útiles para evaluar dichos grupos diferentes, y
 30 d) construcción de la función logística para combinar los valores discriminantes independientes. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que representan una combinación de marcadores.

35 En una realización, la función logística utilizada para combinar los valores de APEX1 y el valor de por lo menos un marcador adicional se obtiene mediante: a) la clasificación de los individuos en grupos de normales e individuos que es probable que presenten EPOC, respectivamente, b) el establecimiento de los valores para APEX1 y el valor de por lo menos un marcador adicional, c) la realización del análisis de regresión logística, y d) la construcción de la función logística para combinar los valores de marcador para APEX1 y el valor de por lo menos un marcador adicional.

40 Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad preferentemente utiliza un algoritmo desarrollado y obtenido mediante la aplicación de métodos estadísticos. Los métodos estadísticos apropiados son, por ejemplo, el análisis discriminante (AD) (por ejemplo el AD lineal, cuadrático o regularizado), los métodos de núcleo (por ejemplo SVM), los métodos no paramétricos (por ejemplo los clasificadores del vecino k más próximo), PLS (es decir, los cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en
 45 árboles (por ejemplo la regresión lógica, CART, los métodos de bosque aleatorio y los métodos de boosting/bagging), los modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística), los métodos basados en los componentes principales (por ejemplo el SIMCA), los modelos aditivos generalizados, los métodos basados en lógica difusa, y los métodos basados en redes neuronales y los algoritmos genéticos. El experto en la materia no tendrá ninguna dificultad en seleccionar un método estadístico apropiado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención y obtener de esta manera un algoritmo matemático apropiado. En una realización, el método estadístico utilizado para obtener el algoritmo matemático utilizado en la evaluación de la EPOC se selecciona de entre AD (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrático o regularizado), los métodos de núcleo (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (por ejemplo los clasificadores del vecino k más próximo), PLC (cuadrados mínimos parciales), los métodos basados en árboles (por ejemplo regresión lógica, CART, métodos de bosque aleatorio, métodos de Boosting) o los modelos lineales generalizados (por ejemplo la regresión logística). Pueden encontrarse detalles referentes a dichos métodos estadísticos en las referencias siguientes: Ruczinski I. et al., J. of Computational and Graphical Statistics, 12:475-511, 2003; Friedman J. H., J. of the American Statistical Association 84:165-175, 1989; Hastie T. et al., The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001; Breiman L. et al., Classification and regression trees, California, Wadsworth International Group, California, 1984; Breiman L., Random Forests, Machine Learning, 45:5-32, 2001; Pepe M.S., The Statistical Evaluation of
 60 Medical Tests for Classification and Prediction, Oxford Statistical Science Series, 28, 2003; y Duda R. O. et al., Pattern Classification, Wiley Interscience, 2a edición, 2001.

Es una realización de la invención la utilización de un corte multivariante optimizado de la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo normales e individuos en riesgo de EPOC, pacientes de EPOC que responden a la terapia y fracasos de la terapia, pacientes que presentan una inflamación aguda de pulmón y pacientes de EPOC, pacientes de EPOC que muestran progresión de la enfermedad y pacientes de EPOC que no muestran progresión de la enfermedad, respectivamente.

El área bajo la curva de receptor-operador (=AUC) es un indicador del rendimiento o precisión de un procedimiento diagnóstico. La precisión de un método diagnóstico se describe mejor a partir de sus características operativas del receptor (COR) (ver especialmente Zweig M.H. y Campbell G., Clin. Chem. 39:561-577, 1993). El gráfico de COR es un gráfico de todas las parejas de sensibilidad/especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión a lo largo del intervalo completo de datos observados.

El rendimiento clínico de un ensayo de laboratorio depende de su precisión diagnóstica, o de la capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de un ensayo de distinguir correctamente dos condiciones diferentes de los sujetos investigados. Dichas condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad o progresión de la enfermedad frente a ausencia de progresión de la enfermedad.

En cada caso, el gráfico de COR ilustra el solapamiento entre las dos distribuciones a partir de un gráfico de la sensibilidad frente a 1-especificidad para el intervalo completo de umbrales de decisión. En el eje y se encuentra la sensibilidad, o la fracción de positivos verdaderos [definida como (número de resultados de ensayo positivos verdaderos)/(número de positivos verdaderos + números de resultados de ensayo falsos negativos)]. Lo anterior también se ha denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. En el eje x se encuentra la fracción falsa positiva, o 1-especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de negativos verdaderos + número de resultados falsos positivos)]. Es un índice de la especificidad y se calcula por completo a partir del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones positivas verdaderas y falsas positivas se calculan completamente por separado, mediante la utilización de los resultados de ensayo de dos subgrupos diferentes, el gráfico de ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto del gráfico de ROC representa una pareja de sensibilidad/1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Un ensayo con discriminación perfecta (sin solapamiento de las dos distribuciones de los resultados) presenta un gráfico de ROC que pasa a través de la esquina superior izquierda, mientras que la fracción positiva verdadera es 1,0 ó 100% (sensibilidad perfecta) y la fracción de falsos positivo es 0 (especificidad perfecta). El gráfico teórico para un ensayo sin discriminación (distribuciones idénticas de los resultados de los dos grupos) es una línea diagonal a 45° desde la esquina inferior izquierda y la esquina superior derecha. La mayoría de los gráficos se encuentra entre ambos extremos (en el caso de que el gráfico de ROC se encuentre completamente debajo de la diagonal a 45°, se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que", o viceversa). Cualitativamente, cuanto más próximo se encuentre el gráfico a la esquina superior izquierda, mayor será la exactitud global del ensayo.

Un objetivo conveniente de cuantificar la precisión diagnóstica de un ensayo de laboratorio es expresar su rendimiento mediante un único número. La medida global más común es el área bajo el gráfico de COR (AUC). Convencionalmente este área en todos los casos es $\geq 0,5$ (en el caso de que no se cumpla esta condición, puede revertirse la regla de decisión para que sí se cumpla). Los valores comprendidos entre 1,0 (separación perfecta de los valores de ensayo de los dos grupos) y 0,5 (sin ninguna diferencia aparente entre las distribuciones de los dos grupos de valores de ensayo). El área no sólo depende de una parte particular del gráfico, tal como el punto más próximo a la diagonal o la sensibilidad a una especificidad del 90%, sino del gráfico completo. Ésta es una expresión descriptiva cuantitativa de la proximidad del gráfico de ROC a un gráfico perfecto (área = 1,0).

La sensibilidad global del ensayo dependerá de la especificidad requerida para la puesta en práctica del método dado a conocer en la presente memoria. En determinados contextos preferentes, una especificidad de 75% puede resultar suficiente y los métodos estadísticos y algoritmos resultantes pueden basarse en este requisito de especificidad. En una realización preferente, el método utilizado para evaluar los individuos en riesgo de EPOC se basa en una especificidad de 80%, de 85%, o también preferentemente de 90% o de 95%.

Determinadas combinaciones de marcadores resultarán ventajosas en el cribado para la EPOC.

En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro de evaluación de la EPOC mediante marcadores bioquímicos, que comprende determinar en una muestra de suero, plasma o sangre completa, la concentración de proteína APEX1 y otro u otros marcadores, combinando matemáticamente la concentración determinada de la proteína APEX y la concentración de otro u otros marcadores, en la que un valor combinado incrementado es indicativo de la presencia de EPOC.

En una realización, la presente invención se refiere a un método in vitro de evaluación de la EPOC mediante

5 marcadores bioquímicos, que comprende determinar en una muestra, la concentración de proteína APEX1 y otro u otros marcadores, y comparar la concentración determinada de la proteína APEX1 con una concentración de referencia de proteína APEX1, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de la presencia de EPOC. Resulta preferente que otro u otros marcadores de dicho método se seleccionan de entre el grupo que consiste de ASC, ARMET, NNMT, FEN1 y seprasa. En una realización adicional, dicho panel de marcadores comprende por lo menos la proteína APEX1 y la proteína NNMT.

10 En una realización, la presente invención se refiere a la utilización del marcador APEX1 como molécula marcadora para la evaluación in vitro de la EPOC en combinación con una o más moléculas marcadores indicativa de EPOC. Por lo tanto, la presente invención se refiere en una realización a la utilización de APEX1 como un marcador de un panel de marcadores de EPOC, es decir, a un panel de marcadores que comprende la proteína APEX1 y uno o más marcadores adicionales con fines de cribado de la EPOC.

15 Por ejemplo, la presente invención se refiere además a la utilización de un panel de marcadores que comprende la proteína APEX1 y NNMT, o de un panel de marcadores que comprende la proteína APEX1 y dos o más marcadores seleccionados de entre el grupo que consiste de ASC, ARMET, NNMT, FEN1 y seprasa.

20 Los marcadores para la utilización en una combinación con la proteína APEX1 en el método según la presente invención se seleccionan de entre el grupo que consiste de ASC, ARMET, NNMT, FEN1 y seprasa. Estos marcadores pueden utilizarse individualmente, cada uno, o en cualquier combinación conjuntamente con APEX1 para la evaluación de la EPOC. En una realización adicional, la presente invención se refiere a un panel de marcadores (combinación de marcadores) seleccionado de entre el grupo que consiste de la proteína APEX1, ASC, ARMET, NNMT, FEN1, seprasa y PRC.

25 En una realización, el panel de marcadores utilizado en el método in vitro de evaluación de EPOC con marcadores bioquímicos comprende las etapas de determinar en una muestra de suero, plasma o sangre completa, la concentración de proteína APEX1 y de proteína NNMT, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia de proteína APEX1 es indicativa de la presencia de EPOC. En una realización adicional, el panel de marcadores utilizado en el método in vitro comprende las proteínas marcadoras APEX1, NNMT y seprasa. En una realización adicional, el panel de marcadores utilizado en el método in vitro comprende las proteínas marcadoras APEX1, NNMT, seprasa y ASC.

Marcadores de inflamación

35 Actualmente se conocen muchos marcadores séricos para el diagnóstico de una inflamación. Al experto en la materia le resultará familiar la expresión "marcador de inflamación". Dicho marcador de inflamación se selecciona, por ejemplo, de entre la interleuquina-6, la proteína C-reactiva, el amiloide A sérico, la selectina sE y una proteína S100.

40 La interleuquina-6 (IL-6) es una proteína secretada de 21 kDa que presenta numerosas actividades biológicas que pueden dividirse en las que participan en la hematopoyesis y las que participan en la activación de la respuesta inmunológica innata. La IL-6 es un reactivo de fase aguda y estimula la síntesis de una diversidad de proteínas, incluyendo las moléculas de adhesión. Su función principal es mediar en la producción en fase aguda de las proteínas hepáticas, y su síntesis resulta inducida por las citoquinas IL-1 y TNF- α . IL-6 es normalmente producida por los macrófagos y los linfocitos T. La concentración sérica normal de IL-6 es <5 pg/ml.

50 La proteína C reactiva (PRC) es una proteína homopentamérica de fase aguda de unión a Ca^{2+} con subunidades de 21 kDa que participa en la defensa del huésped. La síntesis de la CRP resulta inducida por la IL-6 e indirectamente por la IL-1, ya que la IL-1 puede inducir la síntesis de IL-6 por parte de las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración plasmática normal de CRP es <3 mg/ml (30 nM) en el 90% de la población sana y <10 mg/ml (100 nM) en el 99% de los individuos sanos. Las concentraciones plasmáticas de CRP pueden medirse, por ejemplo, mediante un inmunoensayo. Las concentraciones plasmáticas de CRP pueden medirse, por ejemplo, mediante formatos de ensayo homogéneos o ELISA.

55 El amiloide A sérico (=AAS) es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular (11,7 kDa). Es sintetizada predominantemente por el hígado en respuesta a la estimulación por IL-6, IL-6 o TNF- α y participa en la regulación de la respuesta inmunológica dependiente de las células T. En los sucesos agudos la concentración de la AAS se incrementa hasta 1.000 veces, alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para realizar un seguimiento de la inflamación en enfermedades tan diversas como la fibrosis quística, el rechazo del injerto renal, traumatismos o infecciones. En la artritis reumatoide se ha utilizado en determinados casos como sustituto de la CRP, aunque el SAA todavía no está tan ampliamente aceptado.

60 Las proteínas S100 forman una familia constantemente creciente de proteínas ligantes de Ca^{2+} que actualmente

incluye más de 20 miembros. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero, aunque algunas también pueden formar heterodímeros entre sí, por ejemplo S100A8 y S100A9. Las funciones intracelulares abarcan desde la regulación de la fosforilación de las proteínas, las actividades enzimáticas, la dinámica del citoesqueleto y la participación en la proliferación y diferenciación celulares. Debido a que algunas proteínas S100 también son liberadas por las células, también se han descrito funciones extracelulares, por ejemplo la supervivencia neuronal, la proliferación de los astrocitos, la inducción de la apoptosis y la regulación de los procesos inflamatorios. S100A8, S100A9, y los heterodímeros S100A8/A9 y S100A12 se han observado en la inflamación, respondiendo S100A8 a la inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se encuentran incrementadas en la inflamación aguda. Se ha asociado S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 a diferentes enfermedades con componentes inflamatorios, incluyendo algunos cánceres, el rechazo del aloinjerto renal, la colitis y, notablemente, con la AR (Burmeister G. y Gallacchi G., *Inflammopharmacology* 3:221-230, 1995; Foell D. et al., *Rheumatology* 42:1383-1389, 2003).

La selectina sE (molécula-1 de adhesión leucocitaria endotelial soluble, ELAM-1, por sus siglas en inglés) es una glucoproteína transmembranal de tipo I de 115 kDa que se expresa únicamente sobre las células endoteliales y sólo tras la activación por citoquinas inflamatorias (IL-1 β , FNT- α) o endotoxinas. La selectina-E de superficie celular es un mediador de la unión de los leucocitos rodantes al endotelio, una etapa esencial en la extravasación de los leucocitos en el sitio de inflamación, desempeñando de esta manera un papel importante en la respuesta inflamatoria localizada. La selectina-E soluble se observa en la sangre de los individuos sanos, probablemente surgida del corte proteolítico de la molécula expresada en superficie. Los niveles elevados de selectina sE en suero se han informado bajo una diversidad de condiciones patológicas (Gearing A.J. y Hemingway I., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 667:324-331, 1992).

Una matriz es una colección de marcadores individuales direccionables. Dichos marcadores pueden ser espacialmente direccionables, tales como matrices contenidos en placas de microtitulación o impresos sobre superficies planas en las que cada marcador se encuentra presente en coordenadas X e Y diferentes. Alternativamente, los marcadores pueden ser direccionables basándose en etiquetas, perlas, nanopartículas o propiedades físicas. Puede prepararse una matriz biochip según los métodos conocidos por el experto ordinario en la materia (ver, por ejemplo, la patente US nº 5.807.522; Robinson W.H. et al., *Nat. Med.* 8:295-301, 2002; Robinson W.H. et al., *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 885-893). El término "matriz" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier ensayo inmunológico con múltiples marcadores direccionables. Un matriz biochip, también conocido por el experto en la materia como micromatriz, es una forma miniaturizada de una matriz.

Los términos "chip", "biochip", "chip de polímero" o "chip de proteína" se utilizan intercambiamente y se refieren a una colección de un gran número de sondas, marcadores o marcadores bioquímicos dispuestos sobre un sustrato compartido que podría ser una parte de una oblea de silicio, una tira de nilón, una tira de plástico o un portaobjetos de vidrio.

Una "matriz", "macromatriz" o "micromatriz" es una colección deliberadamente creada de sustancias, tales como moléculas, marcadores, aberturas, microbobinas, detectores y/o sensores, unidos o fabricados en un sustrato o superficie sólida, tal como vidrio, plástico, chip de silicio u otro material que forma una matriz. Las matrices pueden utilizarse para medir los niveles de gran número, por ejemplo decenas, miles o millones, de reacciones o combinaciones simultáneamente. Una matriz puede contener además un número reducido de sustancias, por ejemplo una, unas cuantas o una docena. Las sustancias en la matriz pueden ser idénticas o diferentes. La matriz puede adoptar una diversidad de formatos, por ejemplo bibliotecas de moléculas solubles, bibliotecas de moléculas inmovilizadas, bibliotecas de anticuerpos inmovilizados, bibliotecas de compuestos anclados en perlas de resina, chips de sílice u otros soportes sólidos. La matriz puede ser una macromatriz o una micromatriz, según el tamaño de las almohadillas en la matriz. Una macromatriz generalmente contiene tamaños de almohadilla de aproximadamente 300 micrómetros o mayores y puede obtenerse una imagen fácilmente mediante escáners de gel y de filtro. Una micromatriz generalmente contendría tamaños de almohadilla inferiores a 300 micrómetros.

Un "soporte sólido" es material polimérico insoluble funcionalizado al que pueden engancharse o unirse covalentemente elementos de biblioteca o reactivos (con frecuencia mediante un conector) para inmovilizarse o dejar que se separen fácilmente (mediante filtración, centrifugación, lavado, etc.) de los reactivos en exceso, productos secundarios de reacción solubles, o solventes.

Los ejemplos, listado de secuencias y figuras siguientes se proporcionan para ayudar a la comprensión de la presente invención.

60 Descripción de las figuras

Figura 1 la fig. 1 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (gráfico COR) de la proteína APEX1 en muestras de EPOC con un AUC de 0,87 (COR 87%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes

con EPOC en comparación con 186 muestras de control obtenidas de individuos de control sanos. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); eje Y: sensibilidad (positivos verdaderos).

Figura 2 la fig. 2 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (gráfico COR) de PRC en muestras de EPOC con un AUC de 0,74 (COR 74%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con 186 muestras de control obtenidas de individuos de control sanos. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); eje Y: sensibilidad (positivos verdaderos).

Figura 3 la fig. 3 muestra la distribución en gráfico de caja y bigotes de los valores de concentración sérica de APEX1 determinados según los estadios 0-IV de la EPOC de las 123 muestras de EPOC (estadio de EPOC tal como se indica en la Tabla 1).

Figura 4 la fig. 4 muestra la distribución en gráfico de caja y bigotes de los valores de concentración sérica de PRC determinados según los estadios 0-IV de la EPOC de las 123 muestras de EPOC (estadio de EPOC tal como se indica en la Tabla 1).

Figura 5 la fig. 5 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de la proteína APEX1 en muestras de EPOC con un AUC de 0,83 (COR 83%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con 26 muestras de control obtenidas de pacientes de asma Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); eje Y: sensibilidad (positivos verdaderos).

Figura 6 la fig. 6 muestra el gráfico de las características operativas del receptor (gráfico COR) de PRC en muestras de EPOC con un AUC de 0,70 (COR 70%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con 26 muestras de control obtenidas de pacientes con asma. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); eje Y: sensibilidad (positivos verdaderos).

Figura 7 la fig. 7 muestra la distribución en gráfico de caja y bigotes de la concentración sérica de APEX1 determinada [$\mu\text{g}/\text{ml}$] según las 123 muestras de EPOC de estadios 0-IV (4_EPOC), 50 de individuos sanos (1_Sano), 135 de controles de cribado (2_control de cribado) y 26 de pacientes de asma (3_Aasma). Se ajustó el eje y para una mejor 'visualización'.

Figura 8 la fig. 8 muestra el gráfico de las características de receptor-operador (gráfico COR) de la proteína APEX1 en muestras de EPOC para las combinaciones de marcadores APEX1 (línea continua), APEX1+NNMT (línea discontinua) y APEX1+NNMT+seprasa (línea de puntos) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con 161 muestras de control obtenidas de controles sanos y pacientes de asma. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); eje Y: sensibilidad (positivos verdaderos).

Descripción de las secuencias

SEC ID nº 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína ASC humana (base de datos SwissProt, número de acceso: Q9ULZ3).

SEC ID nº 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína ARMET humana (base de datos SwissProt, número de acceso: P55145).

SEC ID nº 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína NNMT humana (base de datos SwissProt, número de acceso: P40261).

SEC ID nº 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína FEN1 humana (base de datos SwissProt, número de acceso: P39748).

SEC ID nº 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína APEX1 humana (base de datos SwissProt, número de acceso: P27695).

SEC ID nº 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína seprasa humana (base de datos SwissProt, número de acceso: Q12884).

SEC ID nº 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína DPPIV humana (base de datos SwissProt, número de acceso: P27487).

SEC ID nº 8 Cebador directo LC38for-*EcoRI*

SEC ID nº 9 Cebador inverso LC38rev-*BamHI*

SEC ID nº 10 extensión peptídica N-terminal.

Ejemplo 1

Población de estudio de EPOC

Fuentes de muestras de suero:

Con el fin de identificar las proteínas específicas de EPOC como potenciales marcadores diagnósticos de EPOC, se obtuvieron muestras de suero de pacientes bien caracterizados con EPOC (sistema de clasificación de la ATS según la Tabla 1) en un estudio multicéntrico nacional. Se llevó a cabo una espirometría en cada donante de muestras. Se documentó la función pulmonar, otras pruebas diagnósticas así como el motivo para la remisión, el diagnóstico y las comorbilidades en un formulario de informe de caso (FIC). Las muestras de EPOC se evaluaron en comparación con muestras de control obtenidas de los grupos de control 1 a 4, tal como se muestra en la Tabla 2.

Preparación de muestras de suero:

Se introdujeron muestras de suero en un tubo de suero y se dejó que coagulasen durante como mínimo 60 minutos y hasta 120 minutos, a temperatura ambiente. Tras la centrifugación (10 min., 2.000g), se dividió el sobrenadante en alícuotas de 1 ml y se congelaron a -70°C. Antes de las mediciones se descongelaron las muestras, se dividieron nuevamente en alícuotas de volumen más pequeño, apropiado para los ensayos de prototipo y de referencia y se congelaron nuevamente. Las muestras se descongelaron inmediatamente antes del análisis. Por lo tanto, cada muestra en el panel se sometió a únicamente dos ciclos de congelación-descongelación antes de las mediciones.

10 Ejemplo 2.1Generación de anticuerpos contra la proteína marcadora APEX1

Se generó anticuerpo policlonal contra la proteína marcadora APEX1 para la utilización posterior del anticuerpo en la medición de los niveles en suero, plasma y sangre de APEX1 mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo mediante transferencia western y ELISA.

Expresión de proteínas recombinantes en *E. coli*:

20 Con el fin de generar anticuerpos contra APEX1, se produjo el antígeno recombinante en *E. coli*: Por lo tanto, se amplificó por PCR la región codificante de APEX1 a partir del clon de ADNc de longitud completa IRAT p970H075D obtenido del German Resource Center for Genome Research (RZPD, Berlín, Alemania) utilizando los cebadores siguientes:

25 Cebador directo LC38for-*EcoRI* (SEC ID nº 8): (sitio *EcoRI* subrayado y codón de inicio subrayado),
 5'ACGTACGTGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACTATGAGAGGATCG
 CATCACCATCACCATCACATTGAAGGCCGTCGAAGCGTGGGAAAAAGG

Cebador inverso LC38rev-BamHI (SEC ID nº 9):

30 5'CGTACGTGGATCCTCATTACAGTGCTAGGTATAGGGTGATAGG
 (sitio BamHI subrayado).

El cebador directo muestra (aparte de los sitios *EcoRI* de clonación y de unión ribosómica) los oligonucleótidos codificantes de una extensión peptídica N-terminal MRGSHHHHHHIEGR (SEC ID nº 10) insertados en el marco de lectura del polipéptido APEX1. El fragmento de PCR digerido con *EcoRI*/*BamHI* se ligó en el fragmento correspondiente del vector pQE-30 (Qiagen, Hilden, Alemania), que posteriormente se transformó en células *E. coli* XL1-blue competentes. Tras el análisis de secuencias, el plásmido se transformó en células de *E. coli* BL21 competentes para la expresión bajo el promotor de T5 inducible con IPTG de la serie de vectores pQE siguiendo las instrucciones del fabricante.

40 Para la purificación de la proteína de fusión MRGSHHHHHHIEGR-APEX1, se peletizó mediante centrifugación 1 litro de un cultivo bacteriano inducido durante la noche y el pellet celular se resuspendió en tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 8,0, hidrocloreuro de guanidinio 7 M, imidazol 5 mM, tioglicerol 20 mM. El material insoluble se peletizó mediante centrifugación y el sobrenadante se hizo pasar por una columna de afinidad de Ni-ácido nitriloacético (Ni-NTA). La columna se lavó con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis seguido de lavados con: a) tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 8,0, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, urea 8 M, tioglicerol 20 mM; b) tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 8,0, dodecilsulfato sódico al 0,5% (SDS), tioglicerol 20 mM, y c) tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 8,0, SDS al 0,1%, tioglicerol 20 mM. Finalmente, el antígeno unido se eluyó utilizando tampón de fosfato sódico 100 mM, pH 5,0, SDS al 0,1%, tioglicerol 20 mM, bajo condiciones ácidas, y se almacenó en el mismo tampón a 4°C.

Generación de anticuerpos policlonales:

50 a) Inmunización

Para la inmunización, se preparó una emulsión fresca de la solución de proteína (100 µg/ml de proteína APEX1) y adyuvante completo de Freund en una proporción 1:1. Se inmunizó cada conejo con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrajo sangre y el suero anti-APEX1 resultante se utilizó para los experimentos posteriores.

b) Purificación de IgG (inmunoglobulina G) procedente de suero de conejo mediante precipitación secuencial con ácido caprílico y sulfato amónico

60 Se diluyó un volumen de suero de conejo con 4 volúmenes de tampón acetato (60 mM, pH 4,0). Se ajustó el pH a

4,5 con base Tris 2 M. Se añadió gota a gota ácido caprílico (25 µl/ml de muestra diluida) bajo agitación vigorosa. Tras 30 minutos, la muestra se centrifugó (13000 x g, 30 minutos, 4°C), se descartó el pellet y se recogió el sobrenadante. Se ajustó el pH del sobrenadante a 7,5 mediante la adición de base Tris 2 M y se filtró (0,2 µm).

5 Se precipitó la inmunoglobulina en el sobrenadante bajo agitación vigorosa mediante la adición gota a gota de una solución 4 M de sulfato amónico hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recogieron mediante centrifugación (8.000 x g, 15 minutos, 4°C).

10 Se descartó el sobrenadante. Se disolvió el pellet en NaH₂PO₄/NaOH 10 mM, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializó exhaustivamente. Se centrifugó el dializado (13000 x g, 15 minutos, 4°C) y se filtró (0,2 µm).

Biotinilación de IgG policlonal de conejo:

15 Se llevó la IgG policlonal de conejo a 10 mg/ml en NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por cada ml de solución de IgG se añadieron 50 µl de biotín-N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografió en Superdex 200 (NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG biotinilada. Los anticuerpos monoclonales se biotinilaron siguiendo el mismo procedimiento.

20 Digoxigenilación de IgG policlonal de conejo:

25 Se llevó la IgG policlonal de conejo a 10 mg/ml en NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por cada ml de solución de IgG, se añadieron 50 µl de ácido digoxigenín-3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico-éster de N-hidroxisuccinimida (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, nº de cat. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Tras 30 minutos a temperatura ambiente, la muestra se cromatografió en Superdex[®] 200 (NaH₂PO₄ 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contenían IgG digoxigenilada. Los anticuerpos monoclonales se marcaron con digoxigenina siguiendo el mismo procedimiento.

30 Ejemplo 2.2

PRC

35 Se midió la proteína marcadora PRC utilizando un ensayo homogéneo (Hitachi) distribuido por Roche Diagnostics, Mannheim (FRG).

Ejemplo 3

ELISA para la medición de APEX1 en muestras humanas de suero o plasma

40 Para la detección de APEX1 en muestras de suero o plasma humano, se reveló un ELISA de tipo sándwich. Para la captura y detección del antígeno, se conjugaron alícuotas del anticuerpo contra APEX1 con biotina y digoxigenina, respectivamente.

45 Se mezclaron las muestras (20 µl) en pocillos separados de una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina con 100 µl de reactivo de anticuerpos que contenía 0,12 mg/ml de cada anticuerpo marcado con biotina y con digoxigenina en tampón de incubación (fosfato 40 mM, tartrato sódico 200 mM, EDTA 10 mM, fenol al 0,05%, polietilenglicol-40000 al 0,1%, Tween-20 al 0,1%, BSA al 0,2%, IgG bovino al 0,1%, 5-bromo-5-nitro-1,3-dioxano ajustado a pH 7,4, complementado con 200 µg/ml de fragmentos Fab de IgG de ratón monoclonal polimérico para la eliminación de la respuesta de anticuerpos humanos antirrata (HARA); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11096478-001).

50 Tras la incubación durante una hora, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0,05%).

55 En la etapa siguiente, los pocillos se incubaron con 30 mU/ml de conjugado de anti-digoxigenina-HRP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 1633716) en tampón de conjugado Universal (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 11684825) durante 60 min. y se lavaron tal como anteriormente.

60 A continuación, los pocillos se incubaron durante 30 min. con 100 µl de solución de sustrato TMB (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº de catálogo 12034425). La adición de ácido sulfúrico 2 N (50 µl) detuvo el desarrollo del color y transformó el color azul en amarillo. Se leyó la DO a 450 nm en un lector de placas de ELISA.

Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente. Las muestras de suero o plasma humano se prediluyeron con tampón de incubación al 5%. Para la calibración, se utilizó suero humano como estándar. Se diluyó con tampón de incubación al 2/4/8/16/32% para preparar calibradores con valores asignados arbitrariamente de 2/4/8/16/32 unidades/ml, respectivamente.

Se calculó la ecuación de la curva de calibración mediante ajuste de curvas no lineal por mínimos cuadrados (Wiemer-Rodbard) y se utilizó para convertir la lectura de absorbancia de un pocillo en el valor de concentración correspondiente. El resultado se multiplicó por el factor de predilución para obtener la concentración de la muestra respectiva misma.

Ejemplo 4

APEX1 como marcador sérico de EPOC

Se utilizaron muestras de suero derivadas de 123 pacientes bien caracterizados de EPOC con la clasificación de la ATS de EPOC estadios 0-IV mostrada en la Tabla 1. Se muestra la población de estudio en la Tabla 2.

Tabla 2: Población de estudio

Tipo de muestra	Número de muestras
EPOC estadio 0-IV (según la clasificación de la ATS mostrada en la Tabla 1)	123
Control 1: no fumadores sanos (función pulmonar normal)	50
Control 2: fumadores sanos y ex-fumadores (función pulmonar normal)	88
Control 3: Individuos sanos con riesgo ocupacional (amianto, sílice, polvo, etc.)	48
Control 4: pacientes de asma	26

La concentración sérica de la proteína APEX1 en las muestras de EPOC se evaluó respecto a muestras de control (controles 1, 2 y 3) obtenidos de individuos evidentemente sanos (=cohorte de control) y pacientes de asma (control 4) con una AUC de 0,87 (Tabla 3). Se muestra en la fig. 1 una curva de características operativas del receptor (COR) de los resultados representados en la Tabla 3 del marcador APEX1. Los datos determinados para el marcador de inflamación PRC se muestran en la fig. 2. La AUC del marcador APEX1 es superior a la AUC de la PRC.

Tabla 3: análisis COR de la proteína marcadora frente a la PRC

Marcador	APEX1	PRC
COR	87%	74%

Se determinó el valor de corte en el colectivo de control mediante el cálculo del percentil 95% que resulta en una especificidad de 95%. Se evaluó el potencial diagnóstico del biomarcador mediante el cálculo de las curvas de características operativas del receptor (COR) (Tabla 3) o de la sensibilidad clínica a la especificidad prefijada de 95% (Tabla 4). La sensibilidad para un valor de corte vs individuos sanos (control 1) para la EPOC del marcador APEX1 era de 73%. Con un valor de corte que rinde una especificidad de 95% en la cohorte de control respectiva (controles 1, 2 y 3: no fumadores sanos, fumadores, ex-fumadores e individuos con riesgo ocupacional de desarrollar EPOC), la sensibilidad del marcador APEX1 para un valor de corte para el cribado general para EPOC era de 63%.

Tabla 4: sensibilidad y especificidad de la proteína marcadora frente a la PRC

Marcador	APEX1	PRC
especificidad	95 %	95 %
sensibilidad (control de corte 1)	73 %	31 %
sensibilidad (controles de corte 1, 2 y 3)	63 %	24 %

Al aplicar un valor de corte (especificidad de 95%) basado en el control 1 (control sano según la Tabla 2) o basado en los controles 1, 2 y 3 (controles de cribado según la Tabla 2), la sensibilidad del marcador APEX1 era superior a la sensibilidad de la PRC (Tabla 4). Lo anterior también se refleja en el análisis de COR, en el que el marcador APEX1 mostraba una AUC superior a la del marcador PRC (Tabla 3).

Los datos determinados para la proteína APEX1 en las muestras de EPOC según los estadios de EPOC de la ATS 0-IV se utilizaron para calcular el gráfico de cajas y bigotes mostrado en la fig. 3, que representa la correlación de la concentración en suero de proteína APEX1 respecto a EPOC según la ATS estadios 0-IV. Los datos determinados para la proteína PRC en cada muestra clasificada según los estadios de EPOC de la ATS 0-IV se utilizaron para calcular el gráfico de cajas y bigotes mostrado en la fig. 4, que representa la correlación de la concentración en suero de PRC con el estadio de EPOC.

El marcador APEX1 pudo clasificar los pacientes de EPOC en los estadios 0-IV de la ATS.

Ejemplo 5

5 APEX1 como marcador sérico para diferenciar la EPOC y el asma en el ser humano

10 Se analizaron utilizando el marcador APEX1 muestras derivadas de 123 pacientes de EPOC bien caracterizados según la clasificación en estadios de EPOC de la ATS 0-IV mostrada en la Tabla 1, así como muestras derivadas de 26 pacientes de asma (control 4 tal como se muestra en la Tabla 2). Con un valor de corte que rinde una especificidad de 95% frente a la cohorte de control de asma, la sensibilidad para EPOC era de 83% (Tabla 5).

La sensibilidad para diferenciar la EPOC del asma con el marcador APEX1 era más alta que la sensibilidad del marcador de inflamación PRC.

15 Tabla 5: diferenciación de EPOC respecto al asma mediante el uso de proteínas marcadoras

Marcador	APEX1	PRC
especificidad (vs. asma)	95 %	95 %
sensibilidad (para EPOC)	64 %	25 %
COR	83 %	70 %

20 Una representación gráfica de los resultados del marcador APEX1 se muestra en la fig. 5 como curvas de características operativas del receptor (COR). Los resultados para el marcador de inflamación PRC se muestran en la fig. 6 como curvas de características operativas del receptor (COR).

25 Los datos determinados para la proteína APEX1 en muestras de EPOC se utilizaron para calcular el gráfico de cajas y bigotes mostrado en la fig. 7 basado en los datos mostrados en la Tabla 6, que representa la correlación entre la concentración en suero de la proteína APEX1 con los estadios de EPOC de la ATS 0-IV (n=123, tal como se muestra en la Tabla 2) vs. muestras de sujetos sanos (n=50), muestras del control de cribado (n=135) y pacientes de asma (n=26). Aunque los valores medios de los controles (sanos, control de cribado y asma) se encontraban comprendidos entre 0,16 y 0,24 µg/ml, las concentraciones de APEX1 de los pacientes con EPOC eran significativamente superiores, con un valor medio de 0,83 µg/ml. Se muestran los resultados en la Tabla 6:

Tabla 6: variabilidad de APEX1

APEX1	N	mínimo [µg/ml]	máximo [µg/ml]	valor medio [µg/ml]	dev. est.	valor del error estándar de la media	IC al 95% extremo inferior	IC al 95% extremo superior
1_Sano	50	0	0,468	0,15856	0,101432	0,014345	0,129733	0,187387
2_Control de cribado	135	0	1,384	0,217449	0,158182	0,013564	0,190623	0,244274
3_Asma	26	0,036	0,859	0,238038	0,16736	0,032822	0,17044	0,305637
4_EPOC	123	0,065	9,132	0,829301	1,02342	0,092279	0,646626	1,011976

30 Ejemplo 6

Combinaciones de marcadores / análisis estadístico y resultados

35 Se utilizó la regresión logística penalizada (RLP) como modelo matemático para las combinaciones de marcadores, implementada en el R-toolbox "glmnet" (<http://cran.r-project.org/>). Para la búsqueda de un marcador adicional, el marcador inicial entró de manera no penalizada en el modelo, mientras que todos los demás marcadores se sometieron a penalización.

40 La optimización del algoritmo (selección del tipo de penalización y su parámetro de penalización) se llevó a cabo mediante una validación cruzada de 10 veces repetida interna, mientras que los parámetros de rendimiento (sensibilidad y especificidad) se obtuvieron basándose en una validación cruzada de 10 veces repetida externa.

45 La tabla de datos original se dividió en 10 partes, seguidamente 9 de estas partes formaron un conjunto de datos de entrenamiento y la décima parte formó el conjunto de datos de ensayo. A continuación, los datos de entrenamiento se dividieron en 10 partes, seguidamente 9 de estas partes formaron un subconjunto de datos de entrenamiento y la décima parte formó el subconjunto de datos de ensayo. Con estos sub-conjuntos de datos, se optimizó el parámetro de penalización basado en el número de marcadores adicionales. Con este valor optimizado se aplicó la RLP en el

conjunto completo de datos de entrenamiento para generar una regla diagnóstica. Se determinó un umbral de las probabilidades de caso posterior estimadas con los controles, así como con los casos del conjunto de datos de entrenamiento para obtener una especificidad y sensibilidad aparentes de 90% para la regla diagnóstica multivariante. A continuación, se aplicó dicha regla al conjunto de datos de ensayo para estimar la sensibilidad y la especificidad en el umbral dado. La validación cruzada de 10 veces externa se repitió 50 veces; la validación cruzada interna se repitió 25 veces.

Un análisis pormenorizado de las operaciones individuales de la validación cruzada reveló que el mejor marcador adicional para APEX1 era NNMT, ya que fue seleccionado como el mejor marcador adicional en todas las operaciones. El mejor modelo con dos marcadores adicionales era APEX1 más NNMT y seprasa. El mejor modelo con tres marcadores adicionales era APEX1 más NNMT, seprasa y ASC.

Se analizaron muestras obtenidas de 123 pacientes de EPOC bien caracterizados según la clasificación de la EPOC de la ATS en estadios 0-IV, tal como se muestra en la Tabla 2, así como una cohorte de control que consistía de 161 muestras derivada de pacientes sanos (n=136) y de asma (n=25).

En la Tabla 7, se proporcionan los rendimientos de clasificación de dichas combinaciones con el conjunto de datos de entrenamiento y el de datos de ensayo basándose en una especificidad de 90%.

Los resultados en la Tabla 7 muestran claramente que mediante la combinación de un marcador adicional, puede mejorarse significativamente la sensibilidad en comparación con APEX1 como marcador único sin ninguna pérdida de especificidad.

Tabla 7: combinaciones de marcadores con una especificidad de 90%

Combinación	Sens. entren. [log]	Espec. entren. [log]	Sens. ensayo [log]	Espec. ensayo [log]
APEX1+NNMT	0,75 (0,72-0,78)	0,9 (0,89-0,9)	0,75 (0,74-0,76)	0,89 (0,88-0,9)
APEX1+NNMT+Seprasa	0,8 (0,77-0,83)	0,9 (0,89-0,9)	0,8 (0,79-0,81)	0,89 (0,88-0,9)
APEX 1+NNMT+Seprasa+ASC	0,8 (0,77-0,84)	0,9 (0,89-0,9)	0,8 (0,78-0,82)	0,89 (0,88-0,9)

En la Tabla 8, se proporcionan los rendimientos de clasificación de dichas combinaciones con el conjunto de datos de entrenamiento y el de datos de ensayo basándose en una sensibilidad de 90%. Los resultados en la Tabla 8 muestran claramente que mediante la combinación de un marcador adicional, puede mejorarse significativamente la sensibilidad en comparación con APEX1 como marcador único sin ninguna pérdida de sensibilidad.

Tabla 8: combinaciones de marcadores con una sensibilidad de 90%

Combinación	Sens. entren. [log]	Espec. entren. [log]	Sens. ensayo [log]	Espec. ensayo [log]
APEX1+NNMT	0,9 (0,89-0,9)	0,74 (0,71-0,78)	0,89 (0,87-0,9)	0,74 (0,73-0,76)
APEX1+NNMT+Seprasa	0,9 (0,89-0,9)	0,77 (0,74-0,83)	0,89 (0,88-0,9)	0,77 (0,76-0,79)
APEX1+NNMT+Seprasa+ASC	0,9 (0,89-0,9)	0,77 (0,73-0,83)	0,89 (0,86-0,9)	0,76 (0,75-0,79)

Con un valor de corte que rinde una especificidad de 90% vs. cohorte de control, la sensibilidad para un valor de corte para el cribado general con APEX1 es de 85,3%, con APEX1+NNMT era de 91,6%, con APEX1+NNMT+seprasa era de 92,7% y con APEX1+NNMT+seprasa+ASC era de 93,1% (la combinación de 4 marcadores no se muestra en la fig. 8). Una representación gráfica de los resultados del marcador APEX1 y de las combinaciones de marcadores de hasta 3 marcadores se muestra en la fig. 8 como curvas de características operativas del receptor (COR).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Roche Diagnostics GmbH
F. Hoffmann-La Roche AG

<120> APEX1 como marcador de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

ES 2 578 502 T3

<130> 27350 WO-TH

<150> EP11157922.3

<151> 2011-03-11

5

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

Met Gly Arg Ala Arg Asp Ala Ile Leu Asp Ala Leu Glu Asn Leu Thr
1 5 10 15

Ala Glu Glu Leu Lys Lys Phe Lys Leu Lys Leu Leu Ser Val Pro Leu
20 25 30

Arg Glu Gly Tyr Gly Arg Ile Pro Arg Gly Ala Leu Leu Ser Met Asp
35 40 45

Ala Leu Asp Leu Thr Asp Lys Leu Val Ser Phe Tyr Leu Glu Thr Tyr
50 55 60

Gly Ala Glu Leu Thr Ala Asn Val Leu Arg Asp Met Gly Leu Gln Glu
65 70 75 80

Met Ala Gly Gln Leu Gln Ala Ala Thr His Gln Gly Ser Gly Ala Ala
85 90 95

Pro Ala Gly Ile Gln Ala Pro Pro Gln Ser Ala Ala Lys Pro Gly Leu
100 105 110

His Phe Ile Asp Gln His Arg Ala Ala Leu Ile Ala Arg Val Thr Asn
115 120 125

Val Glu Trp Leu Leu Asp Ala Leu Tyr Gly Lys Val Leu Thr Asp Glu
130 135 140

Gln Tyr Gln Ala Val Arg Ala Glu Pro Thr Asn Pro Ser Lys Met Arg
145 150 155 160

ES 2 578 502 T3

Lys Leu Phe Ser Phe Thr Pro Ala Trp Asn Trp Thr Cys Lys Asp Leu
165 170 175

Leu Leu Gln Ala Leu Arg Glu Ser Gln Ser Tyr Leu Val Glu Asp Leu
180 185 190

Glu Arg Ser
195

- <210> 2
- <211> 179
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens

- <400> 2

ES 2 578 502 T3

Met Trp Ala Thr Gln Gly Leu Ala Val Ala Leu Ala Leu Ser Val Leu
 1 5 10 15

Pro Gly Ser Arg Ala Leu Arg Pro Gly Asp Cys Glu Val Cys Ile Ser
 20 25 30

Tyr Leu Gly Arg Phe Tyr Gln Asp Leu Lys Asp Arg Asp Val Thr Phe
 35 40 45

Ser Pro Ala Thr Ile Glu Asn Glu Leu Ile Lys Phe Cys Arg Glu Ala
 50 55 60

Arg Gly Lys Glu Asn Arg Leu Cys Tyr Tyr Ile Gly Ala Thr Asp Asp
 65 70 75 80

Ala Ala Thr Lys Ile Ile Asn Glu Val Ser Lys Pro Leu Ala His His
 85 90 95

Ile Pro Val Glu Lys Ile Cys Glu Lys Leu Lys Lys Lys Asp Ser Gln
 100 105 110

Ile Cys Glu Leu Lys Tyr Asp Lys Gln Ile Asp Leu Ser Thr Val Asp
 115 120 125

Leu Lys Lys Leu Arg Val Lys Glu Leu Lys Lys Ile Leu Asp Asp Trp
 130 135 140

Gly Glu Thr Cys Lys Gly Cys Ala Glu Lys Ser Asp Tyr Ile Arg Lys
 145 150 155 160

Ile Asn Glu Leu Met Pro Lys Tyr Ala Pro Lys Ala Ala Ser Ala Arg
 165 170 175

Thr Asp Leu

<210> 3
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

5

10

ES 2 578 502 T3

Met Glu Ser Gly Phe Thr Ser Lys Asp Thr Tyr Leu Ser His Phe Asn
 1 5 10 15

Pro Arg Asp Tyr Leu Glu Lys Tyr Tyr Lys Phe Gly Ser Arg His Ser
 20 25 30

Ala Glu Ser Gln Ile Leu Lys His Leu Leu Lys Asn Leu Phe Lys Ile
 35 40 45

Phe Cys Leu Asp Gly Val Lys Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ile Gly Ser
 50 55 60

Gly Pro Thr Ile Tyr Gln Leu Leu Ser Ala Cys Glu Ser Phe Lys Glu
 65 70 75 80

Ile Val Val Thr Asp Tyr Ser Asp Gln Asn Leu Gln Glu Leu Glu Lys
 85 90 95

Trp Leu Lys Lys Glu Pro Glu Ala Phe Asp Trp Ser Pro Val Val Thr
 100 105 110

Tyr Val Cys Asp Leu Glu Gly Asn Arg Val Lys Gly Pro Glu Lys Glu
 115 120 125

Glu Lys Leu Arg Gln Ala Val Lys Gln Val Leu Lys Cys Asp Val Thr
 130 135 140

Gln Ser Gln Pro Leu Gly Ala Val Pro Leu Pro Pro Ala Asp Cys Val
 145 150 155 160

Leu Ser Thr Leu Cys Leu Asp Ala Ala Cys Pro Asp Leu Pro Thr Tyr
 165 170 175

Cys Arg Ala Leu Arg Asn Leu Gly Ser Leu Leu Lys Pro Gly Gly Phe
 180 185 190

Leu Val Ile Met Asp Ala Leu Lys Ser Ser Tyr Tyr Met Ile Gly Glu
 195 200 205

ES 2 578 502 T3

Gln Lys Phe Ser Ser Leu Pro Leu Gly Arg Glu Ala Val Glu Ala Ala
210 215 220

Val Lys Glu Ala Gly Tyr Thr Ile Glu Trp Phe Glu Val Ile Ser Gln
225 230 235 240

Ser Tyr Ser Ser Thr Met Ala Asn Asn Glu Gly Leu Phe Ser Leu Val
245 250 255

Ala Arg Lys Leu Ser Arg Pro Leu
260

- <210> 4
- <211> 380
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 4

ES 2 578 502 T3

Met Gly Ile Gln Gly Leu Ala Lys Leu Ile Ala Asp Val Ala Pro Ser
 1 5 10 15

Ala Ile Arg Glu Asn Asp Ile Lys Ser Tyr Phe Gly Arg Lys Val Ala
 20 25 30

Ile Asp Ala Ser Met Ser Ile Tyr Gln Phe Leu Ile Ala Val Arg Gln
 35 40 45

Gly Gly Asp Val Leu Gln Asn Glu Glu Gly Glu Thr Thr Ser His Leu
 50 55 60

Met Gly Met Phe Tyr Arg Thr Ile Arg Met Met Glu Asn Gly Ile Lys
 65 70 75 80

Pro Val Tyr Val Phe Asp Gly Lys Pro Pro Gln Leu Lys Ser Gly Glu
 85 90 95

Leu Ala Lys Arg Ser Glu Arg Arg Ala Glu Ala Glu Lys Gln Leu Gln
 100 105 110

Gln Ala Gln Ala Ala Gly Ala Glu Gln Glu Val Glu Lys Phe Thr Lys
 115 120 125

Arg Leu Val Lys Val Thr Lys Gln His Asn Asp Glu Cys Lys His Leu
 130 135 140

Leu Ser Leu Met Gly Ile Pro Tyr Leu Asp Ala Pro Ser Glu Ala Glu
 145 150 155 160

ES 2 578 502 T3

Ala Ser Cys Ala Ala Leu Val Lys Ala Gly Lys Val Tyr Ala Ala Ala
 165 170 175

Thr Glu Asp Met Asp Cys Leu Thr Phe Gly Ser Pro Val Leu Met Arg
 180 185 190

His Leu Thr Ala Ser Glu Ala Lys Lys Leu Pro Ile Gln Glu Phe His
 195 200 205

Leu Ser Arg Ile Leu Gln Glu Leu Gly Leu Asn Gln Glu Gln Phe Val
 210 215 220

Asp Leu Cys Ile Leu Leu Gly Ser Asp Tyr Cys Glu Ser Ile Arg Gly
 225 230 235 240

Ile Gly Pro Lys Arg Ala Val Asp Leu Ile Gln Lys His Lys Ser Ile
 245 250 255

Glu Glu Ile Val Arg Arg Leu Asp Pro Asn Lys Tyr Pro Val Pro Glu
 260 265 270

Asn Trp Leu His Lys Glu Ala His Gln Leu Phe Leu Glu Pro Glu Val
 275 280 285

Leu Asp Pro Glu Ser Val Glu Leu Lys Trp Ser Glu Pro Asn Glu Glu
 290 295 300

Glu Leu Ile Lys Phe Met Cys Gly Glu Lys Gln Phe Ser Glu Glu Arg
 305 310 315 320

Ile Arg Ser Gly Val Lys Arg Leu Ser Lys Ser Arg Gln Gly Ser Thr
 325 330 335

Gln Gly Arg Leu Asp Asp Phe Phe Lys Val Thr Gly Ser Leu Ser Ser
 340 345 350

Ala Lys Arg Lys Glu Pro Glu Pro Lys Gly Ser Thr Lys Lys Lys Ala
 355 360 365

Lys Thr Gly Ala Ala Gly Lys Phe Lys Arg Gly Lys
 370 375 380

<211> 318
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 5

ES 2 578 502 T3

Met Pro Lys Arg Gly Lys Lys Gly Ala Val Ala Glu Asp Gly Asp Glu
 1 5 10 15

Leu Arg Thr Glu Pro Glu Ala Lys Lys Ser Lys Thr Ala Ala Lys Lys
 20 25 30

Asn Asp Lys Glu Ala Ala Gly Glu Gly Pro Ala Leu Tyr Glu Asp Pro
 35 40 45

Pro Asp Gln Lys Thr Ser Pro Ser Gly Lys Pro Ala Thr Leu Lys Ile
 50 55 60

Cys Ser Trp Asn Val Asp Gly Leu Arg Ala Trp Ile Lys Lys Lys Gly
 65 70 75 80

Leu Asp Trp Val Lys Glu Glu Ala Pro Asp Ile Leu Cys Leu Gln Glu
 85 90 95

Thr Lys Cys Ser Glu Asn Lys Leu Pro Ala Glu Leu Gln Glu Leu Pro
 100 105 110

Gly Leu Ser His Gln Tyr Trp Ser Ala Pro Ser Asp Lys Glu Gly Tyr
 115 120 125

Ser Gly Val Gly Leu Leu Ser Arg Gln Cys Pro Leu Lys Val Ser Tyr
 130 135 140

Gly Ile Gly Asp Glu Glu His Asp Gln Glu Gly Arg Val Ile Val Ala
 145 150 155 160

Glu Phe Asp Ser Phe Val Leu Val Thr Ala Tyr Val Pro Asn Ala Gly
 165 170 175

Arg Gly Leu Val Arg Leu Glu Tyr Arg Gln Arg Trp Asp Glu Ala Phe
 180 185 190

Arg Lys Phe Leu Lys Gly Leu Ala Ser Arg Lys Pro Leu Val Leu Cys
 195 200 205

Gly Asp Leu Asn Val Ala His Glu Glu Ile Asp Leu Arg Asn Pro Lys
 210 215 220

Gly Asn Lys Lys Asn Ala Gly Phe Thr Pro Gln Glu Arg Gln Gly Phe
 225 230 235 240

Gly Glu Leu Leu Gln Ala Val Pro Leu Ala Asp Ser Phe Arg His Leu
 245 250 255

ES 2 578 502 T3

Tyr Pro Asn Thr Pro Tyr Ala Tyr Thr Phe Trp Thr Tyr Met Met Asn
 260 265 270

Ala Arg Ser Lys Asn Val Gly Trp Arg Leu Asp Tyr Phe Leu Leu Ser
 275 280 285

His Ser Leu Leu Pro Ala Leu Cys Asp Ser Lys Ile Arg Ser Lys Ala
 290 295 300

Leu Gly Ser Asp His Cys Pro Ile Thr Leu Tyr Leu Ala Leu
 305 310 315

<210> 6

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 6

Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
 1 5 10 15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His
 20 25 30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
 35 40 45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly
 50 55 60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn
 65 70 75 80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
 85 90 95

Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
 100 105 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
 115 120 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn
 130 135 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
 145 150 155 160

10

ES 2 578 502 T3

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
165 170 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
180 185 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
195 200 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
210 215 220

Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225 230 235 240

Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
245 250 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
260 265 270

Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
275 280 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
290 295 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305 310 315 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
325 330 335

Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
340 345 350

Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
355 360 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
370 375 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
385 390 395 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
405 410 415

ES 2 578 502 T3

Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
 420 425 430
 Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
 435 440 445
 Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
 450 455 460
 Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
 465 470 475 480
 Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
 485 490 495
 Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
 500 505 510
 Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
 515 520 525
 Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
 530 535 540
 Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
 545 550 555 560
 Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
 565 570 575
 Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
 580 585 590
 Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
 595 600 605
 Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
 610 615 620
 Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
 625 630 635 640
 Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
 645 650 655
 Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp

ES 2 578 502 T3

660

665

670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
 675 680 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
 690 695 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
 705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
 725 730 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
 740 745 750

Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
 755 760

<210> 7

<211> 766

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 578 502 T3

Met Lys Thr Pro Trp Lys Val Leu Leu Gly Leu Leu Gly Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Leu Val Thr Ile Ile Thr Val Pro Val Val Leu Leu Asn Lys Gly Thr
 20 25 30

Asp Asp Ala Thr Ala Asp Ser Arg Lys Thr Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr
 35 40 45

Leu Lys Asn Thr Tyr Arg Leu Lys Leu Tyr Ser Leu Arg Trp Ile Ser
 50 55 60

Asp His Glu Tyr Leu Tyr Lys Gln Glu Asn Asn Ile Leu Val Phe Asn
 65 70 75 80

Ala Glu Tyr Gly Asn Ser Ser Val Phe Leu Glu Asn Ser Thr Phe Asp
 85 90 95

Glu Phe Gly His Ser Ile Asn Asp Tyr Ser Ile Ser Pro Asp Gly Gln
 100 105 110

Phe Ile Leu Leu Glu Tyr Asn Tyr Val Lys Gln Trp Arg His Ser Tyr

ES 2 578 502 T3

Asn Ser Phe Tyr Lys Ile Ile Ser Asn Glu Glu Gly Tyr Arg His Ile
 370 375 380
 Cys Tyr Phe Gln Ile Asp Lys Lys Asp Cys Thr Phe Ile Thr Lys Gly
 385 390 395 400
 Thr Trp Glu Val Ile Gly Ile Glu Ala Leu Thr Ser Asp Tyr Leu Tyr
 405 410 415
 Tyr Ile Ser Asn Glu Tyr Lys Gly Met Pro Gly Gly Arg Asn Leu Tyr
 420 425 430
 Lys Ile Gln Leu Ser Asp Tyr Thr Lys Val Thr Cys Leu Ser Cys Glu
 435 440 445
 Leu Asn Pro Glu Arg Cys Gln Tyr Tyr Ser Val Ser Phe Ser Lys Glu
 450 455 460
 Ala Lys Tyr Tyr Gln Leu Arg Cys Ser Gly Pro Gly Leu Pro Leu Tyr
 465 470 475 480
 Thr Leu His Ser Ser Val Asn Asp Lys Gly Leu Arg Val Leu Glu Asp
 485 490 495
 Asn Ser Ala Leu Asp Lys Met Leu Gln Asn Val Gln Met Pro Ser Lys
 500 505 510
 Lys Leu Asp Phe Ile Ile Leu Asn Glu Thr Lys Phe Trp Tyr Gln Met
 515 520 525
 Ile Leu Pro Pro His Phe Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Leu
 530 535 540
 Asp Val Tyr Ala Gly Pro Cys Ser Gln Lys Ala Asp Thr Val Phe Arg
 545 550 555 560
 Leu Asn Trp Ala Thr Tyr Leu Ala Ser Thr Glu Asn Ile Ile Val Ala
 565 570 575
 Ser Phe Asp Gly Arg Gly Ser Gly Tyr Gln Gly Asp Lys Ile Met His
 580 585 590
 Ala Ile Asn Arg Arg Leu Gly Thr Phe Glu Val Glu Asp Gln Ile Glu
 595 600 605
 Ala Ala Arg Gln Phe Ser Lys Met Gly Phe Val Asp Asn Lys Arg Ile
 610 615 620

ES 2 578 502 T3

Ala Ile Trp Gly Trp Ser Tyr Gly Gly Tyr Val Thr Ser Met Val Leu
625 630 635 640

Gly Ser Gly Ser Gly Val Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val
645 650 655

Ser Arg Trp Glu Tyr Tyr Asp Ser Val Tyr Thr Glu Arg Tyr Met Gly
660 665 670

Leu Pro Thr Pro Glu Asp Asn Leu Asp His Tyr Arg Asn Ser Thr Val
675 680 685

Met Ser Arg Ala Glu Asn Phe Lys Gln Val Glu Tyr Leu Leu Ile His
690 695 700

Gly Thr Ala Asp Asp Asn Val His Phe Gln Gln Ser Ala Gln Ile Ser
705 710 715 720

Lys Ala Leu Val Asp Val Gly Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Thr
725 730 735

Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr
740 745 750

Thr His Met Ser His Phe Ile Lys Gln Cys Phe Ser Leu Pro
755 760 765

<210> 8

5 <211> 95

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cebador directo LC38for-EcoRI

<400> 8

acgtacgtga attcattaa gaggagaaat taactatgag aggatcgcat caccatcacc 60

15 atcacattga aggccgtcga agcgtgggaa aaagg 95

<210> 9

<211> 43

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador inverso LC38rev-BamHI

25 <400> 9

cgtagctgga tctcattac agtgctaggt atagggtgat agg 43

<210> 10

<211> 14

ES 2 578 502 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Extensión peptídica N-terminal

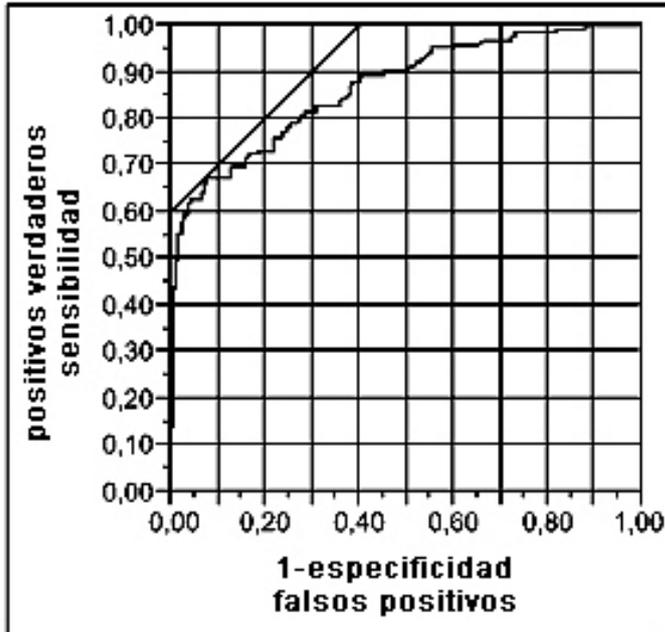
<400> 10
Met Arg Gly Ser His His His His His His Ile Glu Gly Arg
1 5 10

10

REIVINDICACIONES

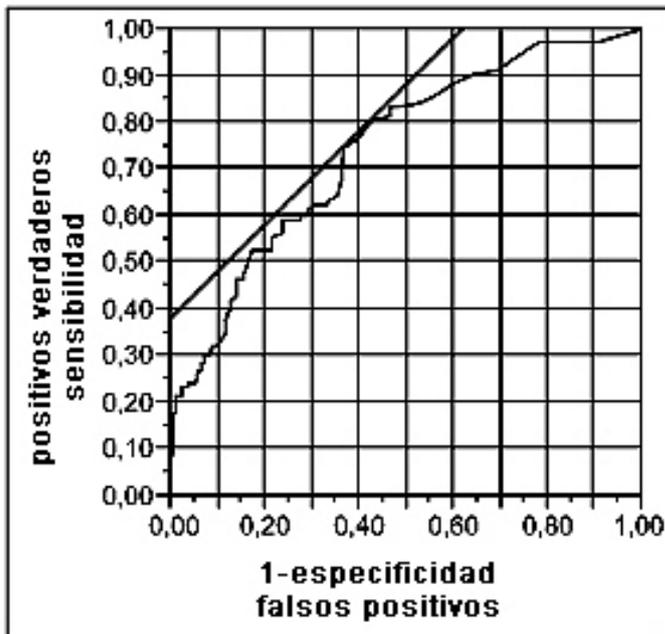
- 5 1. Método in vitro para diferenciar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un sujeto humano, que comprende: a) determinar la concentración de la proteína APEX1 en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de proteína APEX1 determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de proteína APEX1, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia es indicativa de EPOC.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que la proteína APEX1 se mide en un procedimiento de inmunoensayo.
- 10 3. Método según la reivindicación 2, en el que el procedimiento de inmunoensayo es un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).
- 15 4. Método según las reivindicaciones 2 y 3, en el que se mide APEX1 en un formato de ensayo de tipo sándwich.
- 15 5. Método según las reivindicaciones 2 y 3, en el que se mide APEX1 en un formato de ensayo competitivo.
- 20 6. Utilización de la proteína APEX1 en la evaluación in vitro de EPOC en una muestra de suero, plasma o sangre completa humana, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia para la proteína APEX1 es indicativa de EPOC.
- 25 7. Utilización de un panel de marcadores que comprende la proteína APEX1 y la proteína NNMT en la evaluación in vitro de la EPOC en una muestra de suero, plasma o sangre completa, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia de proteína APEX1 es indicativa de EPOC.
- 25 8. Utilización del panel de marcadores según la reivindicación 7 que comprende las proteínas APEX1, NNMT y seprasa.
- 30 9. Utilización del panel de marcadores según la reivindicación 7 que comprende las proteínas APEX1, NNMT, seprasa y ASC.
- 30 10. Utilización de un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para diferenciar la EPOC del asma.
- 35 11. Utilización de la proteína APEX1 en la diferenciación in vitro de EPOC respecto al asma en una muestra de suero, plasma o sangre completa humana, en la que una concentración de proteína APEX1 superior a una concentración de referencia para la proteína APEX1 es indicativa de EPOC.

Fig. 1



APEX1 (COR: 87%)

Fig. 2



PRC (COR: 74%)

Fig. 3

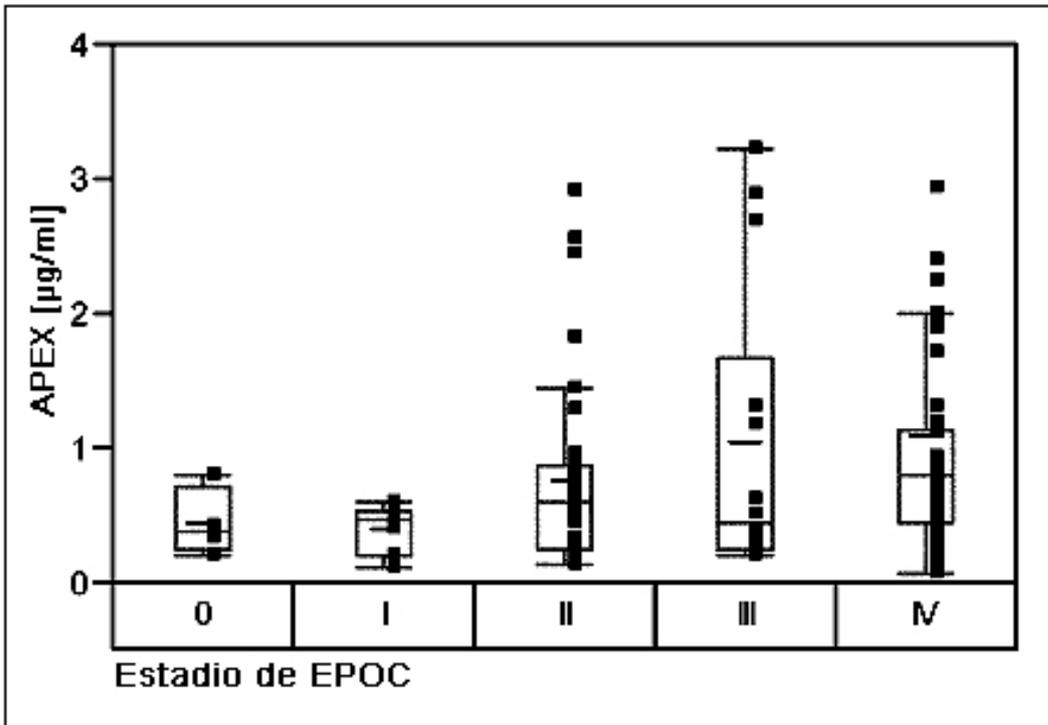


Fig. 4

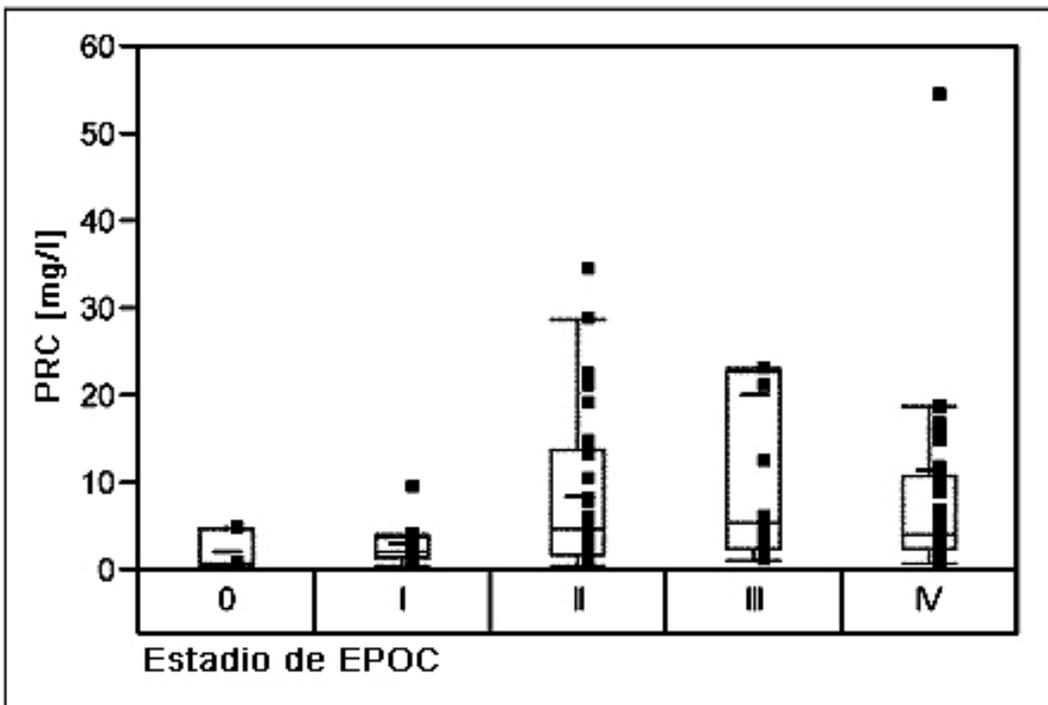
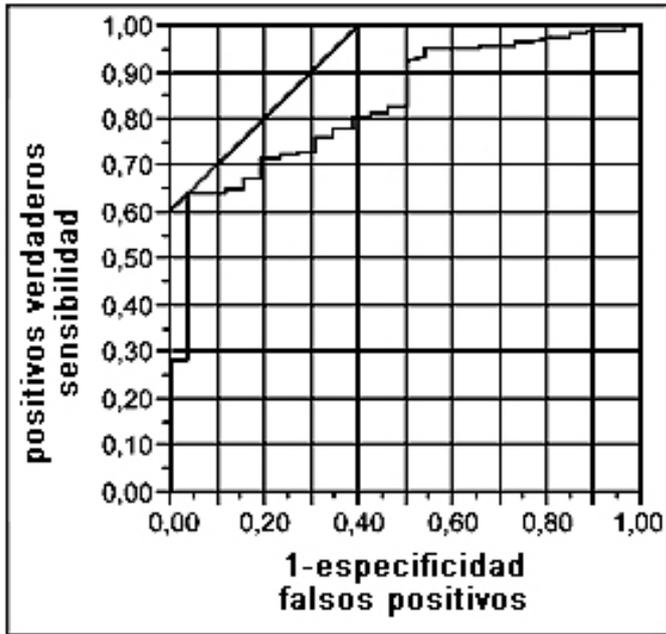
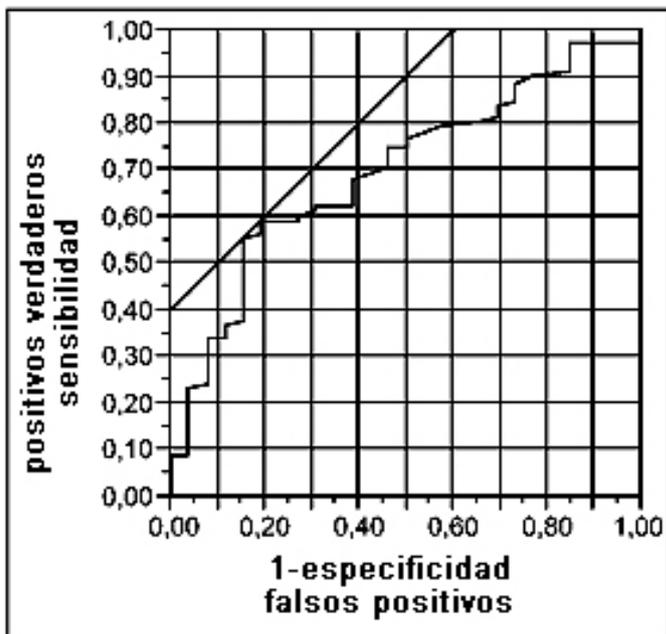


Fig. 5



APEX1 (COR: 83%)

Fig. 6



PRC (COR: 70%)

Fig. 7

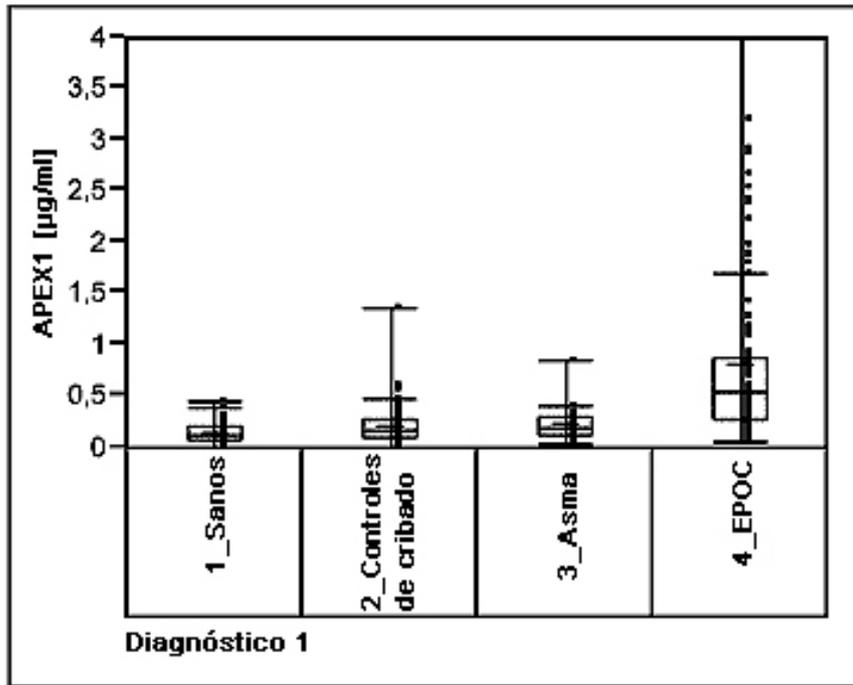


Fig. 8

