

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 583 084**

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 12708006 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2684054**

54 Título: **NNMT como marcador para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)**

30 Prioridad:

**11.03.2011 EP 11157919**

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

**19.09.2016**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KARL, JOHANN;  
RIEDLINGER, JULIA y  
ROLLINGER, WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 583 084 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

NNMT como marcador para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método in vitro para ayudar en la evaluación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (= EPOC). Se describe el uso de la proteína NNMT como marcador para diferenciar EPOC de asma. Además, sobre todo se refiere a un método para diferenciar la EPOC de asma de una muestra, derivada de un individuo mediante la medición in vitro de la proteína NNMT en dicha muestra.

## Antecedentes de la invención

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es una enfermedad caracterizada por inflamación crónica y obstrucción del flujo aéreo irreversible con un descenso en el parámetro de la función pulmonar FEV1 que es más rápido de lo normal. Esto conduce a una limitación del flujo de aire hacia y desde los pulmones causando falta de aliento. La enfermedad tiene dos aspectos principales de patología, es decir, la bronquitis crónica, caracterizada por 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 característicamente bajo flujo de aire en las pruebas de función pulmonar (Nathell, L., et al., *Respiratory Research* 8 (2007) 89). Al contrario que con el asma, esta limitación es poco reversible y por lo general empeora progresivamente con el tiempo.

A nivel mundial, la EPOC está clasificada como la sexta causa principal de muerte en 1990. Se prevé que sea la cuarta causa de muerte en el mundo en 2030 debido a un aumento en las tasas de tabaquismo y los cambios demográficos en muchos países (Mathers, CD, et al., *PLoS Med.* 3 (2006) E442). La EPOC es la cuarta causa de muerte en los EE.UU., y la carga económica de la EPOC en los EE.UU. en 2007 fue el 42,6 \$ millones de dólares en costos de atención médica y pérdida de productividad.

La EPOC está causada por partículas nocivas o gas, más comúnmente por fumar tabaco, lo que desencadena una respuesta inflamatoria anormal en el pulmón (Rabe, K.F., et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176 (2007) 532-555 y Hogg, J.C., et al., *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 2645-2653). La respuesta inflamatoria en las vías respiratorias más grandes se conoce como bronquitis crónica, que se diagnostica clínicamente cuando la gente tose regularmente esputo. En los alvéolos, 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 súbitos empeoramientos ocasionales de los síntomas llamados exacerbaciones agudas, la mayoría de las cuales son causadas por infecciones o la contaminación del aire.

Muchos de los síntomas de la EPOC son compartidos por otras enfermedades respiratorias como el asma, la bronquitis, fibrosis pulmonar y tuberculosis. El estándar de referencia actual para el diagnóstico de la EPOC requiere de pruebas de función pulmonar (espirometría), que es un procedimiento costoso en términos de tiempo y dinero que sólo puede ser realizado por un médico especialista de pulmón. Una prueba de espirometría, por ejemplo, depende altamente de la cooperación y el esfuerzo del paciente, y normalmente se repite al menos tres veces para asegurar la reproducibilidad.

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

El asma se diferencia de la EPOC en su respuesta patogénica y terapéutica, y por lo tanto debe ser considerada como una entidad clínica diferente. Sin embargo, algunos pacientes con asma desarrollan limitación del flujo aéreo poco reversible, que actualmente son indistinguibles de los pacientes con EPOC pero a efectos prácticos se tratan como el asma. La alta prevalencia de asma y EPOC en la población general resulta en la coexistencia de ambas entidades de la enfermedad en muchos individuos. Este se caracteriza por la limitación significativa del flujo aéreo y una gran respuesta a los broncodilatadores. En estos pacientes, el volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) no vuelve a la normalidad y con frecuencia empeora con el tiempo.

Se sabe que los niveles séricos de CRP son significativamente más altos en pacientes con asma en comparación con los controles normales (Fujita, M., et al., *Ann Allergy Asthma Immunol.* 99 (2007) 48-53). La CRP aumenta en respuesta a un número de condiciones infecciosas e inflamatorias y por lo tanto no es específico de la EPOC (Donaldson, G.C., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175 (2007) 209-210). Por lo tanto, la CRP no cumple con los criterios que se refiere a la precisión diagnóstica requerida para una herramienta de cribado de la EPOC.

El método de detección actual de la EPOC, la espirometría, parece que no es apropiado para su uso como herramienta de cribado general. La espirometría es muy costosa, consume tiempo y no es asequible a los sistemas de atención de salud para un uso amplia y general en el cribado de un gran número de sujetos. Además, sus resultados dependen en gran medida del cumplimiento de los pacientes.

Se describe en la técnica que en la EPOC también se observa un aumento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T (específicamente CD8+) en diversas partes de los pulmones, que se relacionan con el grado de limitación del flujo aéreo (Saetta, M., et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157 (1998) 822-826). Puede haber un aumento de eosinófilos en algunos pacientes, particularmente durante las exacerbaciones (Saetta, M., et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 150 (1994) 1646-1652 y Saetta, M., et al., Clin. Exp. Allergy 26 (1996) 766-774). Estas células inflamatorias son capaces de liberar una variedad de citoquinas y mediadores de la inflamación, sobre todo de leucotrieno 4, interleucina-8 y TNF- $\alpha$ . Este patrón inflamatorio es notablemente diferente del observado en pacientes con asma bronquial. Los cambios inflamatorios pueden persistir después de dejar de fumar. Los mecanismos que explican la perpetuación de esta respuesta inflamatoria en ausencia de los eventos incitadores son desconocidos.

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento simple y coste-efectivo de evaluar la EPOC, por ejemplo para identificar a los individuos sospechosos de padecer EPOC. Para este propósito, se debe encontrar un marcador general de la EPOC presente en la circulación, que sea detectable en los fluidos corporales (por ejemplo sangre, suero o plasma).

Con el fin de ser de utilidad clínica, un nuevo marcador diagnóstico como marcador único debería ser comparable a otros marcadores conocidos en la técnica, o mejor. O bien, un nuevo marcador debería conducir a una mejora en la sensibilidad diagnóstica o especificidad o bien si se usa solo o si se utiliza en combinación con uno o más marcadores diferentes, respectivamente. La sensibilidad de diagnóstico o la especificidad de una prueba está mejor valorado por sus características operativas del receptor, que se describirán en detalle a continuación.

La sangre completa, suero o plasma son las fuentes más utilizadas en muestras de rutina clínica. La identificación de un marcador temprano de EPOC que ayudaría en la detección fiable de EPOC o proporcionar información pronóstica precoz podría conducir a un método que ayudaría mucho en el diagnóstico y en el tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, existe una necesidad clínica urgente para mejorar la evaluación in vitro de la EPOC. Es especialmente importante mejorar el diagnóstico precoz de la EPOC, ya que para los pacientes diagnosticados en estadios tempranos de EPOC las posibilidades de reversibilidad de daños pulmonares son mucho más altos en comparación con aquellos pacientes diagnosticados en una etapa más progresada de la enfermedad.

Existe una necesidad en la técnica de identificar un indicador fiable y directo del estado de enfermedad de la EPOC (por ejemplo, un marcador sustituto) tanto con el fin de distinguir de manera fiable los síntomas de la EPOC de los anteriormente mencionados de otras enfermedades respiratorias, para predecir cambios en la gravedad de la enfermedad, progresión de la enfermedad y la respuesta al medicamento.

Fue un objeto de la presente invención investigar si un marcador bioquímico se puede identificar que se puede utilizar en la evaluación de la EPOC in vitro. En particular, los inventores de la presente invención investigaron si un marcador bioquímico podría ser identificado para la evaluación de la EPOC en una muestra de fluido corporal.

#### Resumen de la invención

Ahora se ha encontrado que el uso de la proteína NNMT puede superar, al menos parcialmente, algunos de los problemas de los métodos disponibles para la evaluación de la EPOC conocidos en la actualidad.

Sorprendentemente, se encontró en la presente invención que una determinación in vitro de la concentración de proteína NNMT en una muestra, permite la diferenciación de la EPOC del asma. En este contexto se encontró que una concentración elevada de dicha proteína NNMT en dicha muestra obtenida de un individuo en comparación con una concentración de referencia de proteína NNMT es indicativo de la presencia de la EPOC.

Se describe aquí un método in vitro para la evaluación de la EPOC que comprende determinar en un suero, plasma, o muestra de sangre completa la concentración de proteína NNMT mediante un método de detección inmunológica y utilizando el resultado determinado, en particular la concentración determinada, para la diferenciación de EPOC del asma.

La invención también se refiere a un método in vitro para diferenciar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) del asma en un sujeto, que comprende a) determinar la concentración de proteína NNMT en un suero, plasma, o muestra de sangre completa, y b) la comparación de la concentración de proteína NNMT determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de la proteína NNMT, en el que la concentración de proteína NNMT por encima de una concentración de referencia es indicativo de la EPOC.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de la proteína NNMT en la diferenciación in vitro de la EPOC de asma en un suero, plasma, o muestra de sangre completa, en el que una concentración de proteína NNMT por encima de una concentración de referencia para la proteína NNMT es indicativo de la EPOC.

En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso del método in vitro para la evaluación de la EPOC de acuerdo con la presente invención para diferenciar EPOC de otros tipos de enfermedades pulmonares, preferiblemente asma.

Aspectos y ventajas adicionales de la presente invención serán evidentes a la vista de la descripción detallada que sigue.

#### Descripción detallada de la invención

Los inventores de la presente invención han sido sorprendentemente capaces de demostrar que la proteína marcadora NNMT es útil para diferenciar EPOC de asma. Debido a las incertidumbres de la clasificación de las distintas etapas del daño pulmonar, y especialmente de la EPOC según el estado de los métodos de la técnica, es muy posible que la proteína NNMT pueda llegar a ser uno de los criterios fundamentales en la evaluación de los pacientes con EPOC en el futuro.

El método de la presente invención es adecuado para la diferenciación de la EPOC de asma. Se han encontrado que el aumento de las concentraciones de proteína NNMT en una muestra, en comparación con los controles normales son indicativos de EPOC.

En una realización, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diferenciar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) de asma en un sujeto humano, que comprende a) determinar la concentración de proteína NNMT en un suero, plasma, o muestra de sangre completa y b) comparar la concentración de proteína NNMT determinada en la etapa (a) con una concentración de referencia de la proteína NNMT, en el que una concentración de proteína NNMT por encima de una concentración de referencia es indicativo de EPOC.

ASC, la "proteína similar a mota asociada a la apoptosis que contiene un dominio de reclutamiento asociado a caspasa" también se conoce como "diana de silenciamiento inducido por metilación 1" (TMS1) (Swiss-Prot: Q9ULZ3). La proteína ASC, en el sentido de la presente invención, se caracteriza por la secuencia dada en Id. de Sec. N°: 1, es una proteína de 22 kDa. Los dominios de reclutamiento asociados a caspasas (CARD) median en la interacción entre las proteínas adaptadoras como APAF1 (factor activador de proteasa apoptótica 1) y la pro-forma de caspasas (por ejemplo, CASP 9) que participan en la apoptosis. ASC es un miembro de la familia de proteínas adaptadoras que contienen CARD. En el documento WO 2006/105252 se ha demostrado que el nivel de expresión génica de ASC (= CARD-9) es indicativo para el diagnóstico de la EPOC.

El papel biológico y la función de la proteína ARMET (rico en arginina, mutado en tumores en estadios tempranos, ARP, Swiss-Prot ID: P55145) sigue siendo en gran medida difícil de alcanzar. La proteína ARMET en el sentido de la presente invención, se caracteriza por la secuencia dada en Id. de Sec. N°: 2, es una proteína de 20,3 kDa. La proteína ARMET consta de 179 aminoácidos, y lleva una secuencia señal predicha (aa 1-21). El gen correspondiente se encuentra en la banda cromosómica 3p21.1 y se caracterizó por primera vez por Shridhar, V., et al., (Oncogene 12 (1996) 1931-1939). El gen está altamente conservado y se puede encontrar en muchas especies de mamíferos, como rata, ratón, vaca, y hámster. ARMET fue nombrado como tal, porque los estudios iniciales sugirieron que ARMET tenía 50 aminoácidos más en el extremo N-terminal que lleva una región rica en arginina (Shridhar, V., et al., Oncogene 12 (1996) 1931-1939; Shridhar, R., et al., Cancer Res. 56 (1996) 5576-5578; Shridhar, V., et al., Oncogene 14 (1997) 2213-2216). Sin embargo, estudios más recientes indican evidencias transcritas de un marco de lectura abierto más pequeño que no codifica el tramo de arginina (Tanaka, H., et al., Oncol. Rep. 7 (2000) 591-593; Mizobuchi, N., et al., Cell Struct. Func. 32 (2007) 41-50). Con la correspondiente corrección del tamaño de la proteína, el codón mutado descrito inicialmente (ATG50) se identifica ahora como el codón de iniciación. Petrova, P., et al., (J. Mol. Neurosci. 20 (2003) 173-188) purificó el producto del gen ARMET a partir de medio acondicionado de una línea celular mesencefálica de astrocitos de rata de tipo 1 y la llamó MANF (factor neurotrófico derivado de astrocito mesencefálico). La mayoría de los estudios recientes demostraron que ARMET está sobregulada por la "respuesta de la proteína desplegada" (UPR), un proceso que se activa una vez proteínas mal plegadas se acumulan en el retículo endoplasmático (ER) (Tanaka, H., et al., Oncol. Rep. 7 (2000) 591-593; Apostolou, A., et al., Exp Cell Res 314 (2008) 2454-2467). Sobre la base de este estudio, ARMET se caracteriza como un nuevo mediador secretado de la vía de adaptación de UPR.

La proteína NNMT (nicotinamida N-metiltransferasa; SWISS-PROT: P40261) en el sentido de la presente invención, se caracteriza por la secuencia dada en Id. de Sec. N°: 3, es una proteína de 29,6 kDa y tiene un punto isoeléctrico de 5,56. NNMT cataliza la N-metilación de la nicotinamida y otras piridinas. Esta actividad es importante para la biotransformación de muchos fármacos y compuestos xenobióticos. Se ha descrito que la proteína se expresa predominantemente en el hígado y se encuentra en el citoplasma. NNMT ha sido clonada a partir de DNAC de hígado humano y contiene un marco de lectura abierto de 792 nucleótidos que codifica una proteína de 264 aminoácidos con una masa molecular calculada de 29,6 kDa. (Aksoy, S., et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 14835-14840). Poco se sabe en la literatura sobre un papel potencial de la enzima en la EPOC humana. En Kim, H. C., et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 181, pp. 797-805 se ha observado una expresión de RNAm más alto de NNMT en células del músculo esquelético de pacientes con EPOC. En un estudio se ha demostrado que NNMT es un biomarcador útil para el cáncer de pulmón (CP) (Tomida, M., et al., J. Cancer Res. Y Clin. Onc., 135 (2009) 1223-1229). En dicho estudio, se ha encontrado que los niveles séricos de NNMT fueron significativamente mayores en los pacientes de CP que en los pacientes con EPOC y donantes sanos. En Kharitonov et al., Proc. of the American Thoracic Soc., 2004, vol. 1, No. 3, 191-199 se describen los efectos de los corticosteroides sobre biomarcadores no invasivos de la inflamación en asma y la enfermedad de EPOC.

la proteína endonucleasa Flap-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, que se caracteriza por la secuencia dada en Id. de Sec. N°: 4. La secuencia de codificación de FEN1 humana la predijo Murray en 1994 (Murray, J.M., et al., *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994) 4878-4888) a partir de una secuencia recientemente clonada. Basado en la función del homólogo de levadura rad2 se ha sugerido una función con gran fidelidad de la segregación cromosómica y en la reparación del daño del DNA inducido por UV. Debido a que estos son procesos fundamentales en la integridad cromosómica, los autores también proponen una implicación de la proteína en la evitación del cáncer. El locus del gen en el cromosoma humano 11 lo identificó posteriormente Hiraoka, et al., (Hiraoka, L.R., et al., *Genomics* 25 (1995) 220-225) y Taylor, et al., (Taylor, T.D., et al., *Nature* 440 (2006) 497-500). Las funciones de FEN1 y sus interacciones con el DNA han sido el foco de numerosos estudios (Robins, P., et al., *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 28535-28538), Shen, B., et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 9173-9176, Hasan, S., et al., *Mol. Cell* 7 (2001) 1221-1231, Qiu, J., et al., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 24659-24666 y Sakurai, S., et al., *EMBO J.* 24 (2005) 683-693). Se han demostrado varias funciones enzimáticas en el metabolismo del DNA que incluye la actividad de endonucleasa que escinde la estructura en aleta que sobresale en 5' generada por síntesis de desplazamiento cuando la polimerasa de DNA se encuentra con el extremo 5' de un fragmento de Okazaki corriente abajo. Además FEN1 también posee una actividad exonucleasa 5' a 3' sobre el DNA de doble cadena con bucles "nicked" o con huecos "gapped", y presenta actividad RNasa H. Estos han sido revisados por Shen, et al., (Shen, B., et al., *BioEssays* 27 (2005) 717-729) o Liu, et al., (Liu, Y., et al., *Annu. Rev. Biochem.* 73 (2004) 589-615).

La endonucleasa AP (APEX1, APEX-1) (Swiss-Prot P27695) en el sentido de la presente invención se caracteriza por la secuencia dada en Id. de Sec. N°: 5. La molécula precursora no procesada consta de 318 aminoácidos y tiene un peso molecular de 35,6 kDa. APEX1 participa en la reparación del DNA y escinde el sitioapurínico o apirimidínico de las cadenas de DNA. Tales sitios son abásicos se generan con relativa frecuencia de forma espontánea o por medio de agentes químicos o por glicosilasas de DNA que eliminan bases anormales específicas.

Los sitios de AP son lesiones premutagénicas que pueden prevenir la replicación normal del DNA por lo que la célula contiene sistemas para identificar y reparar dichos sitios. (Barzilay, G., y Hickson, I.D., *Bioessays* 17 (1995) 713-719). La estructura 3D fue aclarada y se identificaron los aminoácidos implicados en la actividad endonucleasa (Barzilay, G., et al., *Nature Structural Biology* 2 (1995) 561-567; Gorman, M.A., et al., *EMBO Journal* 16 (1997) 6548-6558; Beernink, P., et al., *J. Mol. Biol.* 307 (2001) 1023-1034). APEX1 es también un regulador redox de diversos factores de transcripción tales como c-Fos, c-Jun, NF-KB y HIF-1. Esta actividad parece ser independiente de la actividad endonucleasa. Ambas funciones se encuentran en diferentes dominios de la proteína (Barzilay, G., y Hickson, I.D., *Bioessays* 17 (1995) 713-719). La fosforilación de APEX1 por la proteína quinasa C aumenta la actividad redox mientras que la forma no fosforilada está implicada en la reparación del DNA (Yacoub, A., et al., *Cancer Res.* 57 (1997) 5457-5459). Un sitio de fosforilación, Y 261, (de acuerdo con la secuencia de Swissprot) fue identificado por Rush, J., et al., *Nature Biotech* 23 (2005) 94-101).

Seprasa, también conocida como proteína de activación de fibroblastos (= FAP), en el sentido de la presente invención es una glicoproteína de 170 kDa que tiene actividad gelatinasa y dipeptidil peptidasa que consta de dos unidades seprasa monoméricas idénticas (Pineiro-Sanchez, M.L., et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7595-7601; Park, J.E., et al., *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36505-36512). El monómero de la membrana humana unido a proteínas seprasa comprende 760 aminoácidos y se muestra en Id. de Sec. N°: 6. La seprasa humana se predice que tiene sus primeros 4 residuos N-terminales en el citoplasma de los fibroblastos, seguido por un dominio transmembrana de 21 residuos y a continuación, un dominio catalítico C-terminal extracelular de 734 residuos (Goldstein, L.A., et al., *Biochim. Biophys. Acta.* 1361 (1997) 11-19; Scanlan, M.J., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 5657-5661). Una forma más corta de la proteína seprasa humana es conocida por el experto en la técnica como seprasa soluble o enzima de la de escisión del antiplasmina en circulación (= APCE) (Lee, K.N., et al., *Blood* 103 (2004) 3783-3788; Lee, K.N., et al., *Blood* 107 (2006) 1397-1404), que comprende las posiciones de aminoácidos 26 a 760 del número de acceso Q12884 de la base de datos Swissprot. El dímero de seprasa soluble es una glicoproteína de 160 kDa que consta de dos unidades monoméricas solubles de proteínas seprasa idénticas. Piñeiro-Sánchez et al. (Supra) encontró que un incremento en la expresión de seprasa se correlaciona con el fenotipo invasivo de las células de melanoma y de carcinoma humano. Henry, L. R., et al., *Clin. Cancer Res.* 13 (2007) 1736-1741, describe que los pacientes humanos con cáncer de colon que tienen altos niveles de seprasa en estroma son más propensos a tener progresión agresiva de la enfermedad y desarrollo potencial de metástasis o recurrencia.

La dipeptidil peptidasa IV humana (DPPIV =), que también se conoce como CD26, es en el sentido de la presente invención una molécula de superficie celular de 110 kDa. La secuencia de aminoácidos de la proteína DPPIV humana comprende 766 aminoácidos y se muestra en Id. de Sec. N°: 7 (base de datos SwissProt N° de Acceso P27487). Contiene actividad dipeptidil peptidasa IV intrínseca que elimina selectivamente el dipéptido N-terminal de los péptidos con prolina o alanina en la tercera posición de aminoácidos. También está relacionada con varias moléculas extracelulares y también está involucrada en cascadas de transducción de señales intracelulares. Las actividades multifuncionales de DPPIV humana dependen del tipo de célula y las condiciones intracelulares o extracelulares que influyen en su papel como una enzima proteolítica, receptor de superficie celular, proteína de interacción coestimuladora y mediador de transducción de señales. DPPIV humana tiene un corto dominio citoplasmático desde la posición de aminoácido 1 a 6, una región transmembrana desde la posición de aminoácidos 7 a 28, y un dominio extracelular desde la posición de aminoácido 29 a 766 con la actividad intrínseca de la dipeptidil

peptidasa IV (DPPIV). La secuencia de aminoácidos de la dipeptidil peptidasa IV humana soluble (=DPPIV soluble) comprende la posiciones de aminoácidos 29 a 766 de número de acceso de base de datos Swissprot P27487. El dímero de DPPIV soluble es una glicoproteína de 170 kDa que consiste en dos unidades de DPPIV solubles monoméricas idénticas.

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

Como es obvio para el experto en la materia, la presente invención no debe considerarse limitada a la proteína de longitud completa NNMT de Id. de Sec. N°: 3. Los fragmentos fisiológicos o artificiales de la proteína NNMT, modificaciones secundarias de la proteína NNMT, así como variantes alélicas de la proteína NNMT también están abarcados por la presente invención. Las variantes de un polipéptido están codificadas por el mismo gen, pero pueden diferir en su punto isoeléctrico (= PI) o el peso molecular (= PM), o ambos, por ejemplo, como resultado de RNAm alternativo o procesamiento de pre-RNAm. La secuencia de aminoácidos de una variante es idéntica en un 95% o más a la secuencia del marcador correspondiente. Los fragmentos artificiales abarcan preferiblemente un péptido producido sintéticamente o mediante técnicas recombinantes, que al menos comprende un epítipo de interés diagnóstico que consiste en al menos 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos contiguos derivados de la secuencia descrita en Id. de Sec. N°: 3. Tal fragmento puede ventajosamente ser utilizado para la generación de anticuerpos o como un estándar en un inmunoanálisis.

Al parecer, en la técnica anterior la presencia o el nivel de la proteína NNMT en un fluido corporal no se sabía de utilidad en el diagnóstico para la evaluación de la EPOC. Los inventores de la presente invención han encontrado ahora y podrían establecer que un aumento de la concentración de la proteína NNMT determinada a partir de una muestra de fluido corporal derivada de un individuo es indicativo para la EPOC.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, 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., (eds.), *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (1994).

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton, et al., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2ª ed, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y. (1994); March, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure*, 4ª ed, John Wiley & Sons, Nueva York, N. Y. (1992); Lewin, B., *Genes V*, publicado por Oxford University Press (1994), ISBN 0-19-854287 9; Kendrew, J., et al., (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd. (1994), ISBN 0-632-02182-9; y Meyers, R.A., *Molecular Biology and Biotechnology* (ed.): a *Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc. (1995), ISBN 1-56081-569 8) proporcionan a un experto en la materia una guía general para muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

Tal como se usa en este documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se usa aquí para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un marcador" significa un marcador o más de un marcador. El término "al menos" se utiliza para indicar que, opcionalmente, uno o más de un objeto puede estar presente.

La expresión "uno o más" denota 1 a 50, preferiblemente de 1 a 20 también preferido 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, o 15.

El término "marcador" o "marcador bioquímico" tal como se utiliza aquí, se refiere a una molécula que se utilizará como una diana para el análisis de la muestra de ensayo de un individuo. En uno de tales ejemplos de realización dichas dianas moleculares son proteínas o polipéptidos. Las proteínas o polipéptidos utilizados como marcador en la presente invención se contemplan para incluir variantes naturales de dicha proteína así como fragmentos de dicha proteína o dicha variante, en particular, fragmentos inmunológicamente detectables. Los fragmentos inmunológicamente detectables preferentemente comprenden por lo menos 6, 7, 8, 10, 12, 15 o 20 aminoácidos contiguos de dicho polipéptido marcador. Un experto en la técnica reconocerá que las proteínas que son liberadas por las células o presentes en la matriz extracelular pueden resultar dañadas, por ejemplo, durante la inflamación, y podrían ser degradadas o escindidas en tales fragmentos. Ciertos marcadores se sintetizan en una forma inactiva, que puede ser posteriormente activada por proteólisis. Como el experto en la técnica apreciará, las proteínas o fragmentos de los mismos también pueden estar presentes como parte de un complejo. Tal complejo también puede

utilizarse como un marcador en el sentido de la presente invención. El término "marcaje" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier sustancia que es capaz de producir una señal a través de la detección directa o indirecta.

5 Para la detección directa, el grupo marcador o marcaje adecuado para su uso en la presente invención se puede seleccionar de cualquier grupo marcador detectable conocido, pero no se limita a, cromógenos, grupos fluorescentes, grupos quimioluminiscentes (por ejemplo ésteres de acridinio o dioxetanos), compuestos electroquimioluminiscentes, catalizadores, enzimas, sustratos enzimáticos, colorantes, tintes fluorescentes (por ejemplo fluoresceína, cumarina, rodamina, oxazina, resorufina, cianina y derivados de los mismos), partículas metálicas y no metálicas coloidales, y partículas de látex de polímero orgánico. Otros ejemplos de grupos marcadores son los complejos metálicos luminiscentes, tales como rutenio o europio, complejos de enzimas, por ejemplo los utilizados para ELISA, y radioisótopos.

15 Los sistemas de detección indirectos comprenden, por ejemplo, que el reactivo de detección, por ejemplo, el anticuerpo de detección, esté marcado con un primera parte de una pareja de unión bioafín. Los ejemplos de pares de unión adecuados son 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 esteroide/hormona esteroide. Los miembros preferidos de primera parte de unión comprenden hapteno, antígeno y hormona. Especialmente preferidos son los haptenos como la digoxina y la biotina y análogos de los mismos. El segundo miembro de dicho par de unión es, por ejemplo, un anticuerpo, estreptavidina, etc., por lo general marcado para permitir la detección directa, por ejemplo, mediante los marcadores mencionados anteriormente.

25 Además, o como alternativa, un polipéptido marcador o una variante del mismo puede llevar una modificación posterior a la traducción. Las modificaciones postraduccionales preferidas son glicosilación, acilación, o fosforilación.

30 El término "evaluación de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica" o "la evaluación de la EPOC" se utiliza para indicar que el método según la presente invención solo o junto con otros marcadores o variables, por ejemplo, ayuda al médico para establecer o confirmar la ausencia o la presencia de la EPOC. El método, por ejemplo, será útil para establecer o confirmar la ausencia o presencia de la EPOC.

35 Un "marcador para la EPOC" en el sentido de la presente invención es un marcador que, como único marcador o si se combina con el marcador NNMT, añade la información pertinente en la evaluación de la EPOC a la pregunta de diagnóstico bajo investigación. La información se considera relevante o de valor adicional si en una especificidad determinada, la sensibilidad, o si en una sensibilidad determinada, la especificidad, respectivamente, para la evaluación de la EPOC se puede mejorar mediante la inclusión de dicho marcador en un panel de marcadores (combinación de marcadores) que ya comprenda el marcador NNMT. Preferiblemente, la mejora en la sensibilidad o especificidad, respectivamente, es estadísticamente significativa a un nivel de significación de  $p = 0,05, 0,02, 0,01$  o inferior.

40 El término "muestra" o "muestra de ensayo", como se usa aquí, se refiere a una muestra biológica obtenida de un individuo con el propósito de la evaluación in vitro. En los métodos de la presente invención, la muestra o la muestra del paciente puede comprender en una realización de la presente invención cualquier líquido corporal. Las muestras preferidas son líquidos corporales, tales como suero, plasma o sangre completa, suero o plasma son los más preferidos.

45 La proteína NNMT, en particular las formas solubles de la proteína NNMT, se determina in vitro en una muestra adecuada. Preferiblemente, la muestra deriva de un sujeto humano, por ejemplo, un paciente con EPOC o una persona en riesgo de EPOC o una persona sospechosa de tener EPOC. También se determina la proteína NNMT de forma preferida en una muestra de suero o plasma.

50 El término "muestra de referencia" como se usa aquí, se refiere a una muestra biológica proporcionada por un grupo de referencia de individuos aparentemente sanos con el propósito de la evaluación in vitro. El término "concentración de referencia" como se usa aquí se refiere a un valor establecido en un grupo de referencia de individuos aparentemente sanos.

55 Es conocido para un experto en la técnica que los resultados de la medición del paso (a) de acuerdo con el método de la presente invención será comparado con una concentración de referencia. Tal concentración de referencia puede ser determinada usando una muestra negativa de referencia, una muestra de referencia positiva, o una muestra de referencia mixta que comprende uno o más de uno de estos tipos de controles. Una muestra de referencia negativa preferiblemente comprenderá una muestra de no fumador, fumadores control sin diagnóstico de EPOC, asma o diversas combinaciones de los mismos. Una muestra de referencia positiva preferiblemente comprenderá una muestra de un sujeto con EPOC diagnosticada.

60 La expresión "comparar la concentración determinada con una concentración de referencia" se utiliza simplemente para ilustrar adicionalmente lo que es evidente para el experto en la materia de todos modos. Una concentración de

referencia se establece en una muestra de control. La muestra de control puede ser una muestra de control interno o una muestra de control externo. En una realización se usa una muestra de control interno, es decir, el nivel del marcador se evaluado en la muestra de prueba, así como en una o más muestras tomadas del mismo sujeto para determinar si hay algún cambio en el nivel de dicho marcador. En otra realización se usa una muestra de control externo. Para una muestra de control externo la presencia o cantidad de un marcador en una muestra derivada del individuo se compara con su presencia o cantidad en un individuo que se sabe que sufre de, o que se sabe que está en riesgo de una condición determinada; o un individuo que se sabe que está libre de una condición determinada, es decir, un "individuo normal". Por ejemplo, un nivel de marcador en una muestra de paciente se puede comparar con un nivel conocido que se asocia con un curso específico de la EPOC. Por lo general, el nivel de marcador de la muestra está directamente o indirectamente correlacionado con un diagnóstico y el nivel del marcador se utiliza, por ejemplo para determinar si un individuo está en riesgo de EPOC. Por otra parte, el nivel de marcador de la muestra puede ser comparado, por ejemplo, con un nivel de marcador que se sabe que está asociado con una respuesta a la terapia en pacientes con EPOC, el diagnóstico de la EPOC, la guía para la selección de un medicamento apropiado para la EPOC, la valoración del riesgo de progresión de la enfermedad, o en el seguimiento de pacientes con EPOC. Dependiendo del uso previsto del diagnóstico se elige una muestra de control apropiado y un valor de control o de referencia para el marcador establecido en el mismo. Se apreciará por el experto en la materia que dicha muestra de control en una realización se obtiene de una población de referencia que está emparejado por la edad y libre de confundir enfermedades. También queda claro para el experto en la materia, que los valores de los marcadores absolutos en una muestra control dependerán del ensayo utilizado. Se utilizan preferiblemente muestras de 100 individuos bien caracterizados de la población de referencia apropiada para establecer un valor (de referencia) de control. También se prefiere que la población de referencia se elija entre 20, 30, 50, 200, 500 o 1000 individuos. Los individuos sanos representan una población de referencia preferida para establecer un valor de control.

El término "medición", "medir" o "determinación" comprende preferentemente una medición cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa. En la presente invención la proteína NNMT se mide en una muestra de fluido corporal. En una realización preferida, la medición es una medida semicuantitativa, es decir, se determina si la concentración de proteína NNMT está por encima o por debajo de un valor de corte. Como el experto en la materia apreciará, en un ensayo de Si- (presencia) o No- (ausencia), la sensibilidad del ensayo se ajusta usualmente para que coincida con el valor de corte.

Los valores de proteína NNMT como se determina en un grupo de control o de una población de control se utilizan por ejemplo para establecer un valor de corte o un rango de referencia. Un valor por encima de dicho valor de corte o fuera del rango de referencia en su extremo superior está considerado como elevado o como indicativo de la presencia de EPOC.

En una realización, se estableció un valor fijo de corte. Dicho valor de corte se elige para que coincida con la cuestión de diagnóstico de interés.

En una realización, el corte se establece para dar lugar a una especificidad del 90%, también se prefiere establecer la línea de corte para dar lugar a una especificidad del 95%, o también se prefiere establecer la línea de corte para dar lugar a una especificidad del 98%.

En una realización, el corte se establece para dar lugar a una especificidad del 90%, también se prefiere establecer la línea de corte para dar lugar a una especificidad del 95%, o también se prefiere establecer la línea de corte para dar lugar a una especificidad del 98%.

En una realización, se utilizan los valores de proteína NNMT como se determina en un grupo de control o de una población de control para establecer un rango de referencia. En una realización preferida una concentración de proteína NNMT se considera elevada si el valor determinado está por encima del percentil 90% del rango de referencia. En realizaciones preferidas adicionales una concentración de proteína NNMT se considera elevada si el valor determinado está por encima del percentil 95%, del percentil 96%, del percentil 97% o el percentil 97,5% del rango de referencia.

Un valor por encima del valor de corte puede ser indicativo, por ejemplo de la presencia de EPOC. Un valor por debajo del valor de corte puede ser indicativo por ejemplo de la ausencia de la EPOC.

En una realización preferida adicional, la medición de la proteína NNMT es una medida cuantitativa. En otras formas de realización la concentración de proteína NNMT se correlaciona a una pregunta de diagnóstico subyacente.

Una muestra proporcionada de un paciente con EPOC ya confirmada puede utilizarse en ciertas configuraciones como una muestra de control positivo y analizarse preferiblemente en paralelo con la muestra a analizar. En tales configuraciones un resultado positivo para la proteína marcadora NNMT en la muestra de control positivo indica que el procedimiento de prueba ha funcionado en el plano técnico.

Como el experto en la materia apreciará, cualquiera de tales análisis se realiza in vitro. La muestra (muestra de ensayo) se desecha después. La muestra se utiliza únicamente para el método diagnóstico in vitro de la invención y



el material de la muestra no se transfiere de nuevo al cuerpo del paciente. Típicamente, la muestra es una muestra de fluido corporal, por ejemplo, suero, plasma, o sangre completa.

5 El método de acuerdo con la presente invención se basa en una muestra de fluido o líquido corporal que se obtiene de un individuo y en la determinación in vitro de la proteína NNMT en dicha muestra. Un "individuo" como se usa aquí, se refiere a un solo organismo humano o no humano. Por lo tanto, los métodos y composiciones descritos en este documento son aplicables tanto a la enfermedad humana como a la veterinaria. Preferiblemente, el individuo, sujeto, o paciente es un ser humano.

10 Preferiblemente, la proteína marcadora NNMT se determina específicamente in vitro a partir de una muestra líquida mediante el uso de un agente de unión específico.

15 En una realización preferida de acuerdo con la presente invención, se determina la concentración de proteína NNMT. En una realización, la concentración de proteína marcadora NNMT se determina específicamente in vitro a partir de una muestra mediante el uso de un agente de unión específico.

20 Un agente de unión específico es, por ejemplo, un receptor para la proteína NNMT, una lectina de unión a la proteína NNMT, un anticuerpo contra la proteína NNMT, peptidocuerpos contra la proteína NNMT, enlazantes doble biespecíficos o formatos de anticuerpos biespecíficos. Un agente de unión específico tiene al menos una afinidad de  $10^7$  l/mol para su molécula diana correspondiente. El agente de unión específico tiene preferiblemente una afinidad de  $10^8$  l/mol o también preferiblemente de  $10^9$  l/mol para su molécula diana.

25 Como el experto en la materia apreciará, el término específico se utiliza para indicar que otras biomoléculas presentes en la muestra no se unen significativamente al agente de unión específico para la secuencia de proteína NNMT de Id. de Sec. N°: 3. Preferiblemente, el nivel de unión a una biomolécula distinta de la molécula diana resulta en una afinidad de unión que es a lo sumo un 10% o menos, sólo el 5% o menos, sólo el 2% o menos, o sólo el 1% o menos de la afinidad a la molécula diana, respectivamente. Un agente de unión específico preferido cumplirá tanto el criterio mínimo anterior para la afinidad, así como para la especificidad.

30 Los ejemplos de agentes de unión específicos son péptidos, miméticos de péptidos, aptámeros, espiegélmeros, darpins, proteínas de repetición de anquirina, dominios de tipo Kunitz, anticuerpos, anticuerpos de dominio único, (véase: Hey, T., et al., Trends Biotechnol 23 (2005) 514-522) y fragmentos de anticuerpos monovalentes.

35 En ciertas realizaciones preferidas, el agente de unión específico es un polipéptido.

En ciertas realizaciones preferidas, el agente de unión específico es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo monovalente, preferiblemente un fragmento monovalente derivado de un anticuerpo monoclonal.

40 Los fragmentos de anticuerpo monovalentes incluyen, pero no se limitan a Fab, Fab'-SH, anticuerpo de dominio único, Fv, y fragmentos scFv, como se proporciona a continuación.

45 El término "anticuerpo" en este documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos, y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada. En ciertas realizaciones preferidas, el agente de unión específico es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo monovalente, preferiblemente un fragmento monovalente derivado de un anticuerpo monoclonal.

50 Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de investigación, de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En algunas realizaciones, un anticuerpo se purifica (1) hasta más de un 95% en peso de anticuerpo según se determina mediante, por ejemplo, el método de Lowry, y en algunas realizaciones, a más de un 99% en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de, por ejemplo, un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o condiciones no reductoras usando, por ejemplo, azul de Coomassie o tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, habitualmente el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

60 Los "anticuerpos nativos" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro regularmente espaciados entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un

extremo (VL) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que determinados residuos de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios amino-terminal de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada puede ser denominado como "VH". El dominio variable de la cadena ligera puede ser denominado como "VL". Estos dominios son generalmente las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR), ambos en los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. Las partes más altamente conservadas de los dominios variables se denominan las regiones marco (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en gran parte una configuración de hoja beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con la HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, y varias de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidos y se describen generalmente en, por ejemplo, Abbas, et al., *Celular y Mol. Immunology*, 4ª ed., W. B. Saunders, Co. (2000). Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo intacto" y "anticuerpo completo" se usan en este documento indistintamente para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente intacta, no a fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos particularmente se refieren a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, que comprende preferiblemente la región de unión a antígeno del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos idénticos de unión a antígeno, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento residual "Fc", cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía es capaz de unirse al antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de unión al antígeno. En una realización, una especie de Fv de dos cadenas consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera en estrecha asociación no covalente. En una especie de Fv de una sola cadena (scFv), un dominio variable de cadena pesada y de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un conector peptídico flexible tal que las cadenas ligera y pesada pueden asociarse en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres HVR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis HVR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres HVR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab contiene los dominios variables de las cadenas pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxi terminal de la cadena

pesada de dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en el que el residuo cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Se produjeron originalmente F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv de cadena sencilla" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de scFv, ver, por ejemplo, Pluckthuen, en: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore (eds.), Springer-Verlag, Nueva York (1994) pp. 269-315.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable (VH) de cadena pesada conectado a un dominio variable (VL) de cadena ligera en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Mediante el uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, EP 0404097; WO 1993/01161; Hudson, et al., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134; y Hollinger, et al., *PNAS USA* 90 (1993) 6444-6448. Triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson, et al., *Nat. Med.* 9 (2003) 129-134.

El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones de origen natural, que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como no siendo una mezcla de anticuerpos discretos. En ciertas realizaciones, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia de polipéptido que se une a una diana, en el que la secuencia de polipéptidos de unión a la diana se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una única secuencia de polipéptido de unión a diana a partir de una pluralidad de secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un clon único de una pluralidad de clones, como un grupo de clones de hibridomas, clones de fagos o clones de DNA recombinante. Se debe entender que una secuencia de unión a la diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a la diana, para mejorar su producción en el 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 la diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de esta invención. En contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpo monoclonal tienen la ventaja de que por lo general no están contaminados con otras inmunoglobulinas.

Un agente de unión específico es preferiblemente un anticuerpo reactivo con Id. de Sec. Nº: 3.

Para los logros como se describe en la presente invención, se pueden utilizar anticuerpos de diversas fuentes. Los protocolos estándar para la obtención de anticuerpos pueden ser utilizados, así como los métodos alternativos modernos. Los métodos alternativos para la generación de anticuerpos comprenden, entre otros, el uso de péptidos sintéticos o recombinantes, que representan un epítipo clínicamente relevante de NNMT para la inmunización. Alternativamente, puede utilizarse la inmunización con DNA también conocida como vacuna de DNA. Es evidente que se pueden utilizar los anticuerpos monoclonales o policlonales de diferentes especies, por ejemplo, conejos, ovejas, cabras, ratas o cobayas. Dado que los anticuerpos monoclonales se pueden producir en cualquier cantidad requerida con propiedades constantes, representan las herramientas ideales en el desarrollo de un ensayo para la rutina clínica.

Como el experto en la materia apreciará ahora, la proteína NNMT se ha identificado como un marcador que es útil en la evaluación de la EPOC. Varios procedimientos de inmunodiagnóstico se pueden utilizar para lograr datos comparables a los logros de la presente invención.

Para la determinación de la proteína NNMT se incubó la muestra obtenida de un individuo in vitro con el agente de unión específica para NNMT en condiciones apropiadas para la formación de un complejo de agente de unión a NNMT. Tales condiciones no necesitan especificarse, ya que el experto en la materia sin ningún esfuerzo inventivo puede identificar fácilmente tales condiciones de incubación apropiadas. La cantidad de complejo de agente de unión a NNMT se determina y se utiliza en la evaluación de la EPOC. Como el experto en la técnica apreciará, existen numerosos métodos para determinar la cantidad de complejo de agente de unión específico a NNMT todo descrito con detalle en los libros de texto pertinentes (cf., por ejemplo, Tijssen, P., supra, o Diamandis, E.P., y Christopoulos, T.K. (eds.), *immunoassay*, Academic Press, Boston (1996)).

Los inmunoensayos son bien conocidos por el experto en la materia. Los métodos para llevar a cabo tales ensayos, así como las aplicaciones prácticas y procedimientos se resumen en los libros de texto relacionados. Los ejemplos

de los libros de texto relacionados son Tijssen, P., Preparación de enzima-anticuerpo u otros conjugados enzima-macromolécula, en: Practice and theory of enzyme immunoassays, pp 221-278, Burdon, R.H., y V. Knippenberg, P.H., (eds.), Elsevier, Amsterdam (1990), y varios volúmenes de Colowick, S.P., y Caplan, N.O. (Eds.), Methods in Enzymology, Academic Press, que trata de los métodos de detección inmunológicos, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121.

La presente invención también se refiere en una realización a la utilización de un anticuerpo que se une específicamente a la proteína NNMT en un método de acuerdo con la presente invención.

En una forma de realización en un método de acuerdo con la presente invención, se mide la proteína NNMT en un procedimiento de inmunoensayo.

En una realización adicional la proteína NNMT se detecta en un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA).

En una realización adicional la proteína NNMT se detecta en un ensayo de sándwich (formato de ensayo tipo sándwich). En tal ensayo, un primer agente de unión específica se utiliza para capturar la proteína NNMT en un lado y un segundo agente de unión específico, que está marcado para ser directa o indirectamente detectable, se usa en el otro lado. Los agentes de unión específicos utilizados en un formato de ensayo tipo sándwich pueden ser anticuerpos dirigidos específicamente contra la proteína NNMT. Por una parte, la detección puede llevarse a cabo mediante el uso de diferentes anticuerpos de captura marcados, es decir, anticuerpos que reconocen diferentes epítomos en el polipéptido NNMT. Por otra parte, un ensayo de tipo sándwich también puede llevarse a cabo con un anticuerpo de captura y el marcaje está dirigido contra el mismo epítomo de proteína NNMT. En esta realización, sólo se pueden detectar formas di- y multiméricas de la proteína NNMT. En una realización se utiliza un anticuerpo dirigido a la proteína NNMT en un inmunoensayo cualitativo (NNMT presente o ausente) o cuantitativo (se determina la cantidad de NNMT).

En una realización adicional el método de acuerdo con la presente invención se basa en la medición de NNMT, en el que dicha medición de NNMT se realiza en un inmunoensayo de tipo sándwich que emplea al menos dos anticuerpos reactivos con al menos dos epítomos no solapantes.

En una forma de realización adicional se detecta la proteína NNMT en un ensayo competitivo. En tal formato de ensayo se utiliza un agente de unión que se une específicamente a NNMT de Id. de Sec. N°: 3. En una mezcla NNMT marcado que se ha añadido a la mezcla y NNMT comprendido en una muestra compiten por la unión al agente de unión específica. El alcance de esta competición puede medirse de acuerdo con procedimientos estándar.

La concentración de la proteína NNMT en muestras de ensayo se puede determinar in vitro utilizando un ELISA específico, como ya se ha descrito anteriormente. Al usar de este formato de ensayo, los inventores han demostrado que las muestras de pacientes ya diagnosticados de EPOC por métodos clásicos, por ejemplo, espirometría, se pueden distinguir de las muestras de individuos aparentemente sanos. Los resultados se muestran en la sección de ejemplos de esta solicitud.

Los inventores de la presente invención sorprendentemente son capaces de detectar proteína NNMT en una muestra de fluido corporal. Aún más sorprendente es que son capaces de demostrar que la presencia de proteína NNMT en dicha muestra de fluido obtenida de un individuo puede correlacionarse con la EPOC. No se requiere tejido ni ninguna muestra de biopsia para hacer uso del marcador NNMT en la evaluación de la EPOC. La medición del nivel de proteína NNMT en (por ejemplo, una pequeña alícuota de) un simple muestra de fluido corporal se considera muy ventajosa en el campo de la EPOC.

En una realización preferida del método de acuerdo con la presente invención se practica con suero como material de muestra. En una realización preferida adicional, el método de acuerdo con la presente invención se practica con plasma como material de muestra. En una realización preferida adicional, el método de acuerdo con la presente invención se practica con sangre completa como material de muestra.

En una realización preferida adicional, la presente invención se refiere al uso de la proteína NNMT como molécula marcadora en la evaluación in vitro de la EPOC a partir de una muestra líquida obtenida de un individuo.

El escenario ideal para el diagnóstico sería una situación en la que un único evento o proceso causaría la enfermedad correspondiente, tal como, por ejemplo, en enfermedades infecciosas. En todos los demás casos un diagnóstico correcto puede ser muy difícil, especialmente cuando la etiología de la enfermedad no se entiende completamente como es el caso de la EPOC. Como el experto en la materia apreciará, ningún marcador bioquímico es diagnóstico con 100% de especificidad, y al mismo tiempo 100% sensible para una enfermedad multifactorial determinada, como, por ejemplo para la EPOC. Más bien, los marcadores bioquímicos se usan para evaluar con una determinada probabilidad o valor predictivo una cuestión de diagnóstico subyacente, por ejemplo, la presencia, ausencia, o la gravedad de una enfermedad. Por lo tanto en el diagnóstico clínico de rutina, en general, diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos se consideran en conjunto en la evaluación de una enfermedad subyacente. El experto en la materia está totalmente familiarizado con los métodos matemáticos/estadísticos que

habitualmente se utilizan para calcular un riesgo relativo o la probabilidad de la cuestión de diagnóstico que deben evaluarse. En la práctica clínica rutinaria diversos síntomas clínicos y marcadores biológicos generalmente se consideran juntos por un médico en el diagnóstico, tratamiento y manejo de la enfermedad subyacente.

5 Los pacientes con EPOC se tratan tradicionalmente con broncodilatadores o esteroides y se examinan mediante espirometría para la reversibilidad de la obstrucción del flujo aéreo. Si la reversibilidad es inferior al 15%, y en particular si tienen una larga historia de tabaquismo, entonces se clasificarán como pacientes con EPOC.

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

10

- Relación de FEV1/FVC <0,7
- FEV1 <70% del valor teórico, <15% de reversibilidad a la inhalación de agonista B2:
- 2 semanas con tratamiento de prednisona oral produce menos de 15% de reversibilidad del FEV1
- historial de fumador

15

FEV1 es el volumen de aire expulsado de los pulmones en un segundo, empezando desde una posición de máxima inspiración y el sujeto haciendo el máximo esfuerzo. FEV1% es el FEV1 expresado como un porcentaje de la capacidad vital forzada (FVC). El FVC es el volumen total de aire expulsado de los pulmones desde una posición de máxima inspiración con el sujeto haciendo el máximo esfuerzo. FEV1 se puede medir utilizando un espirómetro para medir el volumen de aire expirado en el primer segundo de la espiración.

20

La clasificación espirométrica de la EPOC según la ATS (American Thoracic Society)/Sociedad Europea de Enfermedades Respiratorias 2004 se muestra en la Tabla 1. ATS EPOC en estadio 0 ya no se utiliza actualmente en el sistema de clasificación de la ATS.

25

Tabla 1:

Estadio de EPOC	Gravedad	FEV1/FVC postbroncodilatador	FEV1% pred.
0	En riesgo #	> 0,7	≥ 80%
I	EPOC leve	≤ 0,7	≥ 80%
II	EPOC moderada	≤ 0,7	50% - 80%
III	EPOC grave	≤ 0,7	30% - 50%
IV	EPOC muy grave	≤ 0,7	<30%

FEV1: volumen espiratorio forzado en el primer segundo; FVC: capacidad vital forzada; #: pacientes que fuman o están expuestos a contaminantes, tener tos, esputo o disnea, tienen antecedentes familiares de enfermedad respiratoria.

30

En la evaluación de la EPOC la proteína marcadora NNMT será una ventaja en uno o más de los siguientes aspectos: evaluación; cribado; estadificación de la enfermedad; seguimiento de la progresión de la enfermedad; pronóstico; orientación de la terapia y el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

35

Las áreas preferidas de importancia diagnóstica en la evaluación de un individuo que se sospecha o se sabe que tiene EPOC son el cribado, estadificación de la enfermedad, seguimiento de la progresión de la enfermedad y el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

Cribado (evaluación de si los individuos están en riesgo de desarrollar EPOC o tienen EPOC):

40

El cribado se define como la aplicación sistemática de una prueba para identificar a los individuos por ejemplo, en individuos de riesgo, para los indicadores de una enfermedad, por ejemplo, la presencia de la EPOC. Preferiblemente, la población de selección se compone de individuos que se sabe están en riesgo de EPOC superior a la media. Por ejemplo, una población de cribado para la EPOC se compone de individuos que se sabe están en riesgo de EPOC superior a la media, como los fumadores y exfumadores.

45

El cribado en el sentido de la presente invención se refiere a la evaluación imparcial de los individuos con respecto a su riesgo de desarrollar EPOC.

La medición de la proteína NNMT ayudará al médico para evaluar la presencia o ausencia de la EPOC en un individuo sospechoso de tener EPOC.

50

En una realización, la presente invención se refiere al uso de la proteína NNMT en la evaluación de la EPOC. Preferiblemente la proteína NNMT se utiliza en la evaluación de la presencia o ausencia de la EPOC.

55

En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de la proteína NNMT en la evaluación in vitro de la EPOC en una muestra, en el que una concentración de proteína NNMT por encima de una concentración de referencia de proteína NNMT es indicativo de la EPOC.

En una realización preferida, dicha muestra de acuerdo con el uso se selecciona del grupo que consiste en suero, plasma y sangre completa.

5 En una realización adicional, la presente invención se refiere al uso de la proteína NNMT en la evaluación *in vitro* de la EPOC en un suero, plasma, o muestra de sangre completa, en el que una concentración de proteína NNMT por encima de una concentración de referencia de proteína NNMT en un suero, plasma, o muestra de sangre es indicativa de la presencia de la EPOC.

10 Estadificación de los pacientes

10 Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el uso de la proteína NNMT puede conducir a una clasificación *in vitro* de un paciente con EPOC en una etapa de la enfermedad EPOC, por ejemplo, en una etapa de 0 - IV de la EPOC según la clasificación de la ATS, respectivamente.

15 Los resultados experimentales para el uso de la proteína NNMT para clasificar a un paciente con EPOC en una etapa de la EPOC se muestran en el Ejemplo 4, Fig. 3 y 4.

Pronóstico

20 Los indicadores pronósticos pueden definirse como características clínicas, patológicas o bioquímicas de los pacientes con EPOC que predicen con una cierta probabilidad la evolución de la enfermedad. Su uso principal es ayudar en la planificación racional del manejo del paciente, es decir, evitar un tratamiento insuficiente de una enfermedad agresiva o un sobretreatmento de una enfermedad leve, respectivamente.

25 Como el nivel de proteína NNMT por sí solo contribuye significativamente a la diferenciación de los pacientes con EPOC de controles sanos o de otras enfermedades de pulmón, como por ejemplo, asma, bronquitis, fibrosis pulmonar y tuberculosis, preferiblemente para diferenciar EPOC de asma, se ha de esperar que será de ayuda en la evaluación del pronóstico de los pacientes que sufren de EPOC. La concentración de proteína NNMT muy probablemente se combinará con los resultados de pruebas de la función pulmonar o espirometría.

30 Diferenciación de la EPOC del asma

35 En una realización adicional, se utiliza el método de acuerdo con la presente invención para diferenciar EPOC de otros tipos de enfermedades pulmonares, preferiblemente el asma.

40 También es preferible la utilización de la proteína NNMT para diferenciar EPOC de otros tipos de enfermedades pulmonares, como por ejemplo asma, bronquitis, fibrosis pulmonar y tuberculosis, preferiblemente para diferenciar la EPOC del asma. Sorprendentemente, los inventores han descubierto que el uso de una combinación de marcadores, un marcador específico de la EPOC, preferiblemente NNMT, y un marcador de inflamación seleccionado del grupo que consiste en CRP, interleucina-6, amiloide A sérica, S100 y E-selectina, puede dar lugar a una diferenciación entre EPOC y otras enfermedades inflamatorias de pulmón, por ejemplo, asma e inflamación aguda o crónica del pulmón, respectivamente. Los resultados experimentales para la proteína NNMT y la proteína CRP se muestran en la sección de ejemplos.

45 la progresión de la enfermedad

En la actualidad es muy difícil predecir con una probabilidad razonable si un paciente diagnosticado de EPOC tendrá un estado más o menos estable, o si la enfermedad progresará.

50 La progresión de la enfermedad, es decir de la EPOC, se puede evaluar mediante el control *in vitro* de la concentración de proteína NNMT en muestras de ensayo, en especial mediante el análisis de una o más muestras consecutivas. Como se podrá apreciar que un aumento del nivel de ProSP-B C-terminal a lo largo del tiempo es indicativo de progresión de la enfermedad.

55 Seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia

El método de acuerdo con la presente invención, cuando se usa en la monitorización de pacientes, se pueden usar en el seguimiento de los pacientes y por ejemplo para ayudar a evaluar la eficacia de un tratamiento de la EPOC.

60 La monitorización de la respuesta de un paciente a la terapia puede ponerse en práctica por ejemplo, estableciendo el nivel del marcador pre- y post-terapéutico para la proteína NNMT, y comparando el nivel del marcador pre- y post-terapéutico.

65 La respuesta de un paciente a un tratamiento de la EPOC se puede evaluar *in vitro* mediante el seguimiento de la concentración de proteína NNMT en muestras de ensayo a lo largo del tiempo.

El nivel de proteína NNMT parece ser apropiada para controlar la respuesta de un paciente a la terapia. La presente invención por lo tanto también se refiere al uso de proteína NNMT en el seguimiento de la respuesta de un paciente a la terapia, en el que una disminución del nivel de proteína NNMT es un indicador positivo de un tratamiento eficaz de la EPOC.

#### Combinaciones de marcadores

Como el experto en la técnica apreciará, hay muchas maneras de utilizar las mediciones de dos o más marcadores con el fin de mejorar la respuesta diagnóstica bajo investigación.

Los marcadores bioquímicos se pueden determinar individualmente, o en una forma de realización de la invención, se pueden determinar de forma simultánea, por ejemplo, mediante el uso de una tecnología de array basada en un chip o en cuentas. Las concentraciones de los biomarcadores se interpretan entonces de forma independiente, por ejemplo, usando un valor umbral individual para cada marcador, o se combinan para la interpretación.

Como el experto en la materia apreciará, el paso de correlacionar un nivel de marcador con una cierta probabilidad o riesgo puede realizarse y conseguirse de diferentes maneras. Preferiblemente, la concentración determinada de la proteína NNMT y el uno o más marcadores se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión diagnóstica subyacente. Los valores de los marcadores se pueden combinar con la determinación de NNMT mediante cualquier método matemático actual adecuado.

Preferiblemente, el algoritmo matemático aplicado en la combinación de marcadores es una función logística. El resultado de aplicar tal algoritmo matemático o tal función logística preferiblemente es un solo valor. Dependiendo de la cuestión diagnóstica subyacente, tal valor puede correlacionarse fácilmente con, por ejemplo, el riesgo de un individuo de padecer EPOC o de otro tipo de usos diagnósticos previstos útiles en la evaluación de pacientes con EPOC. En una forma preferible, tal función logística se obtiene mediante a) la clasificación de los individuos en grupos, por ejemplo, normales, personas en situación de riesgo de EPOC, pacientes con inflamación aguda o crónica de los pulmones y así sucesivamente, b) la identificación de marcadores que difieren significativamente entre estos grupos mediante análisis univariado, c) el análisis de regresión logística para evaluar los valores discriminativos independientes de los marcadores útiles en la evaluación de estos diferentes grupos y d) la construcción de la función logística para combinar los valores discriminativos independientes. En este tipo de análisis, los marcadores ya no son independientes sino que representan una combinación de marcadores.

La función logística se utiliza para combinar los valores de NNMT y el valor de al menos otro marcador se obtiene mediante a) la clasificación de los individuos en los grupos de normales e individuos que puedan tener EPOC, respectivamente, b) el establecimiento de los valores de NNMT y el valor de al menos un marcador adicional c) llevar a cabo un análisis de regresión logística y d) la construcción de la función logística para combinar los valores de los marcadores de NNMT y el valor de la al menos un marcador adicional.

Una función logística para correlacionar una combinación de marcadores con una enfermedad emplea preferentemente un algoritmo desarrollado y obtenido mediante la aplicación de métodos estadísticos. Son métodos estadísticos apropiados, por ejemplo, el análisis discriminante (DA) (es decir, DA lineal, cuadrático, regularizado), los métodos de Kernel (es decir, SVM), los métodos no paramétricos (es decir, los clasificadores del vecino más próximo k), PLS (mínimos cuadrados parciales), los métodos basados en árboles (es decir, lógica de regresión, CART, métodos de bosque al azar, métodos de impulsado/embolsado), modelos lineales generalizados (es decir, de regresión logística), métodos basados en componentes principales (es decir, SIMCA), modelos aditivos generalizados, métodos basados en la lógica difusa, redes neuronales y métodos basados en algoritmos genéticos. El experto en la materia no tendrá ningún problema en la selección de un método estadístico adecuado para evaluar una combinación de marcadores de la presente invención y para obtener con ello un algoritmo matemático adecuado. En una realización, el método estadístico empleado para obtener el algoritmo matemático utilizado en la evaluación de la EPOC se selecciona de entre DA (es decir, análisis discriminante lineal, cuadrática, regularizada), métodos de Kernel (es decir, SVM), métodos no paramétricos (es decir, clasificadores del vecino más próximo k), PLS (mínimos cuadrados parciales), métodos basados en árboles (es decir, lógica de regresión, CART, métodos de bosque al azar, métodos de impulsado), o modelos lineales generalizados (es decir, de regresión logística). Los detalles relativos a estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias: Ruczinski, I., et al., *J. de Computational and Graphical Statistics* 12 (2003) 475-511; Friedman, J. H., *J. de la American Statistical Association* 84 (1989) 165-175; Hastie, T., et al., *The Elements of Learning*, Springer Verlag (2001); Breiman, L., et al., *Classification and regression trees*, Wadsworth International Group, California (1984); Breiman, L., *Machine Learning* 45 (2001) 5-32; Pepe, M. S., *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*, Oxford Statistical Science Series, 28, Oxford University Press (2003); y Duda, R.O., et al., *Pattern Classification*, John Wiley & Sons, Inc., 2ª Ed. (2001).

Es una realización de la invención el uso de un valor umbral multivariante optimizado para la combinación subyacente de marcadores biológicos y para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo, individuos normales de personas en riesgo de EPOC, pacientes con EPOC que responden a la terapia de los que la terapia falla, los pacientes que tienen una inflamación aguda de pulmón de los pacientes con EPOC, los pacientes con EPOC que

muestran progresión de la enfermedad y los pacientes con EPOC que no muestra progresión de la enfermedad, respectivamente.

- 5 El área bajo la curva operadora del receptor (= AUC) es un indicador del rendimiento o precisión de un procedimiento de diagnóstico. La exactitud de un método diagnóstico se describe mejor mediante sus características operadoras del receptor (ROC) (ver especialmente Zweig, M. H., y Campbell, G., Clin. Chem. 39 (1993) 561-577). El gráfico ROC es una representación de todos los pares de sensibilidad/ especificidad resultantes de variar continuamente el umbral de decisión en toda la gama de datos observados.
- 10 El rendimiento clínico de una prueba de laboratorio depende de su exactitud diagnóstica, o la capacidad de clasificar correctamente a los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. La exactitud diagnóstica mide la capacidad de la prueba de distinguir correctamente dos condiciones diferentes en los sujetos investigados. Tales condiciones son, por ejemplo, salud y enfermedad, o progresión de la enfermedad frente a ninguna progresión de la enfermedad.
- 15 En cada caso, el gráfico ROC indica la superposición entre las dos distribuciones representando la sensibilidad frente a 1 - especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. El eje y es la sensibilidad, o la fracción de verdaderos positivos [definida como (número de resultados positivos verdaderos de la prueba)/(número de resultados verdaderos positivos + falsos negativos de la prueba)]. Esto también ha sido denominado positividad en presencia de una enfermedad o condición. Se calcula únicamente a partir del subgrupo afectado. El eje x es la fracción de falsos positivos, o 1 – especificidad [definida como (número de resultados falsos positivos)/(número de resultados falsos positivos + verdaderos negativos)]. Es un índice de especificidad y se calcula por completo del subgrupo no afectado. Debido a que las fracciones de positivos verdaderos y de falsos positivos se calculan enteramente por separado, mediante el uso de los resultados de la prueba de dos subgrupos diferentes, el gráfico ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la gráfica ROC representa un par de sensibilidad/ 1-especificidad correspondiente a un umbral de decisión particular. Una prueba con discriminación perfecta (sin solapamiento en las dos distribuciones de resultados) tiene una línea ROC que pasa por la esquina izquierda superior, en la que la fracción de positivos verdaderos es 1,0 o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción de falsos positivos es 0 (especificidad perfecta). La representación teórica para una prueba sin discriminación (distribuciones idénticas de resultados para los dos grupos) es una línea diagonal de 45° desde la esquina inferior izquierda a la esquina superior derecha. La mayoría de representaciones se ubican entre estos dos extremos. (Si la línea ROC cae completamente por debajo de la diagonal de 45°, esto se soluciona fácilmente invirtiendo el criterio de "positividad" de "mayor que" a "menor que", o viceversa.) Cualitativamente, cuanto más cerca está la representación a la parte superior esquina izquierda, mayor es la exactitud global de la prueba.
- 20
- 25
- 30
- 35 Un objetivo conveniente para cuantificar la precisión diagnóstica de una prueba de laboratorio es expresar su rendimiento con un solo número. La medida global más común es el área bajo el gráfico ROC (AUC). Por convención, esta área es siempre  $\geq 0,5$  (si no lo es, se puede invertir la regla de decisión para que así sea). Los valores oscilan entre 1,0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0,5 (sin diferencia de distribución aparente entre los dos grupos de valores de prueba). El área no depende solamente de una parte particular de la representación, como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad al 90% de especificidad, sino de toda la representación. Esta es una expresión cuantitativa, descriptiva de la proximidad de la línea ROC a la perfección (área = 1,0).
- 40
- 45 La sensibilidad global del ensayo dependerá de la especificidad requerida para la práctica del método aquí descrito. En ciertas configuraciones preferibles, una especificidad del 75% puede ser suficiente y los métodos estadísticos y algoritmos resultantes pueden basarse en este requisito de especificidad. En una realización preferida, el método utilizado para evaluar los individuos en riesgo de EPOC se basa en una especificidad del 80%, del 85% o también preferiblemente del 90% o del 95%.
- 50 Ciertas combinaciones de marcadores serán ventajosas en el cribado de la EPOC.

#### Marcador de inflamación

- 55 Actualmente se conocen muchos marcadores séricos para el diagnóstico de una inflamación. El experto en la materia está familiarizado con el término "marcador de inflamación". Dicho marcador de inflamación, por ejemplo, se selecciona de entre interleucina-6, proteína C reactiva, amiloide A sérica, sE-selectina y una proteína S100.

60 La interleucina-6 (IL-6) es una proteína secretada de 21 kDa que tiene numerosas actividades biológicas que pueden dividirse entre las que participan en la hematopoyesis y las que participan en la activación de la respuesta inmune innata. IL-6 es un reactante de fase aguda y estimula la síntesis de una variedad de proteínas, incluyendo moléculas de adhesión. Su función principal es mediar en la producción de proteínas hepáticas de fase aguda, y su síntesis está inducida por las citoquinas IL-1 y TNF- $\alpha$ . IL-6 es producida normalmente por los macrófagos y los linfocitos T. La concentración normal de IL-6 en suero es  $<5$  pg/ml.

65 La proteína C reactiva (CRP) es una proteína de fase aguda homopentamérica de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  con subunidades de 21 kDa que está involucrado en la defensa del huésped. La síntesis de la CRP está inducida por IL-6, e



indirectamente por IL-1, ya que IL-1 puede activar la síntesis de IL-6 en las células de Kupffer en los sinusoides hepáticos. La concentración plasmática normal de CRP es <3 µg/ ml (30 nM) en un 90% de la población sana, y <10 µg/ ml (100 nM) en un 99% de los individuos sanos. Las concentraciones plasmáticas de CRP pueden, por ejemplo, medirse mediante un inmunoensayo. Las concentraciones plasmáticas de CRP pueden, por ejemplo, medirse mediante formatos de ensayo homogéneo o ELISA.

La amiloide A sérica (SAA) es una proteína de fase aguda de bajo peso molecular de 11,7 kDa. Es predominantemente sintetizada por el hígado en respuesta a la estimulación de IL-1, IL-6 o TNF-α, y está implicada en la regulación de la respuesta inmune dependiente de células T. Tras eventos agudos la concentración de SAA aumenta hasta 1000 veces alcanzando un miligramo por mililitro. Se utiliza para monitorizar la inflamación en enfermedades tan diversas como la fibrosis quística, rechazo de injerto renal, trauma o infecciones. En la artritis reumatoide, en ciertos casos se han utilizado como sustituto de la CRP, pero la SAA aún no está tan ampliamente aceptada.

Las proteínas S100 forman una familia cada vez mayor de proteínas de unión a Ca<sup>2+</sup> que hoy incluye más de 20 miembros. La estructura fisiológicamente relevante de las proteínas S100 es un homodímero, pero algunas pueden formar también heterodímeros entre sí, por ejemplo, S100A8 y S100A9. Las funciones intracelulares van desde la regulación de la fosforilación de proteínas, de actividades enzimáticas, o de la dinámica del citoesqueleto a la implicación en la proliferación celular y la diferenciación. Como algunas proteínas S100 también se liberan de células, se han descrito también funciones extracelulares, por ejemplo, de supervivencia neuronal, proliferación de astrocitos, inducción de apoptosis y regulación de los procesos inflamatorios. S100A8, S100A9, el heterodímero S100A8/A9 y S100A12 se han encontrado en la inflamación, respondiendo S100A8 a inflamación crónica, mientras que S100A9, S100A8/A9 y S100A12 aumentan en la inflamación aguda. S100A8, S100A9, S100A8/A9 y S100A12 se han relacionado con diferentes enfermedades con componente inflamatorio, incluyendo algunos tipos de cáncer, rechazo a aloinjerto renal, colitis y sobretodo con la RA (Burmeister, G., y Gallacchi, G., *Inflammopharmacology* 3 (1995) 221-230; Foell, D., et al., *Rheumatology* 42 (2003) 1383-1389).

La sE-selectina (molécula de adhesión a los leucocitos endotelial soluble-1, ELAM-1) es una glicoproteína transmembrana de tipo I de 115 kDa, que se expresa sólo en las células endoteliales y sólo tras la activación por citoquinas inflamatorias (IL-1β, TNF-α) o endotoxina. La E-selectina de la superficie celular es un mediador de la unión rodante de los leucocitos al endotelio, un paso esencial en la extravasación de leucocitos hacia el sitio de la inflamación, y por lo tanto juega un papel importante en la respuesta inflamatoria localizada. La E-selectina soluble se encuentra en la sangre de individuos sanos, probablemente derivada de la escisión proteolítica de la molécula expresada en la superficie. Los niveles elevados de sE-selectina en suero se han reportado en una variedad de condiciones patológicas (Gearing, A. J., y Hemingway, I., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 667 (1992) 324-331).

Un array es una colección de marcadores individuales ordenables. Tales marcadores pueden estar dispuestos espacialmente, como en los arrays contenidos en placas de microtitulación o impresos sobre superficies planas, donde cada marcador está presente en distintas coordenadas X e Y. Alternativamente, los marcadores pueden estar ordenados en base a etiquetas, cuentas, nanopartículas o propiedades físicas. Un array de bio-chip se puede preparar según métodos conocidos por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, la US 5.807.522; Robinson, WH, et al., *Nat Med* 8 (2002) 295-301; Robinson, WH, et al., *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 885-893). Un array como se utiliza aquí se refiere a cualquier ensayo inmunológico con múltiples marcadores ordenables. Un array de bio-chip, también conocido por el experto en la materia como microarray, es una forma miniaturizada de un array.

Los términos "chip", "bio-chip", "polímero-chip" o "proteína-chip" se usan indistintamente y se refieren a una colección de un gran número de sondas, marcadores o marcadores bioquímicos dispuestos sobre un sustrato común, que podría ser una parte de una lámina de silicio, una tira de nylon, una tira de plástico o un portaobjetos de vidrio.

Un "array", "macroarray" o "microarray" es una colección creada intencionalmente de sustancias, tales como moléculas, marcadores, aberturas, microbobina, detectores y/ o sensores, conectados a o fabricados sobre un sustrato o superficie sólida, tal como vidrio, plástico, chip de silicio u otro material que forma una matriz. Los arrays se pueden utilizar para medir los niveles de un gran número, por ejemplo, decenas de miles o millones, de reacciones o combinaciones simultáneamente. Un array también puede contener un pequeño número de sustancias, por ejemplo, una, algunas o una docena. Las sustancias del array pueden ser iguales o diferentes unas de otras. El array puede adoptar una variedad de formatos, por ejemplo, bibliotecas de moléculas solubles, bibliotecas de moléculas inmovilizadas, bibliotecas de anticuerpos inmovilizados, bibliotecas de compuestos unidos a cuentas de resina, chips de sílice u otros soportes sólidos. El array podría ser un macroarray o un microarray, dependiendo del tamaño del soporte del array. Un macroarray generalmente contiene tamaños de pastilla de alrededor de 300 micras o más grandes para poder tomar imágenes fácilmente con escáneres de gel y de transferencia. Un microarray contendría generalmente tamaños de pastilla de menos de 300 micras.

Un "soporte sólido" es material polimérico insoluble funcionalizado, al que se pueden adherir o unir covalentemente (a menudo a través de un enlazante) miembros de la biblioteca o reactivos para ser inmovilizados o para permitir que

puedan separarse fácilmente (por filtración, centrifugación, lavado etc.) de los reactivos en exceso, subproductos de reacción solubles o disolventes.

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

#### Descripción de las Figuras

10 Figura 1: La figura 1 muestra el diagrama de las características operadoras del receptor (representación ROC) de la proteína NNMT en muestras de EPOC con una AUC de 0,88 (ROC del 88%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con las 186 muestras control obtenidos de pacientes sanos del grupo control. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); Eje Y: sensibilidad (verdadero positivo).

15 Figura 2: La figura 2 muestra el diagrama de las características operadoras del receptor (representación ROC) de la CRP en muestras de EPOC con una AUC de 0,74 (ROC del 74%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con las 186 muestras control obtenidas de pacientes sanos control. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); Eje Y: sensibilidad (verdadero positivo).

20 Figura 3: La figura 3 muestra la distribución de la representación de cajas de los valores de concentración de NNMT determinados en suero de acuerdo con los estadios 0 - IV de la EPOC de las 123 muestras con EPOC (estadio EPOC como se describe en la Tabla 1).

25 Figura 4: La figura 4 muestra la distribución de la representación de cajas de la concentración en suero de CRP determinada de acuerdo con los estadios 0 - IV de EPOC de las 123 muestras con EPOC (estadio EPOC como se muestra en la Tabla 1).

30 Figura 5: La figura 5 muestra el gráfico de las características operadoras del receptor (representación ROC) de la proteína NNMT en muestras de EPOC con una AUC de 0,88 (ROC del 88%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con las 26 muestras control obtenidas de pacientes con asma. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); Eje Y: sensibilidad (verdadero positivo).

35 Figura 6: La figura 6 muestra la representación gráfica de las características operadoras del receptor (representación ROC) de la CRP en muestras de EPOC con una AUC de 0,70 (ROC del 70%) para la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con las 26 muestras control obtenidas de pacientes con asma. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); Eje Y: sensibilidad (verdadero positivo).

40 Figura 7: La figura 7 muestra una distribución de la representación de cajas de la concentración sérica de NNMT determinada [pg/ ml] de acuerdo con 123 muestras con EPOC de estadio 0-IV (4\_EPOC), 50 sanos (1\_sano), 135 controles de cribado (2\_control de cribado) y 26 muestras de pacientes de asma (3\_asma). El eje y se ajustó para una mejor "visualización".

45 Figura 8: La figura 8 muestra el gráfico de las características operadoras del receptor (representación ROC) de la proteína NNMT en muestras de EPOC para las combinaciones de marcadores NNMT (línea continua), NNMT + FEN1 (línea discontinua) y NNMT + FEN1 + ASC (línea punteada) en la evaluación de 123 muestras obtenidas de pacientes con EPOC en comparación con 161 muestras control obtenidas de pacientes sanos control y de asma. Eje X: 1-especificidad (falsos positivos); Eje Y: sensibilidad (verdadero positivo).

#### Descripción de las secuencias

50 Id. de Sec. Nº: 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína ASC humano (número de registro de base de datos SwissProt: Q9ULZ3).

55 Id. de Sec. Nº: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína humana ARMET (número de registro de base de datos SwissProt: P55145).

Id. de Sec. Nº: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína NNMT humano (número de registro de base de datos SwissProt: P40261).

60 Id. de Sec. Nº: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína humana FEN1 (número de registro de base de datos SwissProt: P39748).

Id. de Sec. Nº: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína humana APEX1 (número de registro de base de datos SwissProt: P27695).

65 Id. de Sec. Nº: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína humana Seprasa (número de registro de base de datos SwissProt: Q12884).

Id. de Sec. N°: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína humana DPPIV (número de registro de base de datos SwissProt: P27487).

Ejemplo 1

5

Población de estudio con EPOC

Fuentes de muestras de suero:

10 Con el fin de identificar proteínas específicas de la EPOC como posibles marcadores de diagnóstico para la EPOC, se obtuvieron muestras de suero a partir de pacientes de EPOC bien caracterizados (sistema de clasificación de la ATS según la tabla 1) en un estudio multicéntrico nacional. De cada donante de la muestra, se realizó una espirometría. La función pulmonar, otras pruebas de diagnóstico, así como la razón para su transferencia, diagnóstico y comorbilidades se documentaron en un formulario de informe de caso específico (CRF). Las muestras con EPOC han sido evaluadas en comparación con las muestras control obtenidas de los grupos control 1 - 4 como se muestra en la tabla 2.

15

Preparación de muestras de suero:

20 Las muestras de suero se extrajeron en un tubo de suero y se dejó coagular durante al menos 60 minutos hasta 120 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación (10 min, 2000 g), el sobrenadante se dividió en alícuotas de 1 ml y se congeló a -70 ° C. Antes de la medición, las muestras se descongelaron, se realicuataron en volúmenes más pequeños adecuados para los ensayos de prototipos y ensayos de referencia y se volvieron a congelar. Las muestras se descongelaron inmediatamente antes del análisis. Por lo tanto, cada muestra en el panel tenía sólo dos ciclos de congelación-descongelación antes de la medición.

25

Ejemplo 2.1

Generación de anticuerpos a la proteína marcadora NNMT

30

El anticuerpo policlonal a la proteína NNMT se ha generado para el uso adicional del anticuerpo en la medición de los niveles de NNMT en suero, plasma y sangre mediante ensayos de inmunodetección, por ejemplo, transferencia Western y ELISA.

35

Expresión de proteínas recombinantes en E. coli

40 Con el fin de generar anticuerpos contra NNMT, se llevó a cabo la expresión recombinante de la proteína para la obtención de inmunógenos. La expresión se llevó a cabo aplicando una combinación del sistema de expresión RTS 100 y la expresión en E. coli. En una primera etapa, se analizó la secuencia de DNA y se obtuvieron recomendaciones para variantes mutacionales silenciosas de cDNA de alto rendimiento y las respectivas secuencias de cebadores de PCR utilizando el sistema "ProteoExpert RTS E. coli HY". Este es un servicio basado en la web comercial ([www.proteoexpert.com](http://www.proteoexpert.com)). Utilizando los pares de cebadores recomendados, el sistema "RTS 100 E. coli Linear Template Generation Set, His-tag" de (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, art 3186237) para generar los moldes de PCR lineales a partir del DNAC y se utilizó para la transcripción in vitro y expresión de la

45 secuencia de nucleótidos que codifica la proteína NNMT. Para la detección mediante transferencia Western y posterior purificación, la proteína expresada contenía una cola de His. Se identificó la mejor variante de expresión. Todos los pasos de la PCR hasta la expresión y la detección se llevaron a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El correspondiente producto de PCR, que contiene todas las regiones reguladoras necesarias T7 (promotor, sitio de unión ribosómico y terminador T7) se clonó en el vector pBAD TOPO® (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania, Cat. No. K 4300/01) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la expresión utilizando las secuencias reguladoras de T7, el constructo se transformó en E. coli BL 21 (DE 3) (Studier, FW, et al., Methods Enzymol. 185 (1990) 60-89) y las bacterias transformadas se cultivaron en un lote de 1 l para la expresión de proteínas.

50

55 La purificación de la proteína de fusión Su-NNMT se llevó a cabo siguiendo los procedimientos estándar en una columna de quelato de níquel. Brevemente, 1 l de cultivo de bacterias que contiene el vector de expresión para la proteína de fusión His-NNMT se sedimentó por centrifugación. El sedimento celular se resuspendió en tampón de lisis, que contiene fosfato, pH 8,0, cloruro de guanidinio 7 M, imidazol y tioglicerol, seguido de homogeneización utilizando un Ultra-Turrax®. El material insoluble se sedimentó por centrifugación a alta velocidad y el sobrenadante se aplicó a una columna cromatográfica de quelato de Ni. La columna se lavó con varios volúmenes de lecho de tampón de lisis seguido de lavados con tampón, que contiene fosfato, pH 8,0 y urea. Finalmente, el antígeno unido se eluyó utilizando un tampón fosfato que contiene SDS en condiciones ácidas.

60

Generación de anticuerpos policlonales

65 a) Inmunización

Para la inmunización, se preparó una emulsión fresca de la solución de proteína (100 µg/ml de proteína NNMT) y adyuvante completo de Freund en una proporción 1:1. Cada conejo fue inmunizado con 1 ml de la emulsión los días 1, 7, 14 y 30, 60 y 90. Se extrajo sangre y el suero resultante anti-NNMT se utilizó para experimentos adicionales como se describe en los ejemplos 3 y 4.

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

10 Un volumen de suero de conejo se diluyó con 4 volúmenes de tampón acetato (60 mM, pH 4,0). El pH se ajustó a 4,5 con Tris-base 2 M. Se añadió ácido caprílico (25 µl/ml de muestra diluida) gota a gota con agitación vigorosa. Después de 30 min se centrifugó la muestra (13 000 x g, 30 min, 4 °C), el sedimento se descartó y el sobrenadante se recogió. El pH del sobrenadante se ajustó a 7,5 mediante la adición de Tris-base 2 M y se filtró (0,2 µm).

15 La inmunoglobulina en el sobrenadante se precipitó bajo agitación vigorosa mediante la adición gota a gota de una solución de sulfato de amonio 4 M hasta una concentración final de 2 M. Las inmunoglobulinas precipitadas se recogieron mediante centrifugación (8.000 xg, 15 min, 4 °C).

20 El sobrenadante se descartó. El sedimento se disolvió en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM y se dializó exhaustivamente. El dializado se centrifugó (13 000 x g, 15 min, 4 °C) y se filtró (0,2 µm).

20 Biotinilación de IgG policlonal de conejo

25 IgG policlonal de conejo se llevó a 10 mg/ml en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM. Por cada ml de solución de IgG se añadieron 50 µl de biotina -N-hidroxisuccinimida (3,6 mg/ml en DMSO). Después de 30 min a temperatura ambiente, la muestra se sometió a cromatografía en Superdex 200 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogió la fracción que contiene IgG con biotina. Los anticuerpos monoclonales han sido biotinilados según el mismo procedimiento.

30 Digoxigenación de IgG policlonal de conejo

35 IgG policlonal de conejo se llevó a 10 mg/ml en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/NaOH, NaCl 30 mM, pH 7,5. Por cada ml de solución de IgG se añadieron 50 µl de ácido digoxigenina-3-O-metilcarbonil-ε-aminocaproico éster de N-hidroxisuccinimida (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania, nº Cat. 1 333 054) (3,8 mg/ml en DMSO). Después de 30 min a temperatura ambiente, la muestra se cromatografió en Superdex® 200 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM/NaOH, pH 7,5, NaCl 30 mM). Se recogieron las fracciones que contienen IgG digoxigenado. Los anticuerpos monoclonales han sido marcados con digoxigenina según el mismo procedimiento.

Ejemplo 2.2

40 CRP

La proteína marcadora CRP se mide usando un ensayo homogéneo (Hitachi) distribuido por Roche Diagnostics, Mannheim (FRG).

45 Ejemplo 3

ELISA para la medición de NNMT en muestras de suero o plasma humanos

50 Para la detección de NNMT en muestras de suero o plasma humanos, se desarrolló un ELISA en sándwich. Para la captura y detección del antígeno, las alícuotas del anticuerpo contra la NNMT se conjugaron con biotina y digoxigenina, respectivamente.

55 Las muestras (20 µl) se mezclaron en pocillos separados de una placa de microtitulación cubierta con estreptavidina con 100 µl de reactivo de anticuerpo que contiene 0,12 µg/ml de cada, anticuerpo marcado con biotina y digoxigenina en tampón de incubación (fosfato 40 mM, tartrato de sodio 200 mM, EDTA 10 mM, 0,05% fenol, 0,1% polietilenglicol 40.000, 0,1% de Tween 20, 0,2% BSA, 0,1% de IgG bovina, 0,02% de 5-Bromo-5-nitro-1,3-dioxano ajustado a pH 7,4, suplementado con 200 µg/ml de fragmentos Fab IgG monoclonal polimérico de ratón para la eliminación de la respuesta de anticuerpos anti-rata humanos (HARA); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº Catálogo 11096478-001).

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

En el siguiente paso, los pocillos se incubaron con 30 mU/ml de conjugado anti-digoxigenina con HRP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº Catálogo 1633716) en tampón de conjugación universal (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº Catálogo 11684825) durante 60 minutos y se lavó como antes.

5 Los pocillos se incubaron a continuación durante 30 min. con 100 µl de solución de sustrato TMB (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania, nº Catálogo 12034425). La adición de ácido sulfúrico 2 N (50 µl) detuvo el desarrollo del color y cambió el color azul a amarillo. Se midió la DO a 450 nm con un lector de ELISA.

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

15 La ecuación de la curva de calibración se calculó mediante ajuste de curvas de mínimos cuadrados no lineales (Wiener-Rodbard) y se utiliza para convertir la lectura de la absorbancia de un pocillo en el valor de la concentración correspondiente. El resultado se multiplica por el factor de predilución para obtener la concentración de la correspondiente muestra.

20 Ejemplo 4

NNMT como marcador de suero para la EPOC

Se utilizaron muestras de suero derivadas de 123 pacientes bien caracterizados con EPOC de estadio de EPOC según clasificación ATS entre 0 y IV que figura en la tabla 1. La población de estudio se muestra en la Tabla 2.

25

Tabla 2: Población de estudio

Tipo de muestra	Número de muestras
Estadio de la EPOC 0 - IV (según la clasificación de la ATS que se muestra en la tabla 1)	123
Control 1: sanos no fumadores (función pulmonar normal)	50
Control 2: fumadores sanos y ex fumadores (función pulmonar normal)	88
Control 3: individuos sanos con riesgos laborales (amianto, sílice, polvo, ...)	48
Control 4: pacientes con asma	26

30 La concentración sérica de proteína NNMT en las muestras de la EPOC se evalúa en comparación con muestras control (Control 1, 2 y 3) obtenidas de individuos evidentemente sanos (=cohorte control), y los pacientes de asma (Control 4), con un AUC de 0,88 (Tabla 3). Una curva de características operadoras del receptor (ROC) de los resultados representados en la Tabla 3 de NNMT marcador se muestra en la Fig. 1. Los datos determinados para el marcador de la inflamación CRP se muestran en la Fig. 2. El AUC del marcador NNMT es mayor que la AUC de CRP.

35 Tabla 3: Análisis ROC de la proteína marcadora en comparación con CRP

Marcador	NNMT	CRP
ROC	88%	74%

40 El valor de corte se determinó en el colectivo de control mediante el cálculo del cuantil del 95%, resultando en una especificidad del 95%. El potencial de diagnóstico del biomarcador se evaluó ya sea mediante el cálculo de la curva de características operadoras del receptor (ROC) (Tabla 3) o la sensibilidad clínica a la especificidad preestablecida de 95% (Tabla 4). La sensibilidad para una línea de corte vs individuos sanos (Control 1) para la EPOC del marcador NNMT es del 67%. Con un valor de corte que produce una especificidad del 95% en la correspondiente cohorte de control (Control 1, 2 y 3: es decir, los no fumadores sanos, fumadores, ex fumadores y personas con riesgo ocupacional para desarrollar EPOC), la sensibilidad del marcador NNMT para un valor de corte para el cribado general para la EPOC es del 53%.

45

Tabla 4 : Sensibilidad y especificidad de la proteína marcadora en comparación con CRP

Marcador	NNMT	CRP
especificidad	95%	95%
sensibilidad(control de corte de 1)	67%	31%
sensibilidad (control de corte de 1, 2 y 3)	53%	24%

50 Cuando se aplica un valor de corte (95% de especificidad) basado en el control 1 (control sano según la tabla 2) o basado en el control 1, 2 y 3 (controles de cribado de acuerdo con la tabla 2), la sensibilidad del marcador NNMT es mayor que la sensibilidad de CRP (Tabla 4). Esto también se refleja mediante el análisis ROC, en el que el marcador NNMT presenta una AUC mayor que el marcador CRP (Tabla 3).

Los datos determinados para la proteína NNMT en muestras de EPOC de acuerdo con los estadios de EPOC 0 - IV según ATS se han utilizado para calcular el diagrama de cajas mostrado en la Fig. 3, que representa la correlación de la concentración sérica de proteína NNMT con los estadios de EPOC 0 - IV según ATS. Los datos determinados para el marcador de inflamación CRP dentro de cada muestra clasificada de acuerdo con los estadios de EPOC 0 - IV según ATS se han utilizado para calcular el diagrama de cajas mostrado en la Fig. 4, que representa la correlación de la concentración sérica de CRP con los estadios de la EPOC.

El marcador NNMT tiene una precisión ligeramente mejorada en la clasificación de los pacientes con EPOC en los estadios 0 - IV según ATS en comparación con CRP.

Ejemplo 5

NNMT como marcador sérico para diferenciar EPOC humano vs asma

Se analizaron muestras derivadas de 123 pacientes bien caracterizados con EPOC de estadio de EPOC según clasificación ATS entre 0 y IV que figura en la tabla 1, así como las muestras procedentes de 26 pacientes de asma (control 4 como se muestra en la Tabla 2) utilizando el marcador NNMT. Con un valor de corte que produce una especificidad del 95% frente a la cohorte de control de asma, la sensibilidad para la EPOC es del 58% (Tabla 5).

La sensibilidad para diferenciar EPOC de asma del marcador NNMT es mayor que la sensibilidad del marcador de la inflamación CRP.

Tabla 5: Diferenciación de la EPOC vs asma mediante el uso de proteínas marcadoras

Marcador	NNMT	CRP
Especificidad (vs. asma)	95%	95%
Sensibilidad (para la EPOC )	58%	25%
ROC	88%	70%

Una representación gráfica de los resultados de marcador NNMT se muestra en la Fig. 5 como curva de características operadoras del receptor (ROC). Los resultados para el marcador de la inflamación CRP se muestran en la Fig. 6 como curva de características operadoras del receptor (ROC).

Los datos determinados para la proteína NNMT en muestras de EPOC se han utilizado para calcular el diagrama de cajas mostrado en la Fig. 7 basado en los datos mostrados en la Tabla 6, que representan la correlación de la concentración sérica de proteína NNMT con los estadios de EPOC 0 - IV según ATS (n = 123, como se muestra en la Tabla 2) vs muestras de sujetos sanos (n = 50), muestras de control de cribado (n = 135) y pacientes con asma (n = 26). Mientras que los valores medios de los controles (sanos, control de cribado y asma) oscilan entre 197 y 264 pg/ml, las concentraciones de NNMT de los pacientes con EPOC son significativamente más altas con un valor medio de 885 pg/ml. Los resultados se representan en la Tabla 6.

Tabla 6: Variabilidad de la NNMT

NNMT	N	mínimo [pg/ml]	máximo [pg/ml]	valor medio [pg/ml]	DE	EE de la media	95% del KI inferior	95% del KI superior
1_Sano	50	0	831,5955	196,8959	168,0029	23,7592	149,15	244,6418
2_control de cribado	135	0	1312,7	264,405	210,3739	18,03941	228,7286	300,0814
3_Asma	26	24,3581	565,8323	247,2593	144,594	28,35722	188,8565	305,6621
4_EPOC	123	91.0843	15.859,32	885,0681	1483,145	135,392	616,9785	1153,158

Ejemplo 6

combinaciones de marcadores/análisis estadístico y resultados

Se utilizó la penalización de regresión logística (PLR) como un modelo matemático para las combinaciones de marcadores como se aplica en el R-toolbox "glmnet" (<http://cran.r-project.org/>). Para buscar un marcador adicional, el marcador inicial entró de forma no penalizada en el modelo, mientras que todos los otros marcadores fueron objeto de penalización.

El algoritmo de optimización (a saber, la selección del tipo de penalización y su parámetro de penalización) se llevó a cabo mediante una validación cruzada interna repetida 10 veces, mientras que la derivación de los parámetros de rendimiento (sensibilidad y especificidad) se basan en una validación cruzada externa repetida 10 veces.

El conjunto de datos original se dividió en 10 partes, después, 9 de estas partes formó el grupo de entrenamiento y la décima parte el grupo de prueba. El grupo de entrenamiento se dividió entonces también en 10 partes, 9 de estas partes formó el grupo de subentrenamiento y la décima parte el grupo de subprueba. Con estos sub-conjuntos de datos el parámetro de penalización se optimizó en base al número de marcadores adicionales. Con este valor optimizado el PLR se aplicó a todo el conjunto de entrenamiento para generar una regla de diagnóstico. Se determinó un umbral en las probabilidades de los casos posteriores estimados en los controles, así como en los casos del grupo de entrenamiento para lograr una especificidad y sensibilidad aparente del 90% para la regla de diagnóstico multivariante. A continuación, esta regla se aplicó al grupo de prueba para estimar la sensibilidad y especificidad en el umbral proporcionado. La validación cruzada externa repetida 10 veces se repitió 50 veces, la validación cruzada interna 25 veces.

Un análisis detallado de los análisis individuales de validación cruzada reveló que el mejor marcador adicional para NNMT es FEN1, ya que fue seleccionado como mejor marcador adicional en todos los análisis. El mejor modelo con dos marcadores adicionales es NNMT más FEN1 y ASC. El mejor modelo con tres marcadores adicionales es NNMT más FEN1, ASC y seprasa.

Se analizaron muestras derivadas de 123 pacientes con EPOC bien caracterizados de acuerdo con los estadios EPOC 0 - IV según la clasificación ATS, como se muestra en la Tabla 2, así como una cohorte de control consistente en 161 muestras derivadas de pacientes sanos (n = 136) y pacientes con asma (n = 25).

En la Tabla 7 se proporciona el rendimiento de clasificación para estas combinaciones en el grupo de entrenamiento y de prueba, en base a una especificidad del 90%.

Los resultados de la Tabla 7 muestran claramente, que por la combinación de un marcador adicional la sensibilidad puede mejorar significativamente en comparación con NNMT como marcador único sin pérdida de especificidad.

Tabla 7: Combinaciones de marcadores en una especificidad del 90%

Combinación	Sens. Entrenamiento [log]	Espec. Entrenamiento [log]	Sens. Prueba [log]	Espec. Prueba [log]
NNMT + FEN1	0,77 (0,66-0,8)	0,9 (0,89-0,9)	0,76 (0,72-0,77)	0,89 (0,87-0,91)
NNMT + FEN1 + ASC	0,77 (0,74-0,84)	0,9 (0,89-0,9)	0,76 (0,75 -0,78)	0,89 (0,86-0,91)
NNMT + FEN1 + ASC + seprasa	0,81 (0,75-0,86)	0,9 (0,89-0,9)	0,8 (0,77-0,82)	0,89 (0,86-0,91)

En la Tabla 8, se proporciona el rendimiento de clasificación para estas combinaciones en el grupo de entrenamiento y de prueba, en base a una especificidad del 90%. Los resultados de la Tabla 8 muestran claramente, que por la combinación de un marcador adicional la especificidad puede mejorar significativamente en comparación con NNMT como marcador único sin pérdida de sensibilidad.

Tabla 8: Combinaciones de marcadores en una sensibilidad del 90%.

Combinación	Sens. Entrenamiento [log]	Espec. Entrenamiento [log]	Sens. Prueba [log]	Espec. Prueba [log]
NNMT + FEN1	0,9 (0,89-0,9)	0,69 (0,63-0,76)	0,89 (0,87-0,91)	0,68 (0,66-0,71)
NNMT + FEN1 + ASC	0,9 (0,89-0,9)	0,73 (0,68-0,79)	0,88 (0,85 -0,9)	0,73 (0,7-0,75)
NNMT + FEN1 + ASC + seprasa	0,9 (0,89-0,9)	0,77 (0,72-0,82)	0,88 (0,85-0,9)	0,77 (0,75-0,79)

Con un valor de corte que produce el 90% de especificidad frente al grupo de control, la sensibilidad para un valor de corte para el cribado general con NNMT es del 87,1%, siendo para NNMT + FEN1 del 90,9%, siendo para NNMT + FEN1 + ASC del 91,9% y siendo para NNMT + FEN1 + ASC + seprasa del 93,1% (la combinación de 4 marcadores no se muestra en la Fig. 8). Una representación gráfica de los resultados de marcador NNMT y combinaciones de marcadores para un máximo de 3 marcadores se muestra en la Fig. 8 como curvas características de un operador receptor (ROC).

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120> NNMT como marcador para la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

<130> 27348 WO-TH  
<150> PE11157919.9

<151> 2011 -03-11

<160> 7

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 195

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<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

15



ES 2 583 084 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  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

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

10

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

5

<400> 3  
 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

10

ES 2 583 084 T3

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

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  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

5

10

ES 2 583 084 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 2 583 084 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

ES 2 583 084 T3

<210> 5  
 <211> 318  
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

```

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
  
```

ES 2 583 084 T3

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

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

5

<210> 6  
 <211> 760  
 <212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 583 084 T3

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



ES 2 583 084 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 2 583 084 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 2 583 084 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

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

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

ES 2 583 084 T3

	115					120						125			
Thr	Ala	Ser	Tyr	Asp	Ile	Tyr	Asp	Leu	Asn	Lys	Arg	Gln	Leu	Ile	Thr
	130					135					140				
Glu	Glu	Arg	Ile	Pro	Asn	Asn	Thr	Gln	Trp	Val	Thr	Trp	Ser	Pro	Val
145					150					155					160
Gly	His	Lys	Leu	Ala	Tyr	Val	Trp	Asn	Asn	Asp	Ile	Tyr	Val	Lys	Ile
				165					170					175	
Glu	Pro	Asn	Leu	Pro	Ser	Tyr	Arg	Ile	Thr	Trp	Thr	Gly	Lys	Glu	Asp
			180					185					190		
Ile	Ile	Tyr	Asn	Gly	Ile	Thr	Asp	Trp	Val	Tyr	Glu	Glu	Glu	Val	Phe
		195					200					205			
Ser	Ala	Tyr	Ser	Ala	Leu	Trp	Trp	Ser	Pro	Asn	Gly	Thr	Phe	Leu	Ala
	210					215					220				
Tyr	Ala	Gln	Phe	Asn	Asp	Thr	Glu	Val	Pro	Leu	Ile	Glu	Tyr	Ser	Phe
225					230					235					240
Tyr	Ser	Asp	Glu	Ser	Leu	Gln	Tyr	Pro	Lys	Thr	Val	Arg	Val	Pro	Tyr
				245					250					255	
Pro	Lys	Ala	Gly	Ala	Val	Asn	Pro	Thr	Val	Lys	Phe	Phe	Val	Val	Asn
			260					265					270		
Thr	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Asn	Ala	Thr	Ser	Ile	Gln	Ile	Thr
		275					280					285			
Ala	Pro	Ala	Ser	Met	Leu	Ile	Gly	Asp	His	Tyr	Leu	Cys	Asp	Val	Thr
	290					295					300				
Trp	Ala	Thr	Gln	Glu	Arg	Ile	Ser	Leu	Gln	Trp	Leu	Arg	Arg	Ile	Gln
305					310					315					320
Asn	Tyr	Ser	Val	Met	Asp	Ile	Cys	Asp	Tyr	Asp	Glu	Ser	Ser	Gly	Arg
				325					330					335	
Trp	Asn	Cys	Leu	Val	Ala	Arg	Gln	His	Ile	Glu	Met	Ser	Thr	Thr	Gly
			340					345					350		
Trp	Val	Gly	Arg	Phe	Arg	Pro	Ser	Glu	Pro	His	Phe	Thr	Leu	Asp	Gly
		355					360					365			

ES 2 583 084 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

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

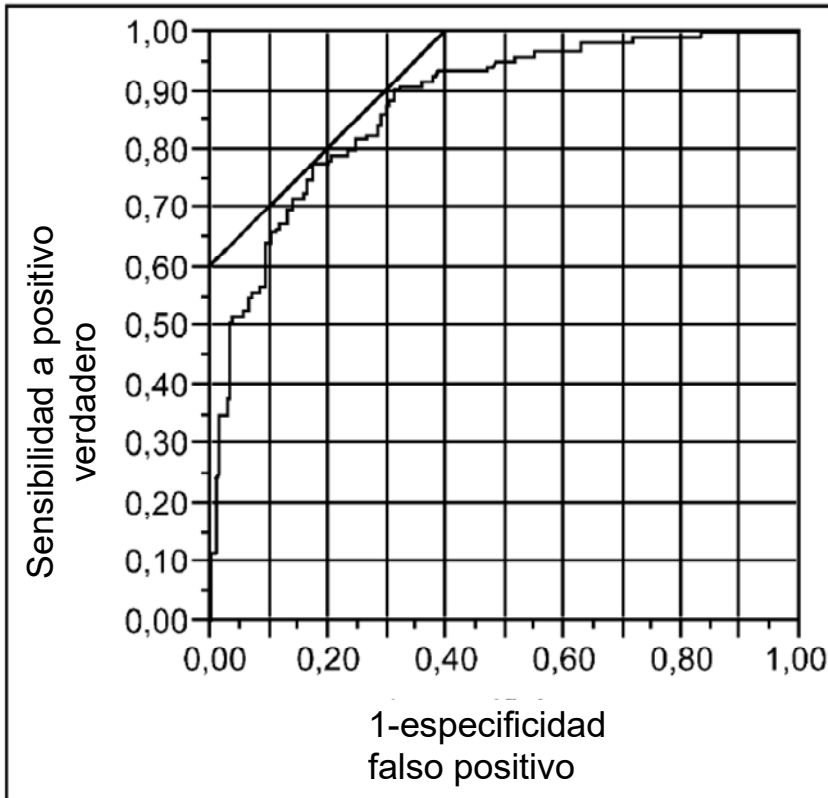
Asp Glu Asp His Gly Ile Ala Ser Ser Thr Ala His Gln His Ile Tyr  
740 745 750

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

**REIVINDICACIONES**

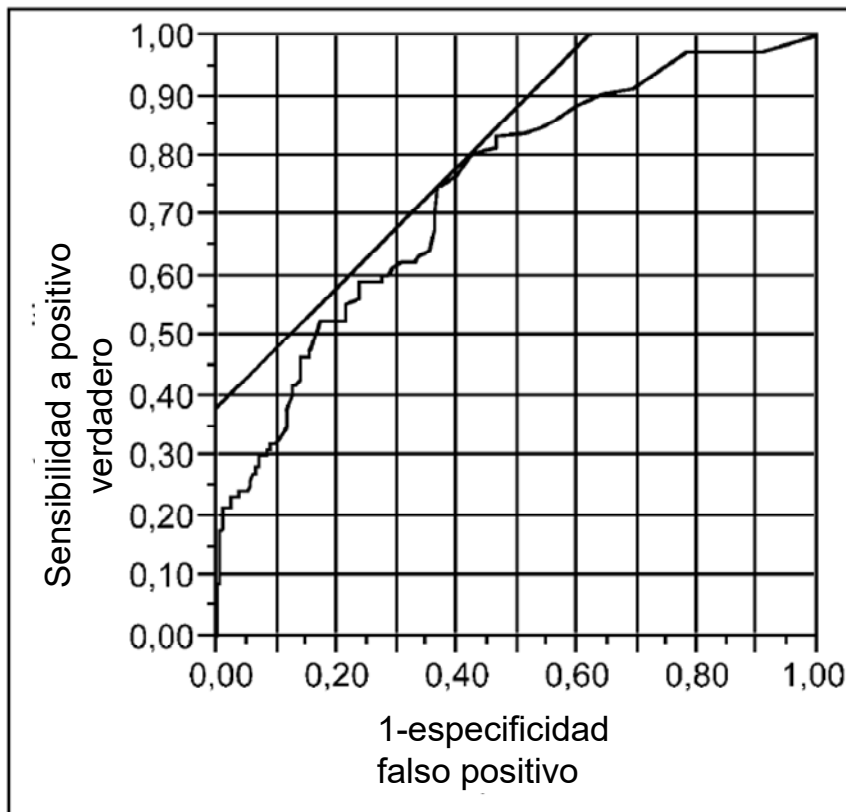
- 5 1. Un método *in vitro* para diferenciar la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) del asma en un sujeto humano, que comprende a) determinar la concentración de la proteína NNMT en una muestra de suero, plasma o sangre completa, y b) comparar la concentración de la proteína NNMT determinada en el paso (a) con una de la proteína NNMT, en la que la concentración de proteína NNMT por encima de la concentración de referencia es indicativa de EPOC.
- 10 2. El método 1, en el que la proteína NNMT se mide en un procedimiento de inmunoensayo.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el procedimiento de es un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA).
- 15 4. El método de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 3, en el que la NNMT se mide en un formato de ensayo tipo sándwich.
5. El método de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 3, en el que la NNMT se mide en un formato de ensayo competitivo.
- 20 6. la proteína NNMT en la diferenciación *in vitro* de la EPOC del asma en una muestra de suero, plasma o sangre completa, en el que una concentración de la proteína NNMT por encima de la concentración de referencia de la proteína NNMT es indicativa de EPOC.
- 25 7. El uso de un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 para diferenciar la EPOC del asma.

Fig. 1



NNMT (ROC: 88 %)

Fig. 2



CRP (ROC: 74 %)



Fig. 3

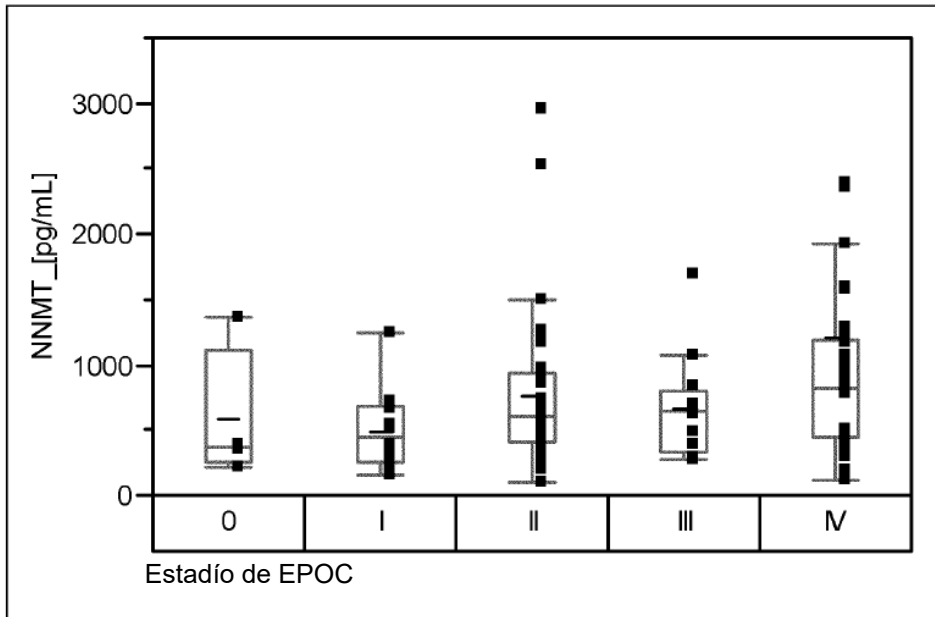
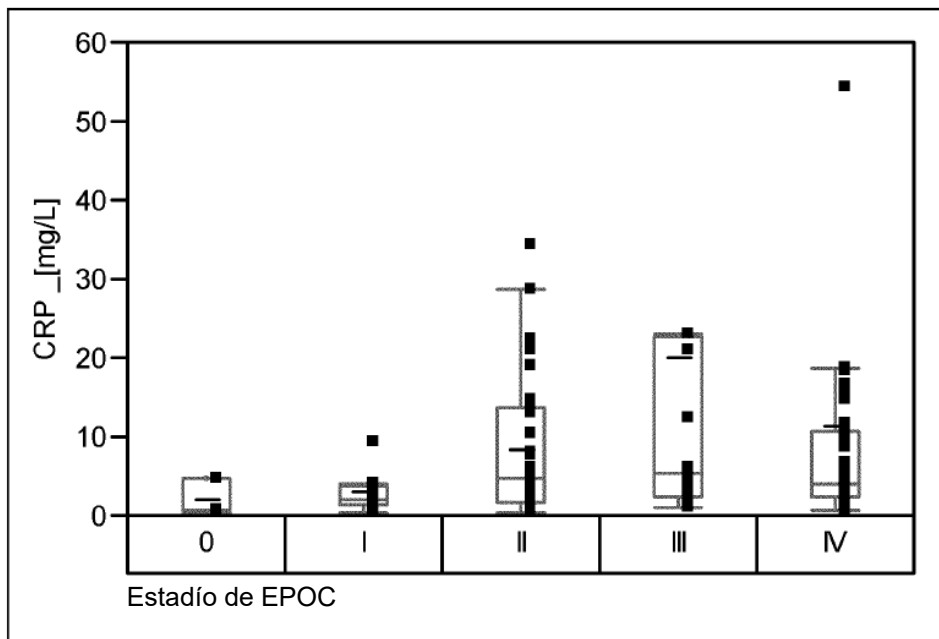
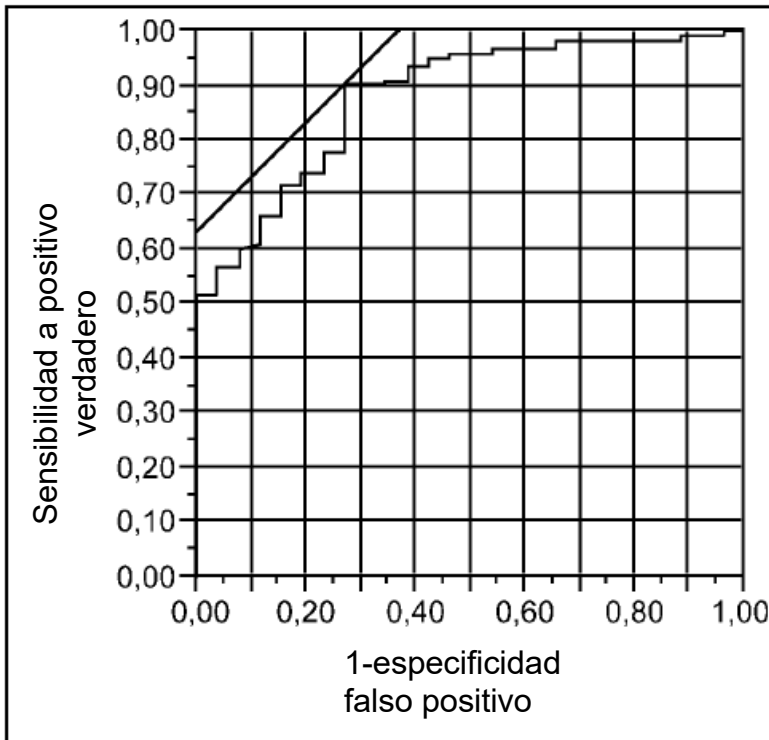


Fig. 4

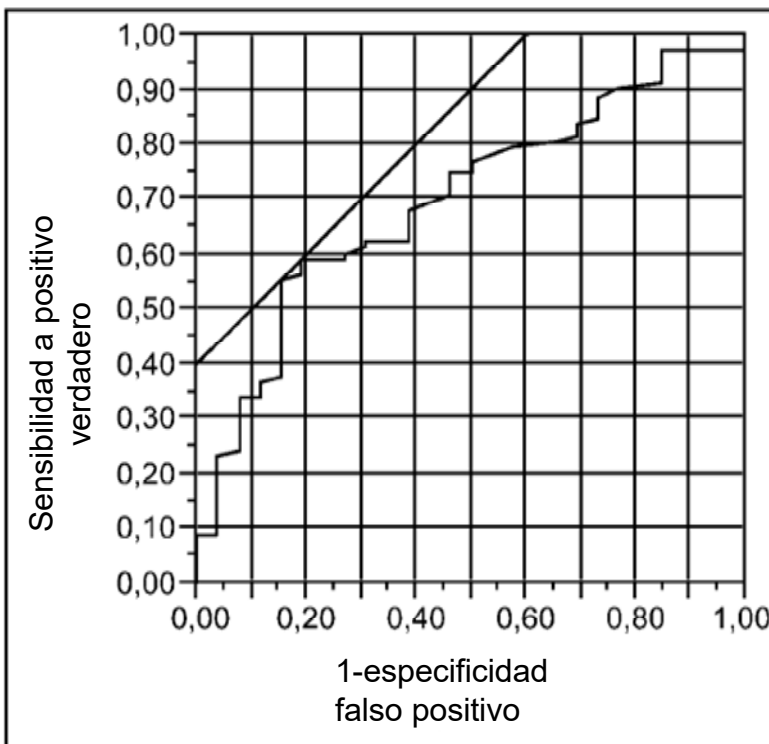


**Fig. 5**



NNMT (ROC: 88 %)

**Fig. 6**



CRP (ROC: 70 %)

Fig. 7

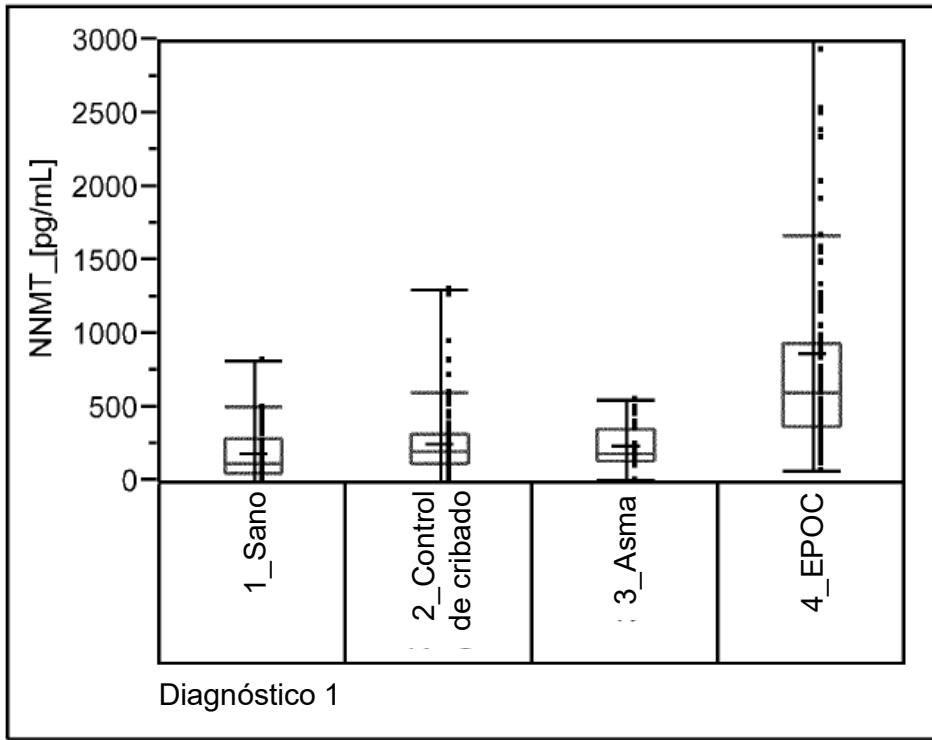


Fig. 8

