

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2013/182725 A1

(43) Fecha de publicación internacional
12 de diciembre de 2013 (12.12.2013) **WIPO | PCT**

- (51) **Clasificación Internacional de Patentes:**
G01N 33/68 (2006.01)
- (21) **Número de la solicitud internacional:**
PCT/ES2013/070364
- (22) **Fecha de presentación internacional:**
5 de junio de 2013 (05.06.2013)
- (25) **Idioma de presentación:** español
- (26) **Idioma de publicación:** español
- (30) **Datos relativos a la prioridad:**
P201230874 5 de junio de 2012 (05.06.2012) ES
- (71) **Solicitantes:** **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avenida de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Avenida María Luisa, s/n, Palacio-Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE SEVILLA** [ES/ES]; Pabellón de Brasil, Paseo de las Delicias, s/n, E-41013 Sevilla (ES).
- (72) **Inventores:** **PAZ-ARES GONZAGA, Luis Gonzalo**; Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **PASTOR HERRERA, María Dolores**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario, Virgen del Rocío, Avenida Manuel Siurot, s/n, E-41013 Sevilla (ES). **MOLINA PINELO, Sonia**; Instituto de Biomedicina de Sevilla, Campus Hospital Universitario, Virgen del Rocío, Avenida Manuel Siurot, s/n (ES). **CARNERO MOYA, Amancio**; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida María Luisa, s/n, Palacio-Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (ES). **SALINAS, Ana**; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida María Luisa, s/n, Palacio-Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (ES). **BARBOSA DE SOUZA NOGAL, Ana**; Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Avenida María Luisa, s/n, Palacio-Pabellón de Perú, E-41013 Sevilla (PT).
- (74) **Mandatario:** **ILLESCAS TABOADA, Manuel**; C/ Recoletos, 13-5º izda., E-28001 Madrid (ES).
- (81) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) **Estados designados** (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:**
- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
 - antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))
 - con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) **Title:** METHOD FOR OBTAINING DATA THAT ARE USEFUL FOR THE DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND CLASSIFICATION OF PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE (COPD) AND/OR LUNG CANCER

(54) **Título :** MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA (EPOC) Y/O CANCER DE PULMÓN

(57) **Abstract:** The invention describes a method for obtaining data that are useful for the diagnosis, prognosis and classification of individuals with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and/or lung cancer, a diagnostic kit, a device and the uses thereof for the diagnosis, prognosis and classification of patients as a) individuals without COPD or lung cancer, b) individuals with COPD, c) individuals with adenocarcinoma, d) individuals with COPD and adenocarcinoma, or e) individuals with COPD and squamous cell carcinoma.

(57) **Resumen:** La invención describe un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o cáncer de pulmón, kit de diagnóstico, dispositivo y sus usos para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los pacientes en a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón, b) individuos con EPOC, c) individuos con adenocarcinoma, d) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o e) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

WO 2013/182725 A1

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o cáncer de pulmón.

5

La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología molecular y la medicina, y se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos en:

- individuos que no presentan ni EPOC ni cáncer de pulmón
- 10 - individuos con EPOC
- individuos con adenocarcinoma
- individuos con carcinoma escamoso
- individuos con EPOC y adenocarcinoma.
- individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

15

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El cáncer de pulmón (CP) es la causa más comúnmente asociada a las muertes relacionadas con cáncer en todo el mundo, se le atribuyen más de 1,3 millones de muertes cada año, representa el 12,7% de los casos de cáncer nuevos. Esta neoplasia se divide en dos grandes grupos de acuerdo a sus características clínico-patológicas: el cáncer de pulmón de células pequeñas o microcítico (*small-cell lung carcinoma* SCCP) y el cáncer de pulmón no microcítico (*non-small-cell lung carcinoma* NSCCP ó CPNM). Aproximadamente entre el 75-85% de los casos de CP pertenecen al grupo de los no microcíticos. Histológicamente, el cáncer de pulmón no microcítico está subdividido en dos categorías principales. El carcinoma de células escamosas (*squamous cell lung carcinoma* SCC), también conocido como carcinoma epidermoide, que generalmente surge en el epitelio bronquial. El adenocarcinoma que por lo general aparece en las vías aéreas periféricas y en los alvéolos. Las opciones terapéuticas disponibles hasta el momento para el tratamiento del cáncer de pulmón (CP), incluyen la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia, las cuales pueden utilizarse por separado o en diferentes combinaciones. Sin embargo, a pesar de todos los avances que se han realizado, la tasa de supervivencia a 5 años para este tipo de tumor no supera el 15%.

35

El principal factor de riesgo para el desarrollo del CP es el hábito tabáquico. Aproximadamente entre el 85-90% de los casos de CP son causados por este hábito. Por otro lado, el consumo de tabaco también es responsable del desarrollo de otras enfermedades tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). La

5 Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que 3 millones de personas mueren de EPOC al año. Al igual que sucede con el CP, no todos los fumadores desarrollan EPOC. Sin embargo, alrededor del 50% de los fumadores terminan desarrollando EPOC. Además la EPOC incrementa el riesgo relativo de cáncer de pulmón entre dos y seis veces. Diversos estudios sugieren que la inflamación podría ser uno de los

10 principales procesos implicados en la patogénesis de ambas enfermedades. Mediando este proceso podrían estar participando en gran medida la amplia familia de las citoquinas.

Las citoquinas son un diverso grupo de proteínas que incluyen citoquinas pro-inflamatorias, citoquinas derivadas de las células T, citocinas quimiotácticas

15 (quimiocinas) de eosinófilos, neutrófilos, monocitos/macrófagos y células T, citoquinas anti-inflamatorias y diversos factores de crecimiento. Varios estudios realizados en pacientes diagnosticados de EPOC, revelan que existe un aumento de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias y quimiocinas (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-13, IP-10, INF- γ ,

20 MCP-1 y TNF- α) en muestras obtenidas mediante inducción de esputo en comparación con los controles sanos. Siguiendo esta línea, el factor de necrosis tumoral α -(TNF- α) y los receptores solubles del TNF, se incrementan en el esputo de los pacientes con EPOC en comparación con los fumadores sanos.

25 Por otro lado, los estudios en cáncer de pulmón ponen de manifiesto el papel de las citoquinas en esta patología correlacionándose con los estudios en EPOC. Por ejemplo, los estudios de polimorfismos revelan que existen polimorfismos específicos en los genes IL-1A y 1B que aumentan el riesgo de CP, especialmente entre los sujetos de mayor edad y con un historial de tabaquismo importante.

30 A pesar de los trabajos realizados en este campo, los resultados obtenidos, son insuficientes para explicar el papel que la inflamación juega en ambas patologías, así como cuales son los posibles mecanismos que comparten y cuales son independientes de cada una, en este sentido se han analizado diversos marcadores

35 inflamatorios tanto en CP como en EPOC de manera independiente Sin embargo aún

es necesario encontrar un método alternativo de predicción, diagnóstico, y/o pronóstico, que permita la subclasificación de los individuos afectados por cáncer de pulmón y/o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han analizado los miembros de la familia de las citoquinas y de los factores de crecimiento en el lavado broncoalveolar (LAB) de los pacientes con EPOC, con adenocarcinoma, con carcinoma escamoso, con EPOC y adenocarcinoma simultáneamente, y pacientes con EPOC y cáncer de células escamosas. Adicionalmente, han validado los resultados para IL-11 y CCL-1, encontrando que ambos podrían ser biomarcadores predictivos del adenocarcinoma y podría mejorar el diagnóstico temprano de adenocarcinoma de pulmón en los fumadores de alto riesgo, a independientemente de la presencia o ausencia de la EPOC.

La presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos con dichas enfermedades.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de entre IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, VEGF o cualquiera de sus combinaciones, para la predicción, diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos en:

- a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón,
- b) individuos con EPOC,
- c) individuos con adenocarcinoma,
- d) individuos con carcinoma escamoso,
- e) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o
- f) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso simultáneo de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de la lista que consiste en IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1,

IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, y VEGF, para la predicción, diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos en:

- a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón,
- b) individuos con EPOC,
- 5 c) individuos con adenocarcinoma,
- d) individuos con carcinoma escamoso,
- e) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o
- f) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

10 Una realización preferida se refiere al uso de IGFBP1, MIP1 β , CCL-1, MIG, PDGFAA, GDF-15, VEGF y EGF para la predicción, diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos en:

- a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón,
- b) individuos con EPOC,
- 15 c) individuos con adenocarcinoma,
- d) individuos con carcinoma escamoso,
- e) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o
- f) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

20 A partir de los ejemplos de la presente invención se pone de manifiesto una correlación entre los niveles de expresión elevados de IL-11 con la proliferación celular, invasividad, metástasis y mal pronóstico. Además, IL-11 y CCL-1 mostraron diferencias de expresión estadísticamente significativas en los pacientes con adenocarcinoma en comparación con los restantes grupos de pacientes.

25 Por tanto, otra realización preferida se refiere al uso de IL-11 y/o CCL-1 para predecir o pronosticar, o para el diagnóstico temprano de adenocarcinoma de pulmón en un individuo. En una realización más preferida, el individuo es fumador.

30 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles, de ahora en adelante primer método de la invención, para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los pacientes en a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón, b) individuos con EPOC, c) individuos con EPOC y cáncer de pulmón, c) Individuos con adenocarcinoma, d) individuos con carcinoma escamosos e) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o f) individuos con EPOC y carcinoma escamoso, que comprende:

35

- i) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
- ii) cuantificar el producto de expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de la lista que consiste en: IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, y VEGF o cualquiera de sus combinaciones.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, y VEGF se cuantifica de manera simultánea.

En otra realización preferida, el método de la invención además comprende:

- iii) comparar las cantidades obtenidas en el paso (ii) con una cantidad de referencia.
- La cantidad de referencia se obtiene a partir de los valores de expresión constitutiva del/los genes para las citoquinas o los factores de crecimiento, en un grupo de pacientes sanos o, preferentemente, que no presentan EPOC ni cáncer de pulmón.

Más preferiblemente, el primer método de la invención comprende cuantificar simultáneamente los productos de expresión de IGFBP1, MIP1 β , CCL-1, MIG, PDGFAA, GDF-15, VEGF y EGF.

Los pasos (ii) y/o (iii) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (ii) o la comparación computerizada en el paso (iii).

Una "muestra biológica aislada" incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (i) es el lavado o el fluido o lavado broncoalveolar (LAB).

El término "individuo", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "individuo" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

La detección la cantidad de IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, VEGF puede realizarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. Los autores de la presente invención han demostrado que la detección de la cantidad o la concentración
5 de anticuerpos frente a estas citoquinas y factores de crecimiento de manera semi-cuantitativa o cuantitativa permiten diferenciar entre los diferentes tipos histológicos del cáncer de pulmón. De esta manera, se puede establecer un diagnóstico diferencial en individuos afectados por las enfermedades mencionadas, que permite subclasificarlos.

10 La medida de la cantidad o la concentración de estas citoquinas y factores de crecimiento, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa, puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de expresión de los genes, basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes, o de las
15 proteínas, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de RNA o de proteínas producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente
20 secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de los productos de expresión de los genes o
25 de los anticuerpos, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con los mismos o que pueda derivarse de éstos. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de dichos productos de expresión obtenidos mediante medida directa. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos
30 obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de los productos de expresión de los genes o
35 de la cantidad de anticuerpos frente a IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2,

PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, VEGF de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de los productos de expresión de los genes o con una cantidad de anticuerpos frente a IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, VEGF de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (iii) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

10

El término “producto de expresión”, también denominado “producto génico” se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen.

15

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad absoluta o relativa (al gen de referencia) de productos de expresión de los genes o de anticuerpos frente a IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFRII, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, VEGF que permite discriminar entre a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón, b) individuos con EPOC. c) individuos con adenocarcinoma, d) individuos con carcinoma escamoso, e) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o f) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

20

25

Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no padecen ninguna de estas enfermedades.

30

La forma soluble del receptor de la interleukina 6 (IL-6sR), con un peso molecular de aproximadamente 50k Da se ha encontrado en la orina de humanos adultos (Novick, D. et al. (1989) J. Exp. Med. 170:1409), en medios de cultivo condicionados por el crecimiento de la línea celular del mieloma humano (Nakajima, T. et al. (1992) Jpn. J.

35

Cancer Res. 83:373), en los sobrenadantes de cultivo de PBMC humanos PHA-estimulados y de líneas celulares T HTLV-1-positivas (Honda, M. et al. (1992) J. Immunol. 148:2175), y en el suero de donantes de sangre HIV-seropositivos (Honda, M. et al. (1992) J. Immunol. 148:2175). Esta forma soluble del receptor aparentemente surge de la ruptura proteolítica del enlace de membrana de IL-6 R. Su secuencia aminoacídica se encuentra con número de acceso en el GenBank (NCBI) NP_000556.1y /o la SEQ ID NO: 2.

En el contexto de la presente invención, IL-6sR se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 2, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 2,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 2, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína IL-6sR. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_000565.3o SEQ ID NO: 1.

El gen IL-1a ó interleukin 1, alpha (L-1A, IL1, IL1-ALPHA, IL1F1, IL-1 alpha; hematopoyetin-1; interleukin-1 alpha; preinterleukin 1 alpha; pro-interleukin-1-alpha), se encuentra en el cromosoma 2 (2q14) y codifica para una proteína que es miembro de la familia de citocinas interleucina 1. Es una citoquina pleiotrópica involucrada en varias respuestas inmunológicas, procesos inflamatorios, y hematopoyesis. Esta citoquina es producida por monocitos y macrófagos a proproteína, que es proteolíticamente procesada y liberada en respuesta del daño celular, e induce apoptosis. Este gen y otros 8 genes de la familia interleucina 1 forman un cluster genético en el cromosoma 2. Se ha sugerido que el polimorfismo de estos genes está asociado con la artritis reumatoide y la enfermedad de Alzheimer.

En el contexto de la presente invención, IL-1a se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 4, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 4,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 4, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína IL-6sR. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM 000575.3 o SEQ ID NO: 3.

El gen IL-11 ó interleukin 11 (AGIF; IL-11), se encuentra en el cromosoma 19 (19q13.3-q13.4). codifica para una proteína que es miembro de la familia de citocinas gp130. Estas citoquinas dirigen el ensamblamiento de complejos receptores con multisubunidades.

En el contexto de la presente invención, IL-11 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 6, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 6,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 6, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína IL-11. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_000641.2 o SEQ ID NO: 5.

El gen CCL-1 ó *chemokine (C-C motif) ligand 1* (-309, P500, SCYA1, SISE, TCA3, C-C motif chemokine 1; T lymphocyte-secreted protein I-309; inflammatory cytokine I-309; small inducible cytokine A1 (I-309, homologous to mouse Tca-3); small-inducible cytokine A1), se encuentra en el cromosoma 17 (17q12) y codifica para una proteína
5 que es miembro de la familia de citokinas relacionadas con la subfamilia de citoquinas CXC, caracterizada por dos cisteínas separadas por un único aminoácido. Esta citoquina es secretada por las células T activadas y muestra actividad quimiotáctica para los monocitos pero no para los neutrófilos. Se une al receptor de quimioquinas CCR8.

10

En el contexto de la presente invención, CCL-1, se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 8, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la
15 secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 8,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

20 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 8, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína CCL-1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la
25 secuencia del GenBank (NCBI) NM_002981.1 o SEQ ID NO: 7.

El gen EOTAXIN-2 ó *chemokine (C-C motif) ligand 24* (CCL24, Ckb-6, MPIF-2, MPIF2, SCYA24, C-C motif chemokine 24; CK-beta-6; eosinophil chemotactic protein 2; myeloid progenitor inhibitory factor 2; small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys),
30 member 24; small-inducible cytokine A24), se encuentra en el cromosoma 17 (17q11.23) y codifica para una proteína que es miembro de la familia de citokinas pequeñas CC. Las citoquinas CC están caracterizadas por dos cisteínas adyacentes. La citoquina codificada por este gen muestra actividad quimiotáctica frente a los linfocitos T, una actividad mínima en neutrófilos, y no muestra actividad para linfocitos

T activados. La proteína es además un fuerte supresor de la formación de colonias por líneas celulares de progenitores hematopoyéticos multipotenciales.

5 En el contexto de la presente invención, EOTAXIN-2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 10, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 10,
- 10 b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la
- 15 secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 10, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína CCL-1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_002991.2 o SEQ ID NO: 9.

20

El gen PDGFAA ó *platelet-derived growth factor alpha polypeptide* (PDGF-A, PDGF1, DGF A-chain; PDGF subunit A; PDGF-1; platelet-derived growth factor A chain; platelet-derived growth factor alpha chain; platelet-derived growth factor alpha isoform 2 preproprotein; platelet-derived growth factor subunit A), se encuentra en el

25 cromosoma 7 (7p22) y codifica para una proteína que es miembro de la familia de los factores de crecimiento derivados de plaquetas. Los cuatro miembros de esta familia son factores mitogénicos para células de origen mesenquimal y se caracterizan por un motivo de ocho cisteínas. El producto del gen puede existir tanto como homodímero o como heterodímero con el polipéptido beta del factor de crecimiento derivado de

30 plaquetas, donde los dímeros están conectados por puentes disulfuro. Se han identificado dos variantes de splicing para este gen.

En el contexto de la presente invención, PDGFA se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína

35 recogida en la SEQ ID NO: 12, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 12,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- 5 c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 12, y en las que el polipéptido codificado por dichos
- 10 ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína PDGFA. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_002607.5 o SEQ ID NO: 11.

El gen TNFR1 ó *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A* (TNFRSF1A, CD120a, FPF, MGC19588, TBP1, TNF-R, TNF-R-I, TNF-R55, TNFAR, TNFR1, TNFR55, TNFR60, p55, p55-R, p60, TNF-R1; TNF-R1; TNFR-I; tumor necrosis factor binding protein 1; tumor necrosis factor receptor 1A isoform beta; tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A; tumor necrosis factor receptor type 1; tumor necrosis factor-alpha receptor), se encuentra en el cromosoma 12 (12p13.2) y codifica para una

20 proteína que es miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento derivados de plaquetas. Los cuatro miembros del receptor TNF, Es uno de los principales receptores para el factor de necrosis tumoral alfa. Este receptor puede activar NF-kappaB, mediar apoptosis, y funcionar como un regulador de la inflamación. La proteína antiapoptótica BAG4/SODD y las proteínas TRADD y TRAF2 se han visto que

25 interactúan con este receptor, y por tanto juegan un papel en la transducción de la señal mediada por receptor.

En el contexto de la presente invención, TNFR1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 14, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

30 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 14,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 14, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína TNFR1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_001065.3 o SEQ ID NO: 13.
- 10 El gen TNFR2 ó *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B* (TNFRSF1B, CD120b, TBPII, TNF-R-II, TNF-R75, TNFR, TNFR1B, TNFR2, TNFR80, p75, p75TNFR, TNF-R2; TNF-RII; p75 TNF receptor; p80 TNF-alpha receptor; soluble TNFR1B variant 1; tumor necrosis factor beta receptor; tumor necrosis factor binding protein 2; tumor necrosis factor receptor 2; tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B; tumor necrosis factor receptor type II), se encuentra en el cromosoma 1 (1p36.22) y codifica para una proteína que es miembro de la superfamilia de los receptores TNF. Esta proteína y el TNF-receptor 1 forman un heterocomplejo que media el reclutamiento de dos proteínas apoptóticas, c-IAP1 y c-IAP2, que poseen actividad E3 ubiquitin ligasa.
- 20 En el contexto de la presente invención, TNFR2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 16, y que comprendería diversas variantes procedentes de:
- 25 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 16,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- 30 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 16, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína TNFR2. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la
- 35 secuencia del GenBank (NCBI) NM_001066.2 o SEQ ID NO: 15.

El gen EGF ó *epidermal growth factor* (HOMG4, URG, beta-urogastrone; pro-epidermal growth factor), se encuentra en el cromosoma 4 (4q25) codifica para una proteína que es miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento epidérmicos.

5

En el contexto de la presente invención, EGF se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 18, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

10 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 18,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

15 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 18, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína EGF. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la
20 secuencia SEQ ID NO: 17.

El gen MIP-1B ó *chemokine (C-C motif) ligand 4* (CCL4, CT2, AT744.1, G-26, HC21, LAG-1, LAG1, MGC104418, MGC126025, MGC126026, MIP-1-beta, MIP1B, MIP1B1, SCYA2, SCYA4, C-C motif chemokine 4; CC chemokine ligand 4; G-26 T-lymphocyte-
25 secreted protein; MIP-1-beta(1-69); PAT 744; SIS-gamma; T-cell activation protein 2; lymphocyte activation gene 1 protein; lymphocyte-activation gene 1; macrophage inflammatory protein 1-beta; secreted protein G-26; small inducible cytokine A4 (homologous to mouse Mip-1b); small-inducible cytokine A4), se encuentra en el cromosoma 17 (17q12).

30

En el contexto de la presente invención, MIP-1B se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 20, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

35 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 20,

- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,
- 5 d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 20, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MIP-1B. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la
- 10 secuencia del GenBank (NCBI) NM_002984.2 o SEQ ID NO: 19.

El gen MIG ó *chemokine (C-X-C motif) ligand 9* (CXCL9, CMK, Humig, MIG, SCYB9, crg-10, C-X-C motif chemokine 9; gamma-interferon-induced monokine; monokine induced by gamma interferon; monokine induced by interferon-gamma; small-inducible

15 cytokine B9), se encuentra en el cromosoma 4 (4q21).

En el contexto de la presente invención, MIG se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 22, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

- 20 a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 22,
- b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),
- c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la
- 25 degeneración del código genético,
- d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 22, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína
- 30 MIG. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_002416.1 o SEQ ID NO: 21.

El gen MCP-1 ó *chemokine (C-C motif) ligand 2* (CCL2, GDCF-2, HC11, HSMCR30, MCAF, MCP-1, MCP1, MGC9434, SCYA2, SMC-CF, C-C motif chemokine 2;

35 monocyte chemoattractant protein 1; monocyte chemoattractant protein-1; monocyte

chemotactic y activating factor; monocyte chemotactic protein 1; monocyte secretory protein JE; small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1, homologous to mouse Sig-je); small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 2; small-inducible cytokine A2), se encuentra en el cromosoma 17 (17q11.2-q12).

5

En el contexto de la presente invención, MCP-1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 24, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

10

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 24,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

15

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 24, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína MCP-1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la

20

secuencia del GenBank (NCBI) NM_002982.3 o SEQ ID NO: 23.

El gen IGFBP2 ó *Insulin-like growth factor binding protein 2* (IBP2, IGF-BP53, IBP-2; IGF-binding protein 2; IGFBP-2; insulin-like growth factor-binding protein 2), se encuentra en el cromosoma 2 (2q33-q34).

25

En el contexto de la presente invención, IGFBP2 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 26, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

30

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 26,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 26, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína IGFBP2. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_000597.2 o SEQ ID NO: 25.

El gen IGFBP1 ó *insulin-like growth factor binding protein 1* (IGFBP1, AFBP, IBP1, IGF-BP25, PP12, hIGFBP-1, BP-1; IGF-binding protein 1; IGFBP-1; alpha-pregnancy-associated endometrial globulin; amniotic fluid binding protein; binding protein-25; binding protein-26; binding protein-28; growth hormone independent-binding protein; insulin-like growth factor-binding protein 1; placental protein 12), se encuentra en el cromosoma 7 (7p13-p12).

En el contexto de la presente invención, IGFBP1 se define también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 28, y que comprendería diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 28,

b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia polinucleotídica de a),

c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la degeneración del código genético,

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 28, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína IGFBP1. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_000596.2 o SEQ ID NO: 27.

El gen GDF-15 ó *growth differentiation factor 15* (GDF-15, MIC-1, MIC1, NAG-1, PDF, PLAB, PTGFB, NRG-1; NSAID (nonsteroidal anti-inflammatory drug)-activated protein 1; NSAID-activated gene 1 protein; NSAID-regulated gene 1 protein; PTGF-beta; growth/differentiation factor 15; macrophage inhibitory cytokine 1; placental TGF-beta;

placental bone morphogenetic protein; prostate differentiation factor), se encuentra en el cromosoma 19 (19p13.11).

En el contexto de la presente invención, GDF-15 se define también por una secuencia
5 de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína
recogida en la SEQ ID NO: 30, y que comprendería diversas variantes procedentes de:
a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la
secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 30,
b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia
10 polinucleotídica de a),
c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la
degeneración del código genético,
d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la
secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un
15 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 30, y en las que el polipéptido codificado por dichos
ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína
GDF-15. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la
secuencia del GenBank (NCBI) NM_004864.2 o SEQ ID NO: 29.

20 El gen VEGFA ó *vascular endothelial growth factor A* (RP1-261G23.1, MGC70609,
MVCD1, VEGF, VPF, vascular permeability factor), se encuentra en el cromosoma 6
(6p12).

En el contexto de la presente invención, VEGF se define también por una secuencia
25 de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína
recogida en la SEQ ID NO: 32, y que comprendería diversas variantes procedentes de:
a) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la
secuencia aminoacídica de la SEQ ID NO: 32,
b) moléculas de ácido nucleico cuya cadena complementaria híbrida con la secuencia
30 polinucleotídica de a),
c) moléculas de ácido nucleico cuya secuencia difiere de a) y/o b) debido a la
degeneración del código genético,
d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la
secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un
35 98% o un 99% con la SEQ ID NO: 32, y en las que el polipéptido codificado por dichos

ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de la proteína VEGF. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM_001025366.2 o SEQ ID NO: 31.

- 5 En otra realización preferida, la detección de la cantidad de cualquiera de IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFR2, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, VEGF se realiza mediante un inmunoensayo. El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con
- 10 un antígeno. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo lineal (LIA), radioinmunoensayo (RIA), inmunofluorescencia, x-map o *chips* de proteína.
- 15 En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador.
- 20 Existen diferentes tipos de ELISA: ELISA directo, ELISA indirecto o ELISA sándwich.

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la

25 cantidad de anticuerpos frente a IL-6sR, IL-1a, IL-11, CCL-1, EOTAXIN-2, PDGFAA, TNFRI, TNFR2, EGF, MIP-1B, MIG, MCP-1, IGFBP2, IGFBP1, GDF-15, VEGF. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al

30 anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como ^{32}P o ^{35}S , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (i)-(iii) según el primer método de la invención, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón, cuando no presenta expresión de los genes *IGFBP1*, *MIP1 β* , *CCL-1*, *MIG* y *PDGFAA*.

En una realización preferida, el segundo método de la invención comprende los pasos (i)-(iii) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con adenocarcinoma, cuando presenta un aumento del producto de expresión de los genes *IL-11* y/o *CCL-1*, en relación a una cantidad de referencia.

En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende los pasos (i)-(iii) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con EPOC cuando se detecta la expresión de *MIG*, y no se detecta la expresión de *CCL-1* e *IGFBP1*.

En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende los pasos (i)-(iii) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con adenocarcinoma cuando se detecta la expresión de *CCL-1*, y la cantidad de expresión de *MIP1 β* es menor de 25 pg/ml, más preferiblemente menor de 22 pg/ml, y aún más preferiblemente, menor a 20 pg/ml.

En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende los pasos (i)-(iii) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con carcinoma escamoso cuando se detecta la expresión de *PDGFAA* o *MIP1 β* a cualquier nivel, y no se detecta la expresión de *CCL-1*.

En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende los pasos (i)-(iii) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con EPOC y adenocarcinoma cuando se detecta la expresión de *CCL-1* a cualquier nivel, y la expresión de *VEGF* es menor de

240 pg/ml, más preferiblemente menor de 220 pg/ml, y aún más preferiblemente menor de 200 pg/ml.

5 En otra realización preferida, el segundo método de la invención comprende los pasos (i)-(iii) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con EPOC y carcinoma escamoso cuando se detecta la expresión de *GDF-15* superior a 40 pg/ml, y más preferiblemente superior a 50 pg/ml y de *VEGF* superior a 180 pg/ml, y más preferiblemente y a 200 pg/ml respectivamente, y no se detecta la expresión de *CCL-1* ni *EGF*.

10

Actualmente no existe cura para la EPOC, sin embargo, es una enfermedad prevenible y tratable. Para el tratamiento de la EPOC, las estrategias más empleadas son dejar de fumar, rehabilitación y terapia farmacológica (a menudo el uso de inhaladores). Algunos pacientes van a requerir tratamiento a largo plazo de oxígeno o un trasplante de pulmón.

15

Así, los broncodilatadores son medicamentos que relajan el músculo liso de las vías respiratorias, lo que aumenta el calibre de las vías respiratorias y mejorar el flujo de aire, reduciendo los síntomas de falta de aliento, etc, resultando en una mejor calidad de vida de las personas con EPOC. Sin embargo, no disminuyen la velocidad de progresión de la enfermedad subyacente. Los broncodilatadores son por lo general administra con un inhalador oa través de un nebulizador.

20

Hay dos tipos principales de broncodilatadores, los agonistas β_2 y los anticolinérgicos. Los anticolinérgicos parecen ser superiores a los agonistas beta2 en la EPOC. Los anticolinérgicos reducen las muertes por causas respiratorias, mientras que los agonistas β_2 no tienen ningún efecto sobre la mortalidad por enfermedades respiratorias. Cada tipo puede ser de larga duración (con un efecto que dura 12 horas o más) o de acción corta (con un inicio rápido del efecto que no dura largo tiempo).

30

Agonistas β_2

Los agonistas β_2 estimulan los receptores en el músculo liso bronquial, haciendo que se relaje. Hay varios β_2 agonistas disponibles. El salbutamol (nombre de marca común: Ventolin) y la terbutalina son ampliamente utilizados como agonistas β_2 de

35

acción corta, proporcionando un alivio rápido de los síntomas de la EPOC. Los agonistas β_2 de acción prolongada (ABAP) como el salmeterol y el formoterol se utilizan como terapia de mantenimiento, y su uso conlleva una mejor circulación de aire, mejora en la capacidad de hacer ejercicio, y en la calidad de vida.

5

Los anticolinérgicos

Los fármacos anticolinérgicos relajan las vías respiratorias mediante el bloqueo de la estimulación de los nervios colinérgicos. El Ipratropio proporciona acción corta y alivio rápido de los síntomas de la EPOC. El tiotropio es un anticolinérgico de acción prolongada, cuyo uso regular se asocia con mejoras en el flujo de aire, la capacidad de ejercicio, y la calidad de vida. El ipratropio se asocia con morbilidad cardiovascular.

10

Los corticosteroides

Los corticosteroides se utilizan en forma de tableta o inhalada para tratar y prevenir las manifestaciones agudas de la EPOC. Los corticosteroides inhalados (ICS) no han demostrado ser beneficiosos para las personas con EPOC leve, sin embargo, han demostrado que disminuye las exacerbaciones agudas en los individuos con EPOC moderada o grave. Sin embargo, se asocian con mayores tasas de neumonía.

Otros medicamentos

La teofilina es un broncodilatador y un inhibidor de la fosfodiesterasa que en altas dosis puede reducir los síntomas en algunas personas que tienen EPOC. Los efectos secundarios como las náuseas y la estimulación del corazón limitan su uso. Los antagonistas de la fosfodiesterasa-4, roflumilast y cilomilast han completado la Fase 2 de ensayos clínicos. Los antagonistas del factor de necrosis tumoral, como el infliximab, suprimen el sistema inmunológico y reducen la inflamación. Infliximab se ha probado en pacientes con EPOC, pero no hubo evidencia de beneficio.

El cáncer de pulmón

Los tratamientos comunes incluyen cirugía, quimioterapia y radioterapia. El NSCLC (*non-small-cell lung carcinoma*) se trata con cirugía, mientras que el SCLC (*small-cell*

35

lung carcinoma) por lo general responde mejor a la quimioterapia y la radioterapia. Esto es en parte porque a menudo la SCLC se disemina muy temprano, y estos tratamientos son mejores a la hora de llegar a las células cancerosas que se han diseminado a otras partes del cuerpo.

5

Tratamiento de cáncer de pulmón

El tratamiento para el cáncer de pulmón depende del tipo de cáncer, de su diseminación y del estado del paciente. Los tratamientos comunes incluyen los cuidados paliativos, la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia.

10

Cirugía

Si las investigaciones confirman el cáncer de pulmón no microcítico, el escenario debe ser re-evaluado para determinar si la enfermedad está localizada y es susceptible de una cirugía o si se ha diseminado hasta el punto en que no se puede curar con cirugía. Para ello se utiliza la tomografía computarizada y la tomografía por emisión de positrones (PET). Los análisis de sangre y las pruebas de función pulmonar también son necesarios para evaluar si el paciente está lo suficientemente bien para ser operado. Si las pruebas de función pulmonar revelan reserva respiratoria deficiente, la cirugía puede estar contraindicada.

15

20

En la mayoría de los casos de las primeras etapas el cáncer no microcítico de pulmón, la eliminación de un lóbulo del pulmón (lobectomía) es el tratamiento quirúrgico de elección. En los pacientes que no son aptos para una lobectomía total, una pequeña escisión sublobar (resección en cuña) se puede realizar. Sin embargo, la resección en cuña tiene un mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad que la lobectomía. La braquiterapia con yodo radioactivo en los márgenes de resección en cuña puede reducir el riesgo de recurrencia. En raras ocasiones se lleva a cabo la extracción de un pulmón entero (neumonectomía).

25

30

La video-cirugía toracoscópica asistida y la lobectomía videoasistida utilizar un abordaje mínimamente invasivo de la cirugía del cáncer de pulmón. La lobectomía VATS es igualmente eficaz en comparación con la lobectomía abierta convencional, y con menos post-operatorio enfermedad.

35

En el carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC), se utiliza normalmente la quimioterapia y / o la radioterapia. Sin embargo, el papel de la cirugía en el CACP está siendo reconsiderada. La cirugía puede mejorar los resultados cuando se añade a la quimioterapia y la radiación en la etapa temprana.

5

Radioterapia

La radioterapia se administra a menudo junto con la quimioterapia, y pueden ser utilizados con intención curativa en pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas que no son elegibles para la cirugía. Esta forma de radioterapia de intensidad alta se llama radioterapia radical. Un refinamiento de esta técnica es la radioterapia continua hiperfraccionada acelerada, en el que se da una alta dosis de radioterapia en un corto período de tiempo. Para los de células pequeñas, los casos de carcinoma de pulmón que son potencialmente curables, a menudo se recomienda la radiación en el pecho además de la quimioterapia. La radioterapia torácica post-operatoria en general, no se debe utilizar después de la cirugía con intención curativa para el carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

Si el crecimiento del cáncer bloquea una sección corta de los bronquios, la braquiterapia (radioterapia localizada) se puede administrar directamente en el interior de la vía aérea para abrir el paso. [En comparación con la radioterapia externa, la braquiterapia permite una reducción en el tiempo de tratamiento y reducción de exposición a la radiación al personal de salud.

La irradiación craneal profiláctica (PCI) es un tipo de radioterapia en el cerebro, utilizado para reducir el riesgo de metástasis. La PCI es más útil en el carcinoma de pulmón de células pequeñas.

Las recientes mejoras en la orientación y las imágenes han dado lugar al desarrollo de la radiación estereotáctica en el tratamiento de cáncer de pulmón en etapa temprana. En esta forma de la radioterapia, las dosis altas se entregan en un pequeño número de sesiones mediante estereotaxia. Su uso es principalmente en pacientes que no son candidatos a cirugía debido a las comorbilidades médicas.

30

Por tanto, en los pacientes del carcinoma de pulmón de células no pequeñas y de células pequeñas, pueden ser utilizadas dosis menores de radiación en el pecho para el control de síntomas (radioterapia paliativa).

5 *Quimioterapia*

El régimen de quimioterapia depende del tipo de tumor.

Carcinoma de pulmón de células pequeñas

10

Aunque en una etapa relativamente temprana, el carcinoma de células pequeñas de pulmón se trata fundamentalmente con quimioterapia y radiación. En el carcinoma de pulmón de células pequeñas, los quimioterápicos más empleados son el cisplatino y etopósido. También se utilizan sus combinaciones con el carboplatino, gemcitabina, paclitaxel, vinorelbina, topotecan, irinotecan.

15

Carcinoma de pulmón de células no pequeñas

En el carcinoma de pulmón de células no pequeñas avanzado, la quimioterapia mejora la supervivencia y se utiliza como tratamiento de primera línea, siempre y cuando el paciente está lo suficientemente bien como para recibir el tratamiento. Por lo general se utilizan dos medicamentos, uno de los cuales a menudo se basa en platino (cisplatino o carboplatino). Otros fármacos utilizados son la gemcitabina, paclitaxel y el docetaxel.

25

El carcinoma de pulmón de células no pequeñas avanzado es a menudo tratados con cisplatino o carboplatino, en combinación con gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etopósido o vinorelbina. Recientemente también se está empleando el pemetrexed.

30 *La quimioterapia adyuvante*

La quimioterapia adyuvante se refiere al uso de quimioterapia después de la aparentemente cirugía curativa para mejorar el resultado. En el cáncer de pulmón de células no pequeñas, se toman muestras durante la cirugía de los ganglios linfáticos cercanos. Si la fase II o III de la enfermedad se confirma, la quimioterapia adyuvante

35

mejora la supervivencia en un 5% a los 5 años. La combinación de vinorelbina y cisplatino es más efectiva que los antiguos regímenes terapéuticos.

5 La quimioterapia adyuvante para los pacientes con cáncer en estadio IB es controvertida, ya que los ensayos clínicos no han demostrado claramente un beneficio de supervivencia. Los ensayos de la quimioterapia preoperatoria (quimioterapia neoadyuvante) en el carcinoma de pulmón operable de células no pequeñas no han sido concluyentes.

10 *Quimioterapia*

En los pacientes con cáncer de pulmón en estadio 3, que no se pueden eliminar por cirugía, el tratamiento combinado con radioterapia y quimioterapia mejora significativamente la supervivencia.

15

La terapia dirigida

20 En los últimos años, diversas terapias moleculares específicas se han desarrollado para el tratamiento de cáncer de pulmón avanzado. Gefitinib (Iressa) es uno de estos fármacos, que se enfoca en el dominio de la tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), expresada en muchos casos de carcinoma de pulmón de células no pequeñas. No ha demostrado aumentar la supervivencia, aunque las mujeres, los asiáticos, los no fumadores y las personas con carcinoma bronquioloalveolar parecen derivar el máximo beneficio de gefitinib.

25

El Erlotinib (Tarceva), otro inhibidor de la tirosina quinasa del EGFR, aumenta la supervivencia en el carcinoma de pulmón de células no pequeñas, y fue aprobado por la FDA en 2004 para el tratamiento de segunda línea del mismo. Al igual que en gefitinib, también parece funcionar mejor en las mujeres, los asiáticos, los no fumadores y las personas con carcinoma bronquioloalveolar, particularmente aquellos
30 con mutaciones específicas en el EGFR.

El inhibidor de la angiogénesis Bevacizumab (Avastin), (en combinación con paclitaxel y carboplatino), mejora la supervivencia de los pacientes con carcinoma de pulmón de

células no pequeñas. Sin embargo, esto aumenta el riesgo de sangrado de los pulmones, sobre todo en los pacientes con carcinoma de células escamosas.

Los avances en los fármacos citotóxicos, la farmacogenética y el diseño de fármacos se muestran prometedores. Un número de agentes dirigidos están en las primeras etapas de la investigación clínica, como los inhibidores de la ciclooxigenasa-2, el promotor de la apoptosis exisulind, los inhibidores del proteasoma, bexaroteno, el inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico cetuximab, y las vacunas. El Crizotinib ha resultado una promesa significativa en los primeros ensayos clínicos en un subgrupo de carcinoma de pulmón de células no pequeñas que se caracteriza por el oncogén de fusión EML4-ALK, que se encuentra en algunos pacientes relativamente jóvenes, ligeramente o nunca fumadores, con adenocarcinoma. Las áreas futuras de investigación incluyen inhibidores del proto-oncogen ras, la inhibición de la fosfoinositido-3-kinasa, la inhibición de la histona deacetilasa, y el reemplazo del gen supresor de tumores.

Por tanto, otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un principio activo que se selecciona de entre un agonista β_2 , un anticolinérgico, un compuesto del grupo de los corticoesteroides, un inhibidor de la fosfodiesterasa y un supresor del sistema inmune, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo con EPOC identificable por el método de la invención.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un principio activo que se selecciona de entre complejos de coordinación de platino (cisplatino o carboplatino), gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etopósido, vinorelbina, pemetrexed, gefitinib, erlotinib, bevacizumab, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo con adenocarcinoma y/o carcinoma escamoso, asociado o no a EPOC, identificables por el método de la invención.

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" ó "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o

prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

5

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los elementos necesarios para cuantificar la expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de entre *IL-6sR*, *IL-1a*, *IL-11*, *CCL-1*, *EOTAXIN-2*, *PDGFAA*, *TNFR1*, *TNFR2*, *EGF*, *MIP-1B*, *MIG*, *MCP-1*, *IGFBP2*, *IGFBP1*, *GDF-15*, *VEGF* o cualquiera de sus combinaciones.

10

En una realización preferida, el kit comprende los elementos necesarios para cuantificar la expresión de *IGFBP1*, *MIP1 β* , *CCL-1*, *MIG*, *PDGFAA*, *GDF-15*, *VEGF* y

15

En otra realización preferida, el kit comprende las herramientas necesarias para cuantificar el producto de expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento *CCL-1* y/o *IL-11*. Más preferiblemente, el kit o dispositivo comprende los anticuerpos anti-*CCL-1* y anti-*IL-11*.

20

Aún más preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los anticuerpos que se seleccionan de la lista que consiste en: anticuerpos anti-*IL-6sR*, anti-*IL-1a*, anti-*IL-11*, anti-*CCL-1*, anti-*EOTAXIN-2*, anti-*PDGFAA*, anti-*TNFR1*, anti-*TNFR2*, anti-*EGF*, anti-*MIP-1B*, anti-*MIG*, anti-*MCP-1*, anti-*IGFBP2*, anti-*IGFBP1*, anti-*GDF-15*, anti-*VEGF* o cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, el kit comprende los anticuerpos anti-*IGFBP2*, anti-*MIP-1B*, anti-*CCL-1*, anti-*MIG*, anti-*PDGFAA*, anti-*GDF-15*, anti-*VEGF* o anti-*EGF*.

25

En otra realización preferida, el kit de la invención comprende anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

30

Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo los métodos de la invención.

5 Otro aspecto se refiere al uso del kit de la invención, para el diagnóstico, pronóstico, y clasificación de los a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón, b) individuos con EPOC, c) individuos con adenocarcinoma, d) individuos con carcinoma escamoso, e) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o f) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

10

Otro aspecto de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención (del primer o del segundo método de la invención).

15

En una realización preferida, el medio de almacenamiento legible por un ordenador comprende al menos uno de los anticuerpos anti-IL-6sR, anti-IL-1a, anti-IL-11, anti-CCL-1, anti-EOTAXIN-2, anti-PDGFAA, anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti-EGF, anti-MIP-1B, anti-MIG, anti-MCP-1, anti-IGFBP2, anti-IGFBP1, anti-GDF-15 y anti-VEGF, o
20 cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, el medio de almacenamiento legible por un ordenador comprende los anticuerpos anti-IGFBP1, anti-MIP1 β , anti-CCL-1, anti-MIG, anti-PDGFAA, anti-GDF-15, anti-VEGF y anti-EGF

Los métodos de la invención pueden incluir etapas adicionales, como por ejemplo, la
25 separación de proteínas mediante electroforesis mono y bidimensional (2D-PAGE), o la digestión previa con tripsina de una mezcla de proteínas (de la muestra) para después purificar y analizar los péptidos mediante espectrometría de masas (MS), como el MALDI-TOF, o mediante cromatografía multidimensional, mediante ICAT (*Isotope-coded affinity tags*), DIGE (*Differential gel electrophoresis*) o arrays de
30 proteínas.

En otra realización preferida, el medio de almacenamiento legible por un ordenador comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una
35 secuencia conocida o un ARNm de al menos uno de los genes *IL-6sR*, *IL-1a*, *IL-11*, *CCL-1*, *EOTAXIN-2*, *PDGFAA*, *TNFR1*, *TNFR2*, *EGF*, *MIP-1B*, *MIG*, *MCP-1*, *IGFBP2*, *IGFBP1*, *GDF-15*, y *VEGF*, o cualquiera de sus combinaciones. Aún más preferiblemente el medio de almacenamiento legible por un ordenador comprende

oligonucleótidos o micromarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes *IGFBP1*, *MIP1 β* , *CCL-1*, *MIG*, *PDGFAA*, *VEGF* y *EGF*.

5 Así, por ejemplo, las secuencias de oligonucleótidos son construidas en la superficie del chip mediante el elongamiento secuencial de una cadena en crecimiento con un sólo nucleótido utilizando fotolitografía. Así, los oligonucleótidos son anclados por el extremo 3' mediante un método de activación selectiva de nucleótidos, protegidos por un reactivo fotolábil, mediante la incidencia selectiva de luz a través de una
10 fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

Así, las sondas oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos. Para la cuantificación de la expresión génica, preferiblemente se
15 emplean aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.

La síntesis in situ sobre un soporte sólido (por ejemplo, vidrio), podría hacerse mediante tecnología chorro de tinta (ink-jet), lo que requiere sondas más largas. Los soportes podrían ser, pero sin limitarse, filtros o membranas de NC o nylon (cargadas),
20 silicio, o portas de vidrio para microscopios cubiertos con aminosilanos, polilisina, aldehídos o epoxy. La sonda es cada una de las muestras del chip. El target es la muestra a analizar: RNA mensajero, RNA total, un fragmento de PCR, etc.

Otro aspecto de la invención se refiere a una señal transmisible que comprende
25 instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

Los términos "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan aquí de manera intercambiable, refiriéndose a formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud,
30 tanto ribonucleótidos (ARN ó RNA) como desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA).

Los términos "secuencia aminoacídica", "péptido", "oligopéptido", "polipéptido" y "proteína" se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no
35 codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 **Fig. 1.** Cluster jerárquico de asociación de componentes.

Fig. 2. Análisis de la diferencias significativas de expresión de las 16 proteínas de interés mediante el cálculo del p value, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

15 **Fig. 3.** Análisis de las 16 proteínas de interés mediante Western blot con anticuerpos específicos.

Fig. 4. Validación de la expresión diferencial de las proteínas de interés mediante ELISA.

20

Fig. 5. Análisis de la sensibilidad y especificidad de las proteínas de interés, para cada grupo de las patologías estudiadas, a partir de los datos de expresión obtenidos mediante la metodología de ELISA.

25 **Fig. 6.** Perfil del estudio.

Fig. 7. A. Mapa de calor de agrupación de 80 proteínas supervisadas diferencialmente expresadas entre el grupo control y los grupos de enfermedades. Dendrogramas de análisis de agrupamiento de las muestras y las proteínas se muestran en la parte superior e izquierda, respectivamente. La regulación relativa arriba y abajo de la proteína se indica con rojo y azul, respectivamente. **B.** Niveles de expresión de 16 proteínas interesantes después de análisis de mapa. Los niveles de expresión de medición de cada proteína, con respecto a su nivel medio de expresión a través de la condición. Las barras de error representan valores de la mediana, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,005$ ***.

30

35

Fig. 8. Las proteínas candidatas seleccionadas CCL-1 e IL-11 se validaron por Western blot y ELISA. **A.** Análisis de transferencia Western de la IL-11 y proteínas CCL-1 en diferentes muestras. **B.** Análisis de los niveles de proteína de IL-11 y CCL-1 por ELISA en la primera cohorte de validación. Las líneas horizontales negras son las medianas. **C.** Análisis de los niveles de proteína de IL-11 y CCL-1 por ELISA en la segunda cohorte de validación. Las líneas horizontales negras son la mediana

Fig. 9. Curvas ROC para IL-11 y CCL-1. **A.** Curvas ROC para IL-11 y CCL-1 en pacientes con adenocarcinoma frente a todos los grupos de la primera cohorte de validación. **B.** Curvas ROC para la IL-11 y CCL-1 en pacientes con adenocarcinoma frente a todos los grupos de la segunda cohorte de validación.

Fig. 10. Tasa de resultados positivos para IL-11 y CCL-1 en pacientes con adenocarcinoma. **A.** Tasa de resultados positivos para IL-11, CCL-1, IL-11 y CCL-1, IL-11 y / o CCL-1 en todos los pacientes con adenocarcinoma en la primera cohorte. **B.** Tasa de resultados positivos para IL-11, CCL-1, IL-11 y CCL-1, IL-11 y / o CCL-1 en todos los pacientes con adenocarcinoma en la cohorte adicional.

EJEMPLOS

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores.

EJEMPLO 1. DETERMINACIÓN DE LAS CITOKINAS CON EXPRESIÓN DIFERENCIAL

Pacientes y muestras

Se han analizado un total de 141 muestras de lavado broncoalveolar (LBA), a partir de cuatro grupos diferentes de pacientes (pacientes con EPOC, con CP, con EPOC y CP y sin EPOC ni CP), desde el año 2009 hasta el 2011.

Las muestras se dividieron en dos grupos. El primer grupo de muestras de 60 pacientes se utilizó para realizar el estudio. Una descripción de todos los pacientes

incluidos se puede encontrar en la Tabla 1. El segundo grupo, de 81 pacientes, se utilizó para la validación de los resultados. (Tabla 2). Todas las muestras se recogieron en el Hospital Virgen del Rocío (Sevilla, España), a partir de pacientes que habían requerido la broncoscopia flexible con fines diagnósticos. El presente estudio fue
5 aprobado por el Comité de Ética del Hospital y un consentimiento informado por escrito se obtuvo de todos los pacientes antes de su inclusión en el estudio.

Los sujetos fueron preparados con una combinación de anestesia tópica (20% benzocaína aerosol a la faringe más el 2% lidocaína tópica como sea necesario) y la
10 sedación consciente con midazolam y meperidina de acuerdo con las directrices institucionales. Las muestras del lavado broncoalveolar (LAB) se obtuvieron de la instilación y la aspiración de 40 a 60 ml alícuotas de 0,9% de solución salina estéril en el segmento broncopulmonar. El líquido recuperado se pasó inmediatamente a través de un filtro de 100 micras de nylon estéril (Becton Dickinson, San Jose, CA) para
15 eliminar el moco, posteriormente fueron transportadas en hielo al laboratorio. El volumen total fue centrifugado durante 10 minutos a 1800xg y 4 ° C. El sobrenadante se dividió en alícuotas en tubos de 2 ml y congelado a -80 ° C hasta su posterior uso.

Tratamiento de la muestra

20 Los experimentos se realizaron en aproximadamente 4.8 ml de muestra. Debido a su bajo contenido en proteínas, las muestras de LBA fueron concentradas antes de su uso, mediante un concentrador de vacío (Concentrador plus - Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Para ello se descongelaron en hielo adicionando un cóctel de inhibidores de proteasas (Thermo Scientific, Franklin, MA, EE.UU.). El volumen inicial de las
25 muestras se redujo a 250-450 µl en 2.6 horas. La cuantificación de proteínas, se determinó por el método de RCDC (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.).

Arrays de proteína

30 Con el fin de estudiar los perfiles de proteínas de los cuatro grupos de pacientes, se utilizó un array de anticuerpos, un kit de serie disponible en el mercado que analiza los niveles de expresión de 80 citoquinas y factores de crecimiento (Quantibody ® matriz de anticuerpos humanos de citoquinas 1000 - RayBiotech, Norcross, GA, EE.UU.). El
35 análisis de anticuerpos se realizó de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el

fabricante. Brevemente, las matrices de microarrays se incubaron con el tampón de bloqueo a temperatura ambiente durante 30 minutos y después con la muestra durante 120 min. Las matrices de microarrays fueron lavadas con solución de lavado I (Wash Buffer I) por 3 veces y con el tampón de lavado II (Wash Buffer II) durante 2 horas a temperatura ambiente (5 min por lavado). A continuación, las matrices de microarrays se incubaron con el cóctel de anticuerpos a temperatura ambiente durante 120 minutos. Por último, las matrices de microarrays se lavaron y se incubaron con Cy3 equivalente a estreptavidina conjugada a temperatura ambiente durante 120 minutos. Las medidas de intensidad equivalentes a la expresión de cada proteína se visualizaron a través de un escáner láser GenePix 4100 A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Las intensidades de cada proteína, se midieron por cuadruplicado en cada ejemplar.

Western blot.

50 µg de proteínas procedentes del LAB fueron separadas en geles entre el 7 y 12%, dependiendo del tamaño de la proteína, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y posteriormente transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.), bloqueadas con una solución de BSA al 5%, e incubadas durante toda la noche a 4 ° C con anticuerpos primarios de acuerdo a las instrucciones del fabricante: anti-EGF (1:500, Santa Cruz, CA, EE.UU.), anti-VEGF, anti-IGFBP1, anti-IGFBP2, anti-eotaxin2 (CCL24), anti-MIP-1β (CCI4), anti-MIG, anti-GDF15 (CXCL9), anti-PDGFAA, anti-IL6R, anti-IL1R1, anti-IL11 y anti-I309 (1:200 Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.), anti-TNFR1, anti-TNFR2 y anti-MCP-1 (1:1000 Cell signaling, Beverly, MA, EE.UU.). Consecutivamente, se incubaron con anticuerpos secundarios, conjugados con peroxidasa anti-ratón (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y anti-conejo (Señalización Celular, Beverly, MA, EE.UU.), se aplicaron a las membranas individuales (1:2000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se revelaron mediante quimioluminiscencia usando ECL (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se visualizaron en un analizador de imágenes (Mini LAS-3000, Fujifilm, Tokio, Japón). Los niveles de proteína relativa se calcularon en comparación con la cantidad de proteína β-actina (1:1000 Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.). Los experimentos se repitieron tres veces de forma independiente.

ELISA

Los ensayos de ELISA se realizaron mediante el uso de anticuerpos específicos en muestras de BALF de la segunda cohorte de pacientes (cohorte de validación), se
5 utilizaron ensayos de ELISA sándwich para CCL4/MIP-1 β , CXCL9/MIG, IGFBP-2, IGFBP-1, EGF, RI/TNFRSF1A sTNF, RI/TNFRSF1A sTNF, IL-1 RI, IL-6 R α , CCL2/MCP-1, VEGF, GDF-15, CCL24/Eotaxin-2/MPIF-2, CCL1/I-309, IL-11, PDGF-AA (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.). Todas las muestras se
10 analizaron por duplicado. Los límites de detección para estos ensayos se establecieron entre los 25 y 200 μ g de proteínas.

El protocolo para la realización del ELISA fue el siguiente. Primeramente se diluyó el anticuerpo de captura en PBS, y se adiciono 100ul del mismo a cada pocillo de una
15 placa de 96 pocillos, la cual se incubo toda la noche a 4°C. Posteriormente se lava cuatro veces en TBS con 0,05% de Tween-20 (0,05% TBST). Seguidamente, se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1% durante 1 hora a temperatura ambiente, nuevamente se lava cuatro veces con 0,05% de TBST. Consecutivamente se añadieron las muestras y los estándares de proteína, y se incubó durante 2 horas a
20 temperatura ambiente. Tras estos pasos se añade el anticuerpo de detección diluido en PBS, durante 2 horas a temperatura ambiente. Para finalizar se añade estreptavidina (DuoSet, R & D Systems) y se incubó la placa durante 30 minutos. Por último, se añadió el reactivo de coloración o-fenilendiamina la reacción se hace en oscuridad durante 20 minutos. Tras este tiempo se adiciona H2SO4 2N a cada pocillo para parar la reacción y se lee la absorbancia en un lector de placas a 450 nm (Emax,
25 Molecular Devices, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.). Las medidas de absorbancia se extrapolan a una recta patrón obtenida con los estándares de proteína para saber la concentración de proteína de la muestra medida.

Resultados obtenidos.

30 El primer paso para llevar a cabo el estudio fue la realización de los arrays de anticuerpos (80 citoquinas y factores de crecimiento implicados en la respuesta inflamatoria), en los 60 pacientes recogidos en la tabla 1. Los datos obtenidos de la lectura de los arrays, se analizaron mediante la construcción de un cluster jerárquico
35 supervisado usando la distancia euclídea como método de asociación de

componentes, y mediante la utilización del software de análisis estadístico babelomics versión 4.2 (Mínguez P y J Dopazo) (fig 1). El nivel de expresión de cada proteína, en relación con su nivel de expresión medio en todas las condiciones, se representó en valores del 0-100%. De este análisis nosotros destacamos 16 proteínas de interés
5 (CCL4/MIP-1 β , CXCL9/MIG, IGFBP-2, IGFBP-1, EGF, RI/TNFRSF1A sTNF, RI/TNFRSF1A sTNF, IL-1 RI, IL-6 R α , CCL2/MCP-1, VEGF, GDF-15, CCL24/Eotaxin-2/MPIF-2, PDGF-AA CCL1/I-309, IL-11), las cuales presentan diferencias de expresión en los distintos grupos de patologías estudiados respecto al grupo control (no EPOC, no CP). Como por ejemplo las proteínas CCL1 e IL-11 únicamente se expresan en
10 adenocarcinoma o adenocarcinoma con EPOC.

Paralelamente, se analizaron la media y la desviación estándar de cada una de las proteínas de interés para cada uno de las patologías estudiadas así como para el grupo control. Siendo $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ *** (fig 2). Observando diferencias
15 significativas similares a las existentes entre los distintos grupos patológicos respecto al grupo control en el análisis de clúster. Hecho que nos sugiere que esta selección de proteínas podría ayudarnos a discriminar entre unos tipos de patologías y otros, ya que cada una de estas proteínas tiene una expresión distinta respecto al grupo control dependiendo del tipo de patología.

20 Seguidamente, se pretendió seguir ahondando en la relación de las proteínas seleccionadas y su posible participación en las patologías estudiadas. Se propuso validar los hallazgos encontrados mediante la utilización de otra metodología diferente a la anterior, para ello utilizamos la metodología western blot. Mediante esta técnica se
25 midió la expresión de cada una de las proteínas seleccionadas en las muestras de LBA procedentes de los pacientes seleccionados en la tabla 1 (fig. 3). Se obtuvieron unos resultados que concuerdan con los anteriormente obtenidos, de forma que cada vez parece más evidente que las proteínas seleccionadas están involucradas en mayor o menor medida en las patologías estudiadas en este trabajo.

30 El siguiente paso, fue la obtención de un perfil lo suficientemente robusto, susceptible de ser utilizado en la práctica clínica diaria. Para llevar a cabo este objetivo, se empleó una nueva cohorte de pacientes, con similares características a la cohorte anterior, con la única modificación de un aumento en el número de pacientes del grupo
35 de CP y CP/EPOC. Este aumento se debe a la necesidad de esclarecer las diferencias

previamente observadas en los experimentos anteriores, entre los dos tipos de CP (ADE y SCC). Para la medida de proteínas se empleó la metodología de ELISA, ya que su uso está ampliamente extendido en la práctica clínica diaria (fig. 4). Gracias a este análisis se comprobó por un lado que no todas las proteínas participan en todos los grupos patológicos tal y como veníamos observando en los análisis anteriores, y que existe un grupo de 4 proteínas (GDF15, VEGF, EGF, TNFR I), que presentan diferencias de expresión significativas respecto al grupo control, otras 4 proteínas (MIG, MIP-1B, MCP1, PDGFAA) que prácticamente no se expresan en situación control sin embargo presentan diferencias importantes en los diversos grupos patológicos, y dos proteínas (IGFBP1, CCL1) que solo se expresan en determinados grupos patológicos, y por otro lado este análisis ayudó a establecer un perfil de proteínas más robusto si cabe que el anterior, susceptible de poder extrapolarse en forma de kit a la práctica clínica (fig. 4).

Posteriormente, se analizó el potencial de cada una de las proteínas como posibles biomarcadores en cada una de las patologías estudiadas. Para ello se estudió la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo, a partir de los resultados obtenidos en el apartado anterior (fig 5). Este análisis pone de manifiesto que la proteína MIG podría usarse como biomarcador, MIG presenta una sensibilidad y especificidad en torno al 90% en las muestras de LBA de pacientes con EPOC, a la vez que las proteínas CCL1 e IGFBP1 presentan una sensibilidad 0% y una especificidad del 100%, lo que indicaría que estas tres proteínas podrían diagnosticar esta patología mediante un ELISA convencional. Del mismo modo, la proteína CCL1 presenta una especificidad del 100% y una sensibilidad del 40% por lo que podría ser un biomarcador discriminante para las muestras provenientes de Adenocarcinoma. Este análisis consolida el perfil de proteínas que hemos ido obteniendo a través de los diferentes análisis, ayudándonos a establecer un posible kit capaz de discriminar los pacientes en los distintos grupos del estudio.

Por último se empleó un modelo de regresión logística mediante el cálculo de la odds ratio, para definir el posible kit diagnóstico. Esto permitió asociar si la presencia o ausencia de determinadas proteínas tenía relación con la probabilidad de tener una determinada patología (Tabla 4).

Tabla 1. Características de la primera cohorte de pacientes

	Control n=16	EPOC n=15	CP n=17	EPOC con CP n=12
Género				
Masculino	100,0% (16)	100,0% (15)	100,0% (17)	100,0% (12)
Femenino	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
Media de edad [rango]	61,3 [41-80]	61,5 [45-78]	60,7 [46-69]	60,7 [49-68]
Status				
Fumador	68,8% (11)	53,3% (8)	52,9% (9)	83,3% (10)
Ex-fumador	31,2% (5)	46,7% (7)	47,1% (8)	16,7% (2)
Packs-year	21,82	32,2	35,21	30,78
EPOC				
1	-	20,0% (3)	-	58,3% (7)
2	-	33,3% (5)	-	25,0% (3)
3	-	26,7% (4)	-	0,0% (0)
4	-	20,0% (3)	-	16,7% (2)
Cáncer de Pulmón				
ADC	-	-	70,6% (12)	33,3% (14)
SCC	-	-	29,4% (5)	66,7% (8)

5 Tabla 2. Características de la segunda cohorte de pacientes.

	Control n=10	EPOC n=13	CP n=24	EPOC con CP n=34
Género				
Masculino	60,0% (6)	84,6% (11)	83,3% (20)	95,5% (32)
Femenino	40,0% (4)	15,4% (2)	16,7% (4)	4,5% (2)
Media de Edad [rango]	52,3 [42-58]	65,2 [51-75]	61,2 [48-75]	64,3 [48-75]
Status				
Fumador	100,0% (10)	53,8% (7)	50,0% (12)	53,0% (18)
Ex-fumador	0,0% (0)	46,2% (6)	50,0% (12)	47,0% (16)
Packs-year	21,82	34,2	33,21	39,78
EPOC				
1	-	30,8% (4)	-	26,5% (9)
2	-	53,8% (7)	-	50,0% (27)
3	-	15,4% (2)	-	23,5% (8)
4	-	0,0% (0)	-	0,0% (0)
Cáncer de Pulmón				
ADC	-	-	37,5% (9)	47,0% (16)
SCC	-	-	62,5% (15)	53,0% (18)

Tabla 3. Cantidad de proteínas empleadas en el ELISA

PROTEÍNA	µg
GDF-15 TNFRI VEGF EGF	25
MIG MCP-1 IGFBP-1	50
PDGFAA	75
MIP1β	125
CCL-1	200

- 5 **Tabla 4.** Análisis de regresión logística mediante el cálculo de la odd ratio. Asociación de la posible condición a la permanencia o no del grupo patológico donde se ha definido.

Grupo	CONDICIÓN	P-value	OR(95%CI)
Control (sin EPOC ni CP)	IGFP1 negativo MIP1B negativo CCL1 negativo MIG negativo PDGFAA negativo	P<0,001	50(5,64-500)
EPOC	IGFP1 negativo	0,002	12,071(2,485-

Grupo	CONDICIÓN	P-value	OR(95%CI)
	CCL1 negativo MIG positivo		58,629)
Adenocarcinoma	CCL1 positivo MIP1B negativo	0,002	20,83(7,69-76,92)
Carcinoma escamoso	CCL1 negativo EGF negativo PDGFAA o MIP1B positivo	0,009	5,88(1,52-22,2)
Adenocarcinoma y EPOC	CCL1 positivo VEGF negativo	0,001	5,31(1,96-14,49)
Carcinoma escamoso y EPOC	GDF 15 positivo VEGF positivo CCL-1 negativo EGF negativo	0,002	9,34(2,19-40)

EJEMPLO 2. VALIDACIÓN ADICIONAL DE LAS CITOKINAS IL-11 y CCL-1

5 Material y métodos

Pacientes y muestras

Para la realización de este estudio prospectivo, se eligieron entre los años 2009 y 2011 un total de 359 pacientes que habían requerido la broncoscopia flexible para el diagnóstico. Todas las muestras de lavado broncoalveolar (LBA) se recogieron de pacientes del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla, España). Los criterios de selección para el estudio fueron que:

- 1) los pacientes hubieran sido evaluados por los servicios de neumología por hemoptisis o nódulo pulmonar,
- 2) ser fumadores o exfumadores de más de 20 paquetes al año,
- 3) ser mayor de 40 años.

Los criterios de exclusión fueron:

- 1) presencia de otro carcinoma o sarcoma,

- 2) la tuberculosis pulmonar activa,
 3) la resección pulmonar previa,
 4) historial de abuso de drogas, y
 5) la presencia de otra enfermedad inflamatoria aguda o crónica, aparte de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se obtuvo la aprobación para este estudio por parte del comité de ética de la institución. Además y de acuerdo con las regulaciones del comité, se obtuvo el consentimiento informado de los participantes.

Los perfiles proteicos de LBA de los diferentes grupos de pacientes, se analizaron comparando el grupo control (pacientes sin EPOC o cáncer de pulmón) con los grupos de enfermos. Estos últimos incluyen un grupo de EPOC, un grupo de cáncer de pulmón y un grupo de EPOC más cáncer de pulmón. Las muestras se dividieron en tres cohortes. Un primer grupo de muestras, de 60 pacientes, se utilizó para desarrollar el estudio inicial. La descripción de los pacientes incluidos en el estudio se puede ver en la Tabla 5A. El segundo grupo de muestras independientes de 139 pacientes diferentes se utilizó (Tabla 5B) y un tercer grupo de muestras independientes de 160 pacientes diferentes (Tabla 5C).

Tabla 5. (A) Características de la población control usada para el array de proteínas. (B) Características de la población usada para la validación. (C) Características de la población usada para la validación adicional.

A

	Control n=16	EPOC n=15	Cáncer de pulmón n=17	EPOC con Cáncer de pulmón n=12
Género				
Masculino	100,0% (16)	100,0% (15)	100,0% (17)	100,0% (12)
Femenino	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)	0,0% (0)
Media de edad	61,3 [41-80]	61,5 [45-78]	60,7 [46-69]	60,7 [49-68]
En la actualidad				
Fumador	68,8% (11)	53,3% (8)	52,9% (9)	83,3% (10)
Exfumador	31,2% (5)	46,7% (7)	47,1% (8)	16,7% (2)
Rangos de edad	38,8 [31-53,2]	50 [42-65]	58,2 [41-65,7]	52,3 [41-63,2]
EPOC				

	Control n=16	EPOC n=15	Cáncer de pulmón n=17	EPOC con Cáncer de pulmón n=12
Leve	-	20,0% (3)	-	58,3% (7)
Moderada	-	33,3% (5)	-	25,0% (3)
Severa	-	26,7% (4)	-	0,0% (0)
Muy severa	-	20,0% (3)	-	16,7% (2)
Cáncer de pulmón				
Adenocarcinoma			70,6% (12)	33,3% (4)
Estadio I-II	-	-	16,6% (2)	0,0% (0)
Estadio III-IV			83,4% (10)	100%(4)
SCC			29,4% (5)	66,7% (8)
Estadio I-II	-	-	20% (1)	12,5% (1)
Estadio III-IV			80% (4)	87,5% (7)

B

	Control n=20	EPOC n=29	Cáncer de pulmón n=40	EPOC con Cáncer de pulmón n=50
Género				
Masculino	60,0% (12)	86,2% (25)	82,5% (33)	96,0% (48)
Femenino	40,0% (8)	13,8% (4)	17,5% (7)	4,0% (2)
Media de edad	52,3 [42-58]	65,2 [51-75]	61,2 [48-75]	64,3 [48-75]
En la actualidad				
Fumador	100,0% (20)	51,7% (15)	50,0% (20)	52,0% (26)
Exfumador	0,0% (0)	48,3% (14)	50,0% (20)	48,0% (24)
Rangos de edad	41,8 [33-57,2]	52,8 [41-69,2]	55 [39-73,2]	57 [43-75,2]
EPOC				
Leve	-	27,6% (8)	-	26,0% (13)
Moderada	-	51,7% (15)	-	50,0% (25)
Severa	-	20,7% (6)	-	24,0% (12)

	Control n=20	EPOC n=29	Cáncer de pulmón n=40	EPOC con Cáncer de pulmón n=50
Muy severa	-	0,0% (0)	-	0,0% (0)
Cáncer de pulmón				
Adenocarcinoma			37,5% (15)	46,0% (23)
Estadio I-II	-	-	26,7% (4)	21,7% (5)
Estadio III-IV			73,3% (11)	78,3% (18)
SCC			62,5% (25)	54,0% (27)
Estadio I-II	-	-	40% (10)	55,6% (15)
Estadio III-IV			60% (15)	44,4% (12)

C

	Control n=20	LC n=66	COPD with LC n=74
Género			
Masculino	60,0% (12)	83,3% (55)	94,6% (70)
Femenino	40,0% (8)	16,7% (11)	5,4% (4)
Media de edad [rango]	52,3 [42-58]	61,2 [48-75]	64,3 [48-75]
En la actualidad			
Fumador	100,0% (20)	50,0% (33)	52,7% (39)
Exfumador	0,0% (0)	50,0% (33)	47,3% (35)
Rangos de edad	36,6 [30-51,2]	58,8 [41-77,2]	62 [43-79,2]
Cáncer de pulmón			
Adenocarcinoma		22,7% (15)	16,2% (12)
Estadio I-II	-	20% (3)	16,7 (2)
Estadio III-IV		80% (12)	83,3% (10)
SCC		18,2% (12)	13,5% (10)
Estadio I-II	-	33,3% (4)	60% (6)
Estadio III-IV		66,6% (8)	30% (4)
LCC	-	12,1% (8)	18,9% (14)

Estadio I-II		37,5%(3)	42,85% (6)
Estadio III-IV		62,5%(5)	57,15% (8)
SCLC		47,0% (31)	51,4% (38)
Estadio limitado	-	41,9% (13)	42,1% (16)
Estadio extensivo		58,1% (18)	57,9% (22)

Los sujetos se trataron con una combinación de anestesia tópica (aerosol de benzocaína al 20% a la faringe más lidocaína tópica al 2% según necesidad) y sedación consciente usando midazolam y meperidina de acuerdo con las directrices institucionales. Las muestras de lavado broncoalveolar se obtuvieron por instalación y aspiración en el segmento broncopulmonar de alícuotas de 40-60 ml de solución salina estéril. El fluido recuperado se pasó inmediatamente a través de un filtro de nylon estéril de 100 µm (Becton Dickinson, San José, CA) para eliminar el moco y se transportó en hielo al laboratorio. El volumen total se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 1800 xg y se congeló a -80°C hasta su uso posterior.

Tratamiento de la muestra

Aproximadamente entre 4-8 ml de muestra de LBA se utilizaron en nuestros experimentos. Debido a su bajo contenido en proteínas, las muestras de LBA necesitaron ser concentradas antes de usarlas. Las muestras de LBA se descongelaron en hielo con un kit de inhibidor de proteasa (Thermo Scientific, Franklin, MA, EEUU). Las muestras se alicuotaron en tubos nuevos y se colocaron en un concentrado de vacío (Concentrador plus - Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El volumen inicial de las muestras se redujo de 1,5 a 2 ml en 2-6 horas. La cuantificación de las proteínas se realizó por el método RCDC (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU).

Arrays de proteínas

Con el objetivo de estudiar los perfiles proteicos de los cuatro grupos de pacientes, se realizó un cribado de citoquinas y factor de crecimiento. La matriz de la proteína usada en el estudio se encuentra disponible en el mercado y analiza los niveles de expresión de 80 citoquinas y factores de crecimiento (Quantibody ® Antibody citoquinas Humanos Array 1000 - RayBiotech, Norcross, GA, EEUU). En las tablas 6 y 7

encontramos una lista completa de las proteínas analizadas en el estudio. La matriz de ensayo para las citoquinas humanas se realizó de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La intensidad de cada señal se visualizó mediante el uso de un láser scanner modelo GenePix 4100 A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU). Los puntos de intensidad de cada citoquina (cuatro manchas por proteína / control positivo) se fusionaron y se expresaron como la media relativa a las señales promedio de los controles positivos en los microarrays analizados con respecto a los grupos de enfermedades (pacientes con EPOC, con cáncer de pulmón, con EPOC y cáncer de pulmón) y el grupo control (pacientes sin EPOC ni cáncer de pulmón).

10

Tabla 6. Características de los anticuerpos empleados en el estudio.

Símbolo de la citoquina	Nombre de la citoquina
BLC	B-célula linfoma
Eotaxin	Eotaxina
Eotaxin 2	Eotaxina 2
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos
I-309/CCL1	Quimiocina (C-C motif) ligando 1
ICAM1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN g	Interferón-gamma
IL-1a	Interleuquina-1 alfa
IL-1b	Interleuquina-1 beta
IL-1ra	receptor antagonista Interleuquina-1
IL-2	Interleuquine-2
IL-4	Interleuquine-4
IL-5	Interleuquine-5
IL-6	Interleuquine-6
IL-6Sr	Receptor soluble Interleuquina-6
IL-7	Interleuquina-7
IL-8	Interleuquina-8
IL-10	Interleuquina-10
IL-11	Interleuquina-11
IL-12p40	Interleuquina-12 p40
IL-12p70	Interleuquina-12 p70
IL-13	Interleuquina-13
IL-15	Interleuquina-15
IL-16	Interleuquina-16
IL-17	Interleuquina-17
MCP-1/CCL2	Proteína-1 quimiotáctica de monocitos/Quimiocina (C-C motif) ligando 2
MCSF	Factor de células madre de ratón
MIG/CXCL9	Monoquina inducida por IFN-Gamma/Quimiocina (C-X-C

Símbolo de la citoquina	Nombre de la citoquina
	motif) ligando 9
MIP 1 B-1a/CCL3	Proteína 1 alfa inflamatoria de marófagos / Quimiocina (C-C motif) ligando 3
MIP 1 B-1b/CCL4	Proteína 1 beta inflamatoria de marófagos y / Quimiocina (C-C motif) ligando 4
MIP 1 B-1d	Proteína 1 delta inflamatoria de marófagos
PDGF-BB	Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB
Rantes/CCL5	Regulado a la activación normal de células T expresadas, y secretada /Quimiocina (C-C motif) ligando 5
TIMP-1	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 1
TIMP-2	Inhibidor tisular de metaloproteinasas 2
TNF a	Factor de necrosis Tumoral alfa
TNF b	Factor de necrosis Tumoral beta
TNF RI	Factor de necrosis Tumoral 1
TNF RII	Factor de necrosis Tumoral 2

Tabla 7. Características de los anticuerpos empleados en el estudio.

Símbolo del factor de crecimiento	Nombre del factor de crecimiento
AR	Receptor de andrógenos
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
b FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
BMP4	Proteína 4 morfogenética ósea
BMP5	Proteína 5 morfogenética ósea
BMP7	Proteína 7 morfogenética ósea
B-NGF	Factor beta de crecimiento nervioso
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EG-VEGF	Glándula endocrina derivada del factor de crecimiento del endotelial vascular
FGF 4	Factor 4 de crecimiento de fibroblastos
FGF 7	Factor 7 de crecimiento de fibroblastos
GDF-15	Factor 15 de diferenciación del crecimiento
GDNF	Factor neurotrófico derivado de células gliales
GH	Hormona del crecimiento
HB-EGF	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
IGFBP-1	Insulina similar al factor de crecimiento de unión a la proteína 1
IGFBP-2	Insulina similar al factor de crecimiento de unión a la proteína 2
IGFBP-3	Insulina similar al factor de crecimiento de unión a la proteína 3
IGFBP-4	Insulina similar al factor de crecimiento de unión a la proteína 4

Símbolo del factor de crecimiento	Nombre del factor de crecimiento
IGFBP-6	Insulina similar al factor de crecimiento de unión a la proteína 5
IGF-1	Insulina similar al factor de crecimiento 1
Insulin	Insulina
MCF R	Receptor del factor quimiotáctico de macrófagos
NGF R	Receptor del factor de crecimiento nervioso
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
OPG	Osteoprotegerina
PDGFAA	Factor de crecimiento AA derivado de plaquetas
PIGF	Biosíntesis tipo F del fosfatidilinositol-glucano
SCF	Factor de células madre
SCF R	Receptor del factor de células madre
TGF α	Factor de crecimiento transformante α
TGF β 1	Factor de crecimiento transformante β 1
TGF β 3	Factor de crecimiento transformante β 3
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGF R2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
VEGF R3	Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular
VEGF D	Factor D de crecimiento endotelial vascular

Western blot

- 5 Las proteínas de LBA (50 μ g) se separaron como se ha descrito previamente. En resumen, los SDS-PAGEs se transfirieron a membranas PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Después del "blocking", los blots se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-IL11 y anti-CCL-1 (1:200 Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.). Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: peroxidasa conjugada con anti-ratón
- 10 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y anti-conejo (Señalización Celular, Beverly, MA, EEUU). Las bandas proteicas se revelaron usando un aumento de quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) y se visualizaron en un analizador de imágenes (Mini LAS-3000, Fujifilm, Tokio, Japón). La cuantificación de los niveles de expresión se realizó por comparación con la cantidad de proteína β -actina (1:1000 Abcam, Cambridge, MA, EEUU). Para analizar los valores de expresión
- 15 de las proteínas de interés obtenidas por Western blot se utilizó la densitometría. El análisis de densitometría de los blots escaneados se realizó utilizando el software Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) y los resultados se expresaron como los cambios

relativos respecto a la proteína de control (β -actina). Los experimentos se repitieron tres veces de forma independiente.

Elisa

5

Las muestras LBA se evaluaron según las instrucciones del fabricante, utilizando kits de ELISA sándwich para CCL-1/I-309 e IL-11 (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.). Todas las muestras se ensayaron por duplicado y usando la misma placa. En resumen, el anticuerpo de captura (concentración proporcionado por el fabricante) se diluyó en PBS, se añadió a cada pocillo y se dejó durante la noche a 4°C. La placa se lavó 4 veces en TBS con 0,05% de Tween-20 (TBST 0,05%). La placa se bloqueó con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) durante 1 hora a temperatura ambiente antes de ser lavada de nuevo cuatro veces con TBST 0,05%. Se añadieron las muestras y los estándares a la placa y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Después se lavó la placa, se añadió anticuerpo de detección (concentración proporcionada por el fabricante) diluido en PBS. La placa se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Una vez que la placa se lavó de nuevo, se añadió estreptavidina (DuoSet, R & D Systems) y la placa se incubó durante 30 minutos. Finalmente, se añadió reactivo de color o-fenilendiamina a cada pocillo, y se dejó desarrollar la reacción en la oscuridad durante 20 minutos. La reacción se interrumpió por la adición de H₂SO₄ 2N a cada pocillo. La absorbancia se leyó en un lector de placas a 450 nm (Emax, Molecular Devices, Minneapolis, Minnesota, Estados Unidos).

25

Análisis estadístico

Todas las variables continuas de las características de los pacientes se expresaron como mediana para cada variable (rango intercuartil [IQR]) y las variables categóricas como el número de casos y porcentaje. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico para Ciencias Sociales (SPSS 17, Chicago, Illinois, EEUU).

30

Análisis de datos de expresión de los arrays de proteínas

El análisis de agrupación jerárquica se realizó utilizando la función UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean). Antes del análisis estadístico,

35

se estandarizaron los niveles de expresión de las proteínas, proteína por proteína en todas las condiciones, utilizando las medias y los valores de SD. Las condiciones de la muestra se agruparon utilizando pruebas métricas distancia euclidiana. Los resultados se visualizaron y se analizaron con Babelomics 4,2
5 (babelomics.bioinfo.cipf.es). El nivel de expresión de cada proteína, con respecto a su nivel medio de expresión en todas las condiciones, se representó por un color, con rojo representa mayor expresión que la mediana, azul representa menor expresión que la mediana, y varias intensidades de color intermedios que representan la magnitud de la varianza a partir de la mediana.

10

Análisis de la validez de las pruebas de diagnóstico

Las diferencias entre los dos grupos independientes se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney (variables continuas y los análisis no paramétricos). Las curvas ROC se
15 construyeron para evaluar la sensibilidad, especificidad, y sus respectivas áreas bajo la curva (AUC) con IC del 95%. Se investigó el valor de corte óptimo, que se escogió para reflejar la mejor combinación entre la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo, cociente de probabilidad para predecir adenocarcinoma diagnóstico. Para probar la exactitud del diagnóstico cuando se midió
20 tanto IL-11 y CCL-1 se estimaron funciones de los marcadores combinados por regresión logística binaria.

Resultados

25 De manera general se reclutaron 359 pacientes, 60 en la cohorte de cribado, 139 en la cohorte de validación y 160 para la cohorte de validación adicional. Las características clinicopatológicas de los pacientes en el ensayo y las cohortes de validación se resumen en la Fig. 6

30 En primer lugar, se analizaron los perfiles de expresión de proteínas inflamatorias usando arrays de expresión, utilizando las muestras de LBA de pacientes de cohorte de prueba. Características de los pacientes se distribuyeron de manera uniforme en cuatro grupos diferentes: EPOC, LC, ambas enfermedades o ninguno (grupo de control). El análisis reveló que un número relevante (16) de las proteínas (MIP1b, MIG,
35 IGFBP2, IGFBP1, EGF, VEGF, TNFR-I, TNFR-II, IL6sR, GDF15, IL-1a, MCP-1,

EOTAXIN2, PDGFAA, IL -11, y CCL-1) que participan en las vías inflamatorias se sobreexpresaron en los grupos de pacientes con cáncer de pulmón y/o EPOC en comparación con el grupo de control. Curiosamente, no hubo diferencias claras en la expresión de proteínas entre el subtipo histológico de adenocarcinoma y el resto de los otros grupos. Más específicamente, la expresión de IL-11 y CCL-1 apareció sólo en la patología adenocarcinoma (Fig. 7A).

Un análisis estadístico formal (Figura 7B) confirmó los resultados anteriormente obtenidos en el mapa de calor de modelado a pesar de la dispersión existente en los grupos estudiados. Además, CCL-1 y las proteínas IL-11 mostraron diferencias de expresión estadísticamente significativas en los pacientes con adenocarcinoma en comparación con los restantes grupos de pacientes.

Con el fin de validar los resultados observados en los arrays de proteínas, se realizó un Western blots de las proteínas asociadas exclusivamente con los grupos de adenocarcinoma de IL-11 y CCL-1 (Figura 8A). Los resultados de los experimentos de Western blot indicaron diferencias de expresión similares a las encontradas en el análisis del mapa de calor.

Para analizar la fiabilidad del perfil obtenido se validaron individualmente las proteínas identificadas anteriormente mediante metodología ELISA. Se eligió este método por varias razones: validar los resultados con una metodología diferente, su alta sensibilidad y su fácil manipulación y aplicación en clínica. Se analizó la expresión de IL-11 y CCL-1 en dos cohortes independientes controladas. En la primera cohorte de validación, los 139 pacientes (Tabla 6) tenían características clinicopatológicas similares a las cohortes de la prueba. Por otro lado la cohorte de validación adicional de 160 pacientes (Tabla 7) se diferenció de la cohorte de ensayo, dada la inclusión de otros subtipos histológicos de cáncer de pulmón y la ausencia de un grupo EPOC. Los resultados mostraron que la IL-11 y CCL-1 se sobreexpresaron significativamente en pacientes con adenocarcinoma, en comparación con el resto de grupos, en la primera cohorte de validación (Figura 8B) y en la cohorte de validación adicional (Figura 8C).

Posteriormente, el valor de diagnóstico de ambas proteínas para el adenocarcinoma de pulmón se analizó mediante curvas ROC, con el fin de obtener una línea de corte

que permitiera la clasificación de los pacientes en el adenocarcinoma o ningún adenocarcinoma (Figura 9).

Las curvas ROC para las cohortes de validación mostraron que el valor de corte
 5 óptimo para IL-11 fue de 42 pg/ml (AUC: 0,935, IC 95%: 0,896-0,975), con una
 sensibilidad del 90% y una especificidad del 86% (Figura 8A, Tabla 5A). El valor de
 corte óptimo para CCL-1 fue de 39,5 pg/ml (AUC: 0,83, IC 95%: 0,749-0,902), con una
 sensibilidad del 83% y una especificidad del 74% (Figura 8A, Tabla 5A). Además, se
 analizó la sensibilidad y especificidad de las proteínas CCL-1 e IL-11 en conjunto y
 10 CCL-1 y/o IL-11 (Tabla 8A). Por otro lado, las curvas ROC en la cohorte de validación
 adicionales mostraron que el valor de corte óptimo para el diagnóstico IL-11 fue 29,5
 pg/ml (AUC: 0,95, IC 95%: 0,92-0,98), con una sensibilidad de 90,6% y una
 especificidad del 83% (Figura 8 B, Cuadro 1b). El valor de corte óptimo para CCL-1 fue
 de 24,25 pg/ml (AUC: 0,91, IC 95%: 0,87-0,96), con una sensibilidad del 91,7%, y una
 15 especificidad del 77,5% (Figura 8B, Cuadro 1b). Además, se analizó la sensibilidad y
 especificidad de las proteínas CCL-1 e IL-11 en conjunto y CCL-1 y/o IL-11 para esta
 cohorte (Tabla 8B).

Tabla 8.

20 **A. Test de validación de la cohorte**

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,930 (0,896- 0,975)	90,2% (79,0- 95,7%)	88,7% (80,6- 93,5%)	80,7% (68,7- 88,9%)	94,5% (87,8- 97,6%)	7,95 (4,53- 13,98)	0,11 (0,05- 0,26)
CCL-1	0,830 (0,794- 0,902)	80,0% (66,4- 87,7%)	74,1% (63,9- 82,2%)	72,1% (59,2- 73,4%)	86,3% (76,6- 92,4%)	3,02 (2,05- 4,47)	0,29 (0,17- 0,52)
IL-11 y CCL-1		71,2% (57,7- 81,7%)	94,4% (88,4- 97,4%)	86,0% (72,7- 93,4%)	87,2% (79,9- 92,1%)	12,80 (5,77- 28,41)	0,31 (0,20- 0,47)
IL-11 y/o CCL-1		94,3% (84,6- 98,1%)	74,1% (65,1- 81,4%)	64,1% (53,0- 73,9%)	96,4% (89,9- 98,8%)	3,64 (2,63- 5,04)	0,08 (0,03- 0,23)

B. Test de validación de la cohorte adicional

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,95 (0,92- 0,98)	90,6% (79,7- 95,9%)	83,0% (86,8- 87,7%)	60,8% (49,7- 70,8%)	96,8% (92,7- 98,6%)	5,32 (3,81- 7,41)	0,11 (0,05- 0,26)
CCL-1	0,91 (0,87- 0,96)	91,7% (80,4- 96,7%)	77,5% (71,0- 82,9%)	51,2% (40,8- 61,4%)	97,3% (93,3- 99,0%)	4,08 (3,09- 5,04)	0,11 (0,04- 0,28)
IL-11 y CCL-1		71,2% (57,7- 81,7%)	96,3% (92,5- 98,2%)	84,1% (70,6- 92,1%)	92,3% (87,7- 95,3%)	19,10 (9,00- 41,13)	0,30 (0,19- 0,46)
IL-11 y/o CCL-1		92,3% (82,6- 98,1%)	84,0% (78,0- 88,5%)	62,5% (51,5- 72,3%)	98,1% (94,6- 99,4%)	5,88 (4,21- 8,22)	0,07 (0,02- 0,20)

C. Validación de la primera corte en la segunda corte

	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	90,2% (79,7- 95,9%)	91,4% (86,3- 94,7%)	75,4% (63,3- 84,5%)	97,0% (93,1- 98,7%)	10,52 (6,43- 17,22)	0,11 (0,05- 0,25)
CCL-1	78,3% (64,4- 87,7%)	85,4% (79,1- 90,1%)	61,0% (48,3- 72,4%)	93,1 (87,8- 96,2%)	5,38 (3,58- 8,08)	0,25 (0,15- 0,44)
IL-11 y CCL-1	71,2% (57,7- 81,7%)	96,6% (92,8- 98,4%)	86,0% (72,7- 93,4%)	91,9% (87,1- 95,0%)	20,87 (9,33- 46,69)	0,30 (0,19- 0,46)
IL-11 y/o CCL-1	93,0% (81,4- 97,6%)	77,8% (71,0- 83,5%)	51,9% (41,0- 62,7%)	97,7% (93,6- 99,2%)	4,20 (3,12- 5,64)	0,09 (0,03- 0,27)

AUC= área bajo la curva. PPV= valor predictivo positivo. NPV= valor predictivo

5 negativo. LR= likelihood ratio.

A medida que la sensibilidad y la especificidad fueron similares en ambos grupos, se realizó una regresión logística binaria con el fin de analizar la validez de los valores de corte obtenidos en el análisis anterior. El valor de corte obtenido en la primera cohorte de validación tenía una capacidad de diagnóstico para el adenocarcinoma de 78,8% y 81% de los pacientes con IL-11 y CCL-1, respectivamente (Figura 10A). Esta capacidad se incrementó hasta el 90% y 91% en pacientes con IL-11 y CCL-1, respectivamente, en la cohorte de validación adicional, detectando hasta un 96% de los pacientes cuando se utilizaron ambos biomarcadores (Figura 10B). Se eligió 40 pg/ml y 39,5 pg/ml como valor de corte para el adenocarcinoma. Los valores predictivos y cocientes de probabilidad en el diagnóstico de adenocarcinoma se muestran en la tabla 9. Paralelamente, se evaluó la precisión diagnóstica diferencial, uniendo las dos cohortes de validación. Posteriormente se analizó AUC, la sensibilidad, especificidad, VPP, VPN y las relaciones en etapas iniciales, ex fumadores, paquetes fumados años, el número de células en el BAL y afectación del tracto bronquial (Tabla 9). Los análisis ROC mostraron que las pruebas de la IL-11 y CCL-1 aumentaron la exactitud del diagnóstico de adenocarcinoma en estadio temprano, el AUC de la IL-11 fue de 0,95 (IC del 95%: 0,91-0,99) con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 93% y el AUC para CCL-1 fue de 0,93 (IC del 95%: 0,85-1) con una sensibilidad del 91,7% y una especificidad del 81,6% (Tabla 9). También se comprobó que las AUC, la sensibilidad y especificidad de ambas proteínas en el adenocarcinoma se elevaba en exfumadores y con los paquetes fumados por años f (> 30 p; Tabla 9B, 9C).

Tabla 9.

25 A. Estadios tempranos

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,95 (0,91- 0,99)	100,0% (83,9- 100,0%)	93,0% (81,4- 97,6%)	87,0% (67,9- 95,5%)	100,0% (91,2- 100,0%)	14,33 (4,81- 42,69)	0
CCL-1	0,93 (0,85- 1,00)	91,7% (64,6- 98,5%)	81,6% (66,6- 90,8%)	61,1% (38,6- 79,7%)	96,9% (84,3- 99,4%)	4,98 (2,49- 9,93)	0,10 (0,02- 0,68)
IL-11 y		76,9%	95,3%	83,3%	93,2%	16,54	0,24

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
CCL-1		(49,7- 91,8%)	(84,5- 98,7%)	(55,2- 95,3%)	(81,8- 97,7%)	(4,14- 66,11)	(0,09- 0,66)
IL-11 y/o CCL-1		100,0% (77,2- 100,0%)	69,8% (54,9- 81,4%)	50,0% (32,1- 67,9%)	100,0% (88,6- 100,0%)	3,31 (2,10- 5,21)	0

B. Ex fumadores

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,97 (0,95- 1,00)	100,0% (81,6- 100,0%)	93,2% (85,1- 97,1%)	77,3% (56,6- 89,9%)	100,0% (94,7- 100,0%)	14,80 (6,35- 35,40)	0
CCL-1	0,97 (0,94- 1,00)	88,9% (67,2- 96,2%)	87,8% (78,5- 93,5%)	64,0% (44,5- 79,8%)	97,0% (89,8- 99,2%)	7,31 (3,88- 13,77)	0,13 (0,03- 0,47)
IL-11 y CCL-1		94,1% (73,0- 99,0%)	92,6% (82,4- 97,1%)	80,0% (58,4- 91,9%)	98,0% (89,7- 99,7%)	12,71 (4,91- 32,87)	0,06 (0,01- 0,43)
IL-11 y/o CCL-1		100,0% (81,6- 100,0%)	85,0% (75,6- 91,2%)	58,6% (40,7- 75,4%)	100,0% (94,7- 100,0%)	6,67 (3,96- 11,23)	0

C. Fumadores de menos de 30 paquetes por año

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,94 (0,90- 0,98)	89,5% (68,6- 97,1%)	96,8% (83,8- 99,4%)	94,4% (74,2- 99,0%)	93,8% (79,9- 98,3%)	27,74 (4,01- 191,91)	0,11 (0,03- 0,40)
CCL-1	0,90	92,3%	96,6%	92,3%	96,6%	26,77	0,08

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
	(0,84- 0,97)	(66,7- 96,6%)	(82,8- 99,4%)	(66,7- 98,6%)	(82,8- 99,4%)	(3,88- 184,85)	(0,01- 0,53)
IL-11 y		92,3%	95,8%	92,3%	95,8%	22,15	0,08
CCL-1		(66,7- 98,6%)	(79,8- 99,3%)	(66,7- 98,6%)	(79,8- 99,3%)	(3,23- 15,189)	(0,01- 0,53)
IL-11 y/o		100,0%	83,9%	72,2%	100,0%	6,20	0
CCL-1		(77,2- 100,0%)	(67,4- 92,9%)	(49,1- 87,5%)	(87,1- 100,0%)	(2,78- 13,84)	

Los análisis comparativos de número de células en LBA de pacientes con adenocarcinoma mostraron que los pacientes con menos número de células que la mediana presentaron resultados similares de AUC, la sensibilidad y especificidad con los pacientes por encima de la mediana del número de células (Tabla 10).

Tabla 10.

10 A. Número de células por millón por encima de la mediana

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,90 (0,83- 0,96)	91,7% (74,2- 97,7%)	95,5% (84,9- 98,7%)	91,7% (74,2- 97,7%)	95,5% (84,9- 98,7%)	20,17 (5,18- 78,53)	0,09 (0,02- 0,13)
CCL-1	0,91 (0,86- 0,96)	86,4% (66,7- 95,3%)	85,7% (74,3- 92,6%)	70,4% (51,5- 84,1%)	94,1% (84,1- 98,0%)	6,05 (3,12- 11,73)	0,16 (0,05- 0,46)
IL-11 y		87,0%	100,0%	100,0%	94,1%	0	0,13
CCL-1		(67,9- 95,5%)	(92,6- 100,0%)	(83,9- 100,0%)	(84,0- 98,0%)		(0,05- 0,37)
IL-11 y/o		100,0%	84,9%	75,0%	100,0%	6,63	0

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
CCL-1		(86,2- 100,0%)	(72,9- 92,1%)	(57,9- 86,7%)	(92,1- 100,0%)	(3,50- 12,55)	

B. Número de células por millón por encima de la mediana

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,90 (0,84- 0,98)	86,4% (66,7- 95,3%)	86,8% (75,2- 93,5%)	73,1% (53,9- 86,3%)	93,9% (83,5- 97,9%)	6,54 (3,22- 13,30)	0,16 (0,05- 0,45)
CCL-1	0,91 (0,85- 0,96)	75,0% (53,1- 88,8%)	82,9% (67,3- 91,9%)	71,4% (50,0- 86,2%)	85,3% (69,9- 93,6%)	4,38 (2,02- 9,46)	0,30 (0,14- 0,66)
IL-11 y		80,0%	98,1%	94,1%	92,7%	41,60	0,20
CCL-1		(58,4- 91,9%)	(89,9- 99,7%)	(73,0- 99,0%)	(82,7- 97,1%)	(5,90- 293,39)	(0,08- 0,49)
IL-11 y/o		90,5%	73,6%	57,6%	95,1%	3,43	0,13
CCL-1		(71,1- 97,3%)	(60,4- 83,6%)	(40,8- 72,8%)	(83,9- 98,7%)	(2,14- 5,84)	(0,03- 0,49)

- 5 Respecto de la localización del tumor, no había diferencias entre los pacientes. Los pacientes con adenocarcinoma de localización proximal presentan mejor AUC, sensibilidad y especificidad que los pacientes con localización distal. El AUC para IL-11 de pacientes con localización proximal fue 0,98 (IC del 95%: 0,96-1) con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 91,4%, mientras que el AUC de la IL-11 para pacientes con localización distal fue de 0,92 (IC 95%: 0,87-0,94), con una sensibilidad del 89,3% y una especificidad del 91,5%. Resultados similares se han obtenido para CCL-1 (Tabla 11).
- 10

Tabla 11.

A. Localización Proximal

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,92 (0,88- 0,94)	100,0% (85,7- 100,0%)	91,4% (86,3- 94,7%)	60,5% (44,7- 74,4%)	100,0% (97,6- 100,0%)	11,60 (7,15- 18,82)	0
CCL-1	0,89 (0,83- 0,96)	100,0% (85,7- 100,0%)	82,4% (75,0- 88,0%)	50,0% (36,1- 63,9%)	100,0% (96,6- 100,0%)	5,70 (3,93- 8,25)	0
IL-11 y CCL-1		82,6% (62,9- 93,0%)	96,2% (92,4- 98,2%)	73,1% (53,9- 86,3%)	97,8% (94,5- 99,1%)	21,95 (10,36- 46,49)	0,18 (0,17- 0,44)
IL-11 y/o CCL-1		100,0% (85,7- 100,0%)	78,5% (72,0- 88,8%)	36,5% (25,7- 48,9%)	100,0% (97,4- 100,0%)	4,65 (3,53- 12,00)	0

5 B. Localización distal

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,98 (0,96- 1,00)	89,3% (72,8- 96,3%)	91,4% (86,3- 94,7%)	62,5% (47,0- 66,3%)	98,1% (94,7- 99,4%)	10,36 (6,28- 17,08)	0,12 (0,04- 0,37)
CCL-1	0,94 (0,88- 0,98)	89,7% (73,6- 96,4%)	82,4% (75,0- 88,0%)	53,1% (39,4- 66,3%)	97,3% (92,4- 99,1%)	5,11 (3,45- 7,55)	0,13 (0,04- 0,37)
IL-11 y CCL-1		67,9% (49,3- 82,1%)	96,2% (92,4- 98,2%)	73,1% (53,9- 86,2%)	95,2% (91,2- 97,5%)	18,03 (8,35- 38,95)	0,33 (0,19- 0,58)
IL-11 y/o CCL-1		92,6% (76,6- 97,9%)	78,5% (72,0- 83,8%)	38,5% (27,6- 50,6%)	98,6% (95,2- 99,6%)	4,31 (3,25- 5,78)	0,09 (0,02- 0,36)

Por último, se analizó la señal directa e indirecta y sin alteraciones en pacientes con adenocarcinoma. La exactitud diagnóstica en estos grupos no mostró diferencias importantes entre su AUC, sensibilidad y especificidad (Tabla 12).

Tabla 12.

A. Señal directa

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,94 (0,89- 0,99)	93,3% (70,2- 98,8%)	91,4% (86,3- 94,7%)	48,3% (31,4- 65,6%)	99,4% (96,5- 99,9%)	10,83 (6,55- 17,89)	0,07 (0,01- 0,49)
CCL-1	0,90 (0,84- 0,96)	81,8% (52,3- 94,9%)	82,4% (75,0- 88,0%)	28,1% (15,6- 45,4%)	98,2% (93,6- 99,5%)	4,66 (2,93- 7,41)	0,22 (0,06- 0,78)
IL-11 y CCL-1		62,5% (38,6- 81,5%)	96,2% (92,4- 98,2%)	58,8% (36,0- 78,4%)	96,8% (93,1- 98,5%)	16,61 (7,32- 37,70)	0,39 (0,21- 0,74)
IL-11 y/o CCL-1		100,0% (80,6- 100,0%)	78,5% (72,0- 83,8%)	23,1% (13,7- 36,01%)	98,6% (95,2- 99,6%)	3,99 (2,81- 5,64)	0,18 (0,05- 0,66)

B. Señal Indirecta

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,95 (0,89- 0,99)	85,7% (60,1- 96,0%)	91,4% (86,3- 94,7%)	44,4% (27,6- 62,7%)	98,8% (95,6- 99,7%)	9,94 (5,86- 16,87)	0,16 (0,04- 0,57)
CCL-1	0,89 (0,78- 1,00)	78,6% (52,4- 92,4%)	82,4% (75,0- 88,0%)	32,4% (19,1- 49,2%)	97,3% (92,4- 99,1%)	4,48 (2,82- 7,10)	0,26 (0,09- 0,72)
IL-11 y CCL-1		80,0% (54,8- 93,0%)	96,2% (92,4- 98,2%)	63,2% (41,0- 80,9%)	98,4% (95,3- 94,4%)	21,26 (9,85- 45,89)	0,21 (0,08- 0,57)
IL-11 y/o CCL-1		85,7% (60,1- 96,0%)	78,5% (72,0- 83,8%)	23,1% (13,7- 36,1%)	98,6% (95,2- 99,6%)	3,99 (2,81- 5,64)	0,18 (0,05- 0,66)

C. Señal sin anomalías

	AUC (95% CI)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	PPV (95%CI)	NPV (95%CI)	Positive LR	Negative LR
IL-11	0,98 (0,95- 1,00)	95,0% (76,4- 99,1%)	91,4% (86,3- 94,7%)	55,9% (39,5- 71,1%)	99,4% (96,5- 99,9%)	11,02 (6,72- 18,03)	0,05 (0,01- 0,37)
CCL-1	0,93 (0,88- 0,98)	81,0% (60,0- 92,3%)	82,4% (75,0- 88,0%)	42,5% (28,5- 57,8%)	96,4% (91,2- 98,6%)	4,61 (3,01- 7,05)	0,23 (0,09- 0,56)
IL-11 y CCL-1		85,0% (64,0- 94,8%)	96,2% (92,4- 98,2%)	70,8% (50,8- 85,1%)	98,4% (95,3- 99,4%)	22,59 (10,67- 24,78)	0,16 (0,05- 0,44)
IL-11 y/o CCL-1		100,0% (84,5- 100,0%)	78,5% (72,0- 83,8%)	34,4% (23,7- 47,0%)	100,0% (97,4- 100,0%)	4,65 (3,53- 6,12)	0

Conclusión

5

Se han estudiado varias técnicas de detección del cáncer de pulmón no invasivas. Las técnicas de imagen, como la radiografía de tórax, tomografía computarizada espiral de baja dosis, la citología de esputo, y los biomarcadores moleculares en diferentes muestras biológicas, se han investigado para determinar su valor diagnóstico para la detección precoz de cáncer de pulmón (Patz *et al.*, 2010. *J Thorac Oncol* 5, 1502-1506; Hoffman *et al.*, 2000, *Lancet* 355, 479-485). Aunque estas pruebas varían en su sensibilidad y especificidad, sólo la tomografía computarizada de tórax de baja dosis ha demostrado reducir el cáncer de pulmón específico mortalidad (Manser *et al.*, 2003. *Thorax* 58, 784-789; Manser *et al.*, 2004. *Cochrane Database Syst Rev* CD001991). En esta invención se localizan marcadores proteínicos implicados en la inflamación, que participan en la patogenia de las dos más frecuentes y devastadoras enfermedades respiratorias asociadas a fumadores, cáncer de pulmón y EPOC.

En el estudio de validación y utilizando grupos de control similares, las curvas ROC mostraron los niveles de corte óptimos para el diagnóstico en LBA fueron 42 pg/ml

20

para IL-11 y 39,5 pg/ml para CCL-1. La precisión diagnóstica de adenocarcinoma fue confirmada por cada biomarcador. Incluso hubo una correlación positiva entre los niveles en LBA de IL-11 y CCL-1, la medición de ambas proteínas optimizó la sensibilidad y la especificidad del diagnóstico a niveles del 90% y del 89%,
5 respectivamente. Curiosamente, ambas proteínas fueron predictivos similares de adenocarcinoma, sin la presencia de EPOC concurrente. Los resultados de la presente invención resultados sugieren firmemente diferencias a nivel inflamatorio entre ambos subtipos histológicos (SCC y adenocarcinoma).

10 Además, existe una correlación entre los niveles de expresión elevados de IL-11 con la proliferación celular, invasividad, metástasis y mal pronóstico.

CCL-1 actúa como un potente quimioatrayente de monocitos y linfocitos y se cree que desempeña un papel importante en los procesos inflamatorios (Harpel *et al.*, 2002. *Isr Med. Assoc. J.* 4, 1025-1027). Recientemente, el seguimiento de múltiples reacciones, una cromatografía líquida de alto rendimiento siguiendo el método de espectrometría de masas en tándem, puede permitir la validación de biomarcadores. El funcionamiento de estas proteínas en el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales (por ejemplo, adenocarcinoma de pulmón mesotelioma v v adenocarcinoma
15 de otros orígenes v no tumoral) también sería de valor.
20

La presente invención indica que la determinación de los niveles de CCL-1 y IL-11 de las muestras de LBA por un ensayo fácil, tal como ELISA, podría mejorar el diagnóstico de adenocarcinoma de pulmón en los fumadores de alto riesgo, a pesar de
25 la presencia o ausencia de la EPOC.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso simultáneo de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de la lista que consiste en IGFBP1, MIP1 β , CCL-1, MIG, PDGFAA, GDF-15, VEGF y EGF, para la predicción, diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos en:
- 5
- a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón,
 - b) individuos con EPOC,
 - c) individuos con adenocarcinoma,
 - 10 d) individuos con carcinoma escamoso,
 - e) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o
 - f) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.
- 2.- El uso según la reivindicación anterior, que además comprende las citoquinas y los factores de crecimiento IL-6sR, IL-1a, IL-11, EOTAXIN-2, TNFRI, TNFRII, IGFBP2, MCP1 e GDF-15.
- 15
- 3.- El uso de IL-11 y CCL-1 según la reivindicación 2 para predecir o pronosticar, o para el diagnóstico temprano de adenocarcinoma de pulmón en un individuo.
- 20
- 4.- El uso de IL-11 y CCL-1 según la reivindicación anterior, donde el individuo es fumador.
- 5.- Un método de obtención de datos útiles, para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos en a) individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón, b) individuos con EPOC, c) individuos con adenocarcinoma, d) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o e) individuos con EPOC y carcinoma escamoso, que comprende:
- 25
- i) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
 - ii) cuantificar el producto de expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de la lista que consiste en: *IGFBP1, MIP1 β , CCL-1, MIG, PDGFAA, GDF-15, VEGF y EGF.*
- 30
- 6.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:
- iii) comparar las cantidades obtenidas en el paso (ii) con una cantidad de referencia.
- 35

- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, que además comprende cuantificar el producto de expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento IL-6sR, IL-1a, IL-11, EOTAXIN-2, TNFRI, TNFR2, IGFBP2, y MCP-1.
- 5 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde los pasos (ii) y/o (iii) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados.
- 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde la muestra biológica es fluido broncoalveolar.
- 10 10.-El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, donde la cuantificación se hace mediante un inmunoensayo.
- 15 11.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-10, donde el inmunoensayo es un ELISA.
- 12.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-11, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos sin EPOC ni cáncer de pulmón, cuando no presenta expresión de los genes *IGFBP1*, *MIP1 β* , *CCL-1*, *MIG* y *PDGFAA*.
- 20 12.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-11, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con EPOC ni cáncer de pulmón, cuando no presenta expresión de los genes *IGFBP1*, *MIP1 β* , *CCL-1*, *MIG* y *PDGFAA*.
- 25 13.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-12, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con adenocarcinoma, cuando presenta un aumento del producto de expresión de los genes *IL-11* y/o *CCL-1*, en relación a una cantidad de referencia.
- 30 14.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-13, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con EPOC cuando se detecta la expresión de *MIG*, y no se detecta la expresión de *CCL-1* e *IGFBP1*.
- 35

15.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-14, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con adenocarcinoma cuando se detecta la expresión de *CCL-1*, y la cantidad de expresión de *MIP1 β* es menor a 20 pg/ml.

16.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-15, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con carcinoma escamoso cuando se detecta la expresión de *PDGFAA* o *MIP1 β* a cualquier nivel, y no se detecta la expresión de *CCL-1*.

17.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-16, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con EPOC y adenocarcinoma cuando se detecta la expresión de *CCL-1* a cualquier nivel, y la expresión de *VEGF* es menor de 200 pg/ml.

18.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 5-17, y que además comprende asignar al individuo del paso (i) al grupo de individuos con EPOC y carcinoma escamoso cuando se detecta la expresión de *GDF-15* y de *VEGF* superior a 50 pg/ml y 200pg/ml respectivamente, y no se detecta la expresión de *CCL-1* ni *EGF*.

19.- El uso de una composición farmacéutica que comprende un principio activo que se selecciona de entre un agonista β 2, un anticolinérgico, un compuesto del grupo de los corticoesteroides, un inhibidor de la fosfodiesterasa y un supresor del sistema inmune, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo con EPOC identificable por el método según cualquiera de las reivindicaciones 5-18.

20.- El uso de una composición farmacéutica que comprende un principio activo que se selecciona de entre complejos de coordinación de platino (cisplatino o carboplatino), gemcitabine, paclitaxel, docetaxel, etopósido, vinorelbina, pemetrexed, gefitinib, erlotinib, bevacizumab, o cualquiera de sus combinaciones, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo con adenocarcinoma y

carcinoma escamoso, asociado o no a EPOC, identificables por el método según cualquiera de las reivindicaciones 5-18.

21.- Un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit de la invención, que comprende los
5 elementos necesarios para cuantificar el producto de expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de entre *IGFBP1*, *MIP1 β* , *CCL-1*, *MIG*, *PDGFAA*, *GDF-15*, *VEGF* y *EGF*.

22.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que además comprende las
10 herramientas necesarias para cuantificar el producto de expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento *IL-6sR*, *IL-1a*, *IL-11*, *EOTAXIN-2*, *TNFR1*, *TNFR2*, *IGFBP2*, y *MCP1*.

23.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 21-22, que
15 comprende las herramientas necesarias para cuantificar el producto de expresión de las citoquinas y de los factores de crecimiento CCL-1 y/o IL-11.

24.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 21-23, que
comprende los anticuerpos anti-CCL-1 y anti-IL-11.

20 25.- El kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 21-24, que comprende los anticuerpos anti-IGFBP1, anti-MIP-1B, anti-CCL-1, anti-MIG, anti-PDGFAA, anti-GDF-15, anti-VEGF o anti-EGF.

25 26.- El kit o dispositivo según la reivindicación 25, que además comprende los anticuerpos anti-IL-6sR, anti-IL-1a, anti-IL-11, anti-EOTAXIN-2, anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti-IGFBP2, y anti-MCP1.

27.- El uso de un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 21 -26, para
30 llevar a cabo un método según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 5 - 18.

28.- Un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende
35 instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 5-18.

- 29.- El medio de almacenamiento según la reivindicación anterior, que comprende los anticuerpos anti-IGFBP1, anti-MIP-1B, anti-CCL-1, anti-MIG, anti-PDGFAA, anti-GDF-15, anti-VEGF o anti-EGF.
- 5 30.- El medio de almacenamiento según la reivindicación 29, que además comprende los anticuerpos anti-IL-6sR, anti-IL-1a, anti-IL-11, anti-EOTAXIN-2, anti-TNFR1, anti-TNFR2, anti-IGFBP2, y anti-MCP1.
- 10 31.- El medio de almacenamiento según la reivindicación 28, que comprende oligonucleótidos o micromarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes *IGFBP1*, *MIP1 β* , *CCL-1*, *MIG*, *PDGFAA*, *GDF-15*, *VEGF* y *EGF*.
- 15 32.- El medio de almacenamiento según la reivindicación 31, que comprende oligonucleótidos o micromarreglos de canal único diseñados a partir de una secuencia conocida o un ARNm de los genes *IL-6sR*, *IL-1a*, *IL-11*, *EOTAXIN-2*, *TNFR1*, *TNFR2*, *IGFBP2*, y *MCP1*.
- 20 33.- Una señal transmisible que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 5-18.

FIG. 1

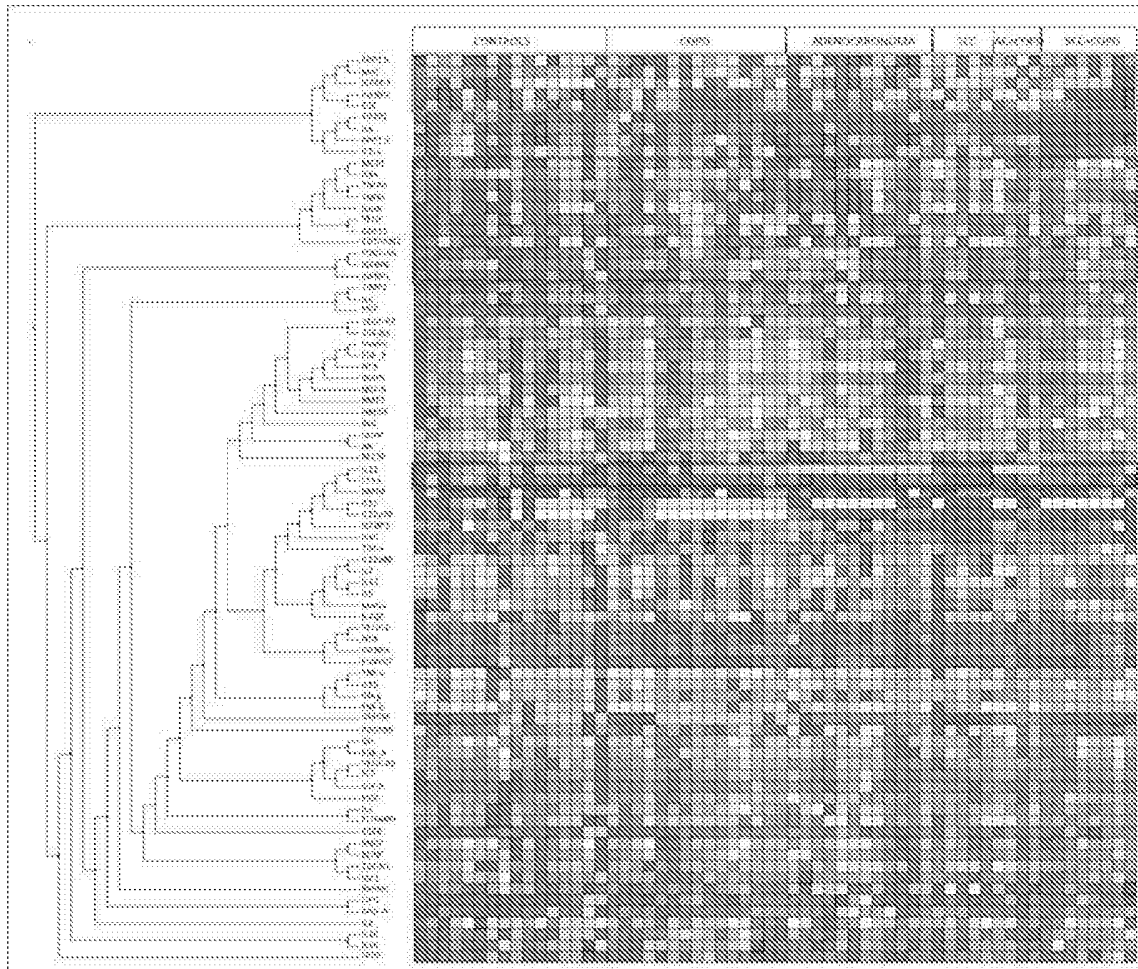


FIG. 2

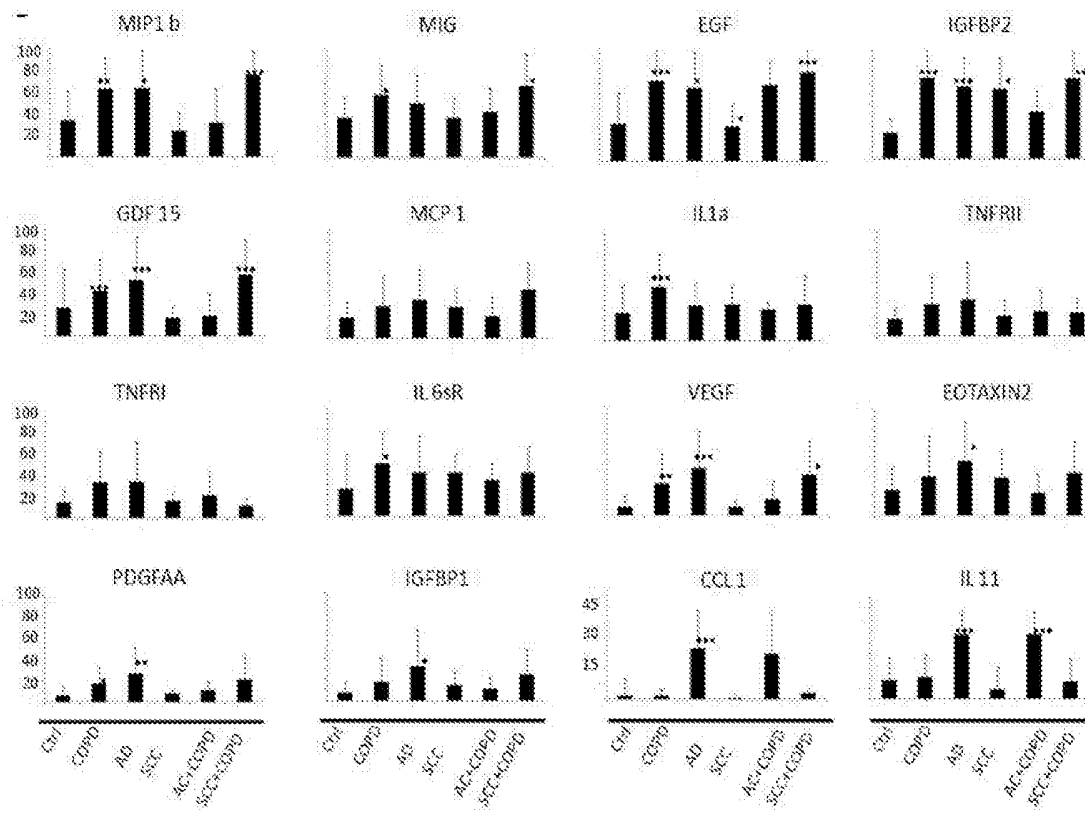


FIG. 3A

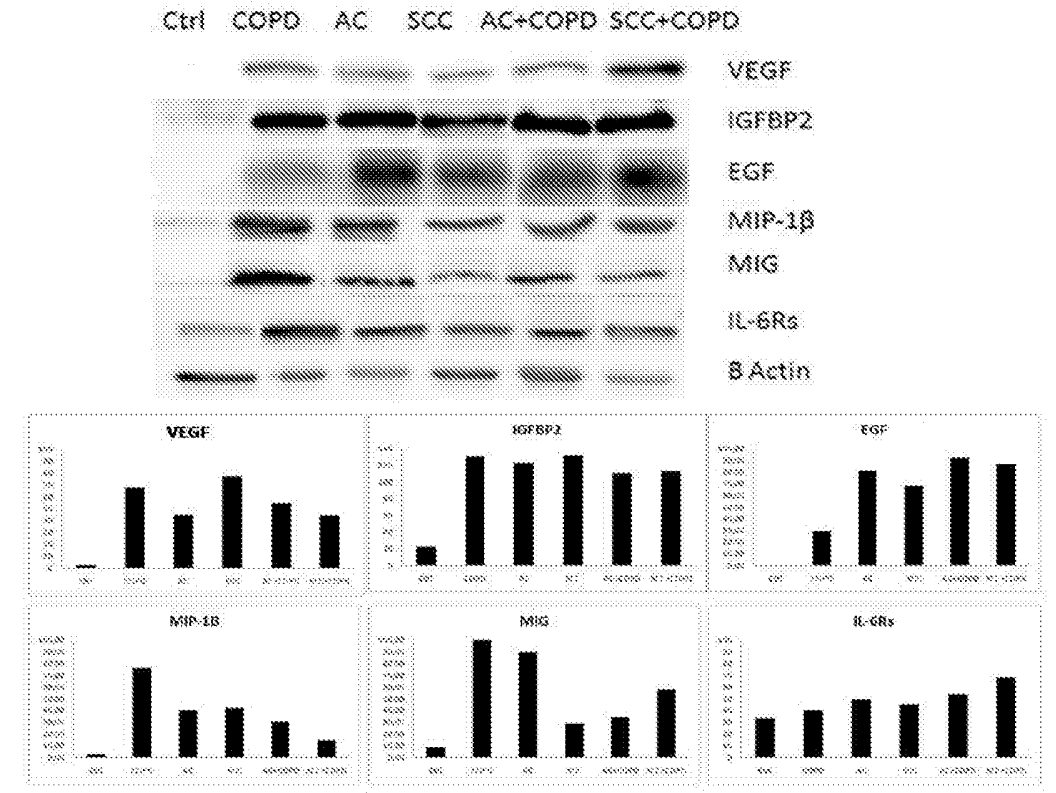


FIG. 3B

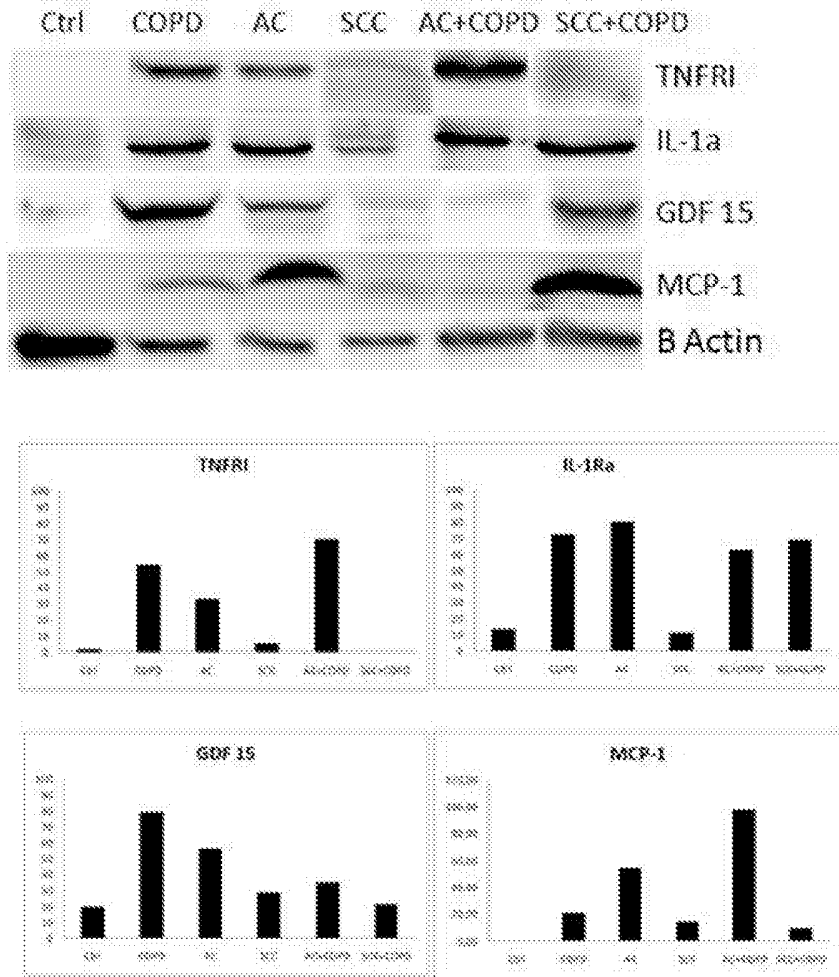


FIG. 3C

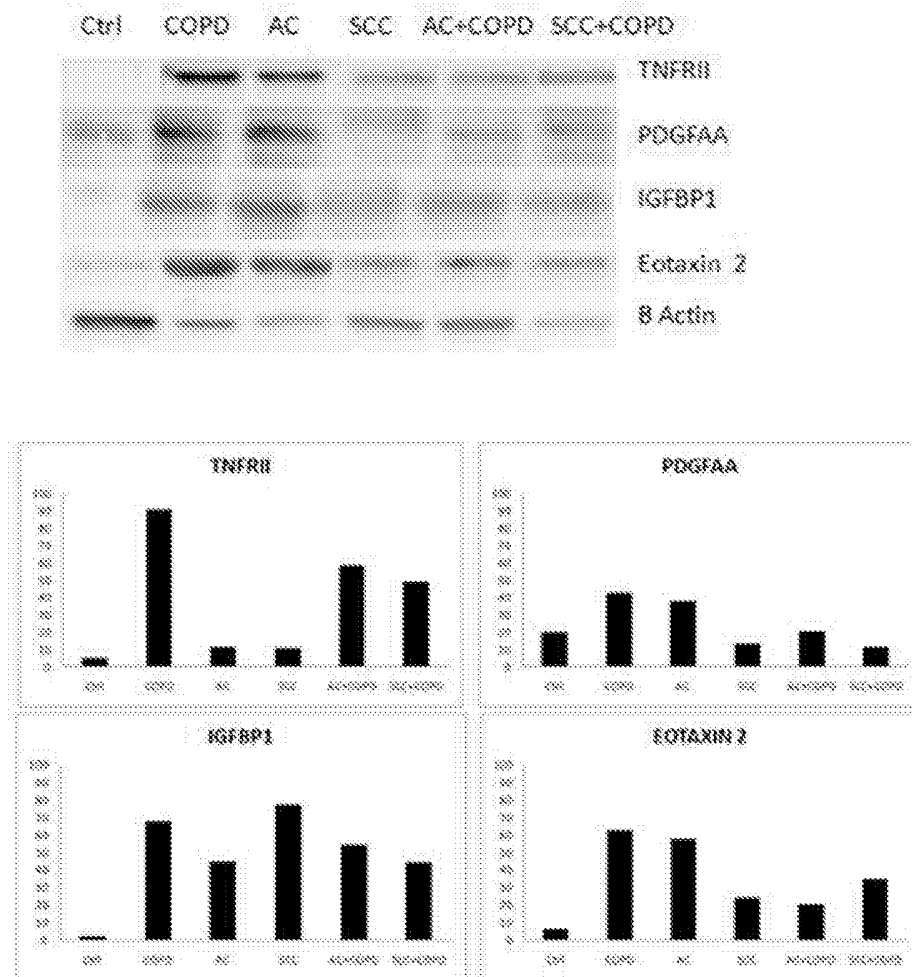


FIG. 3D

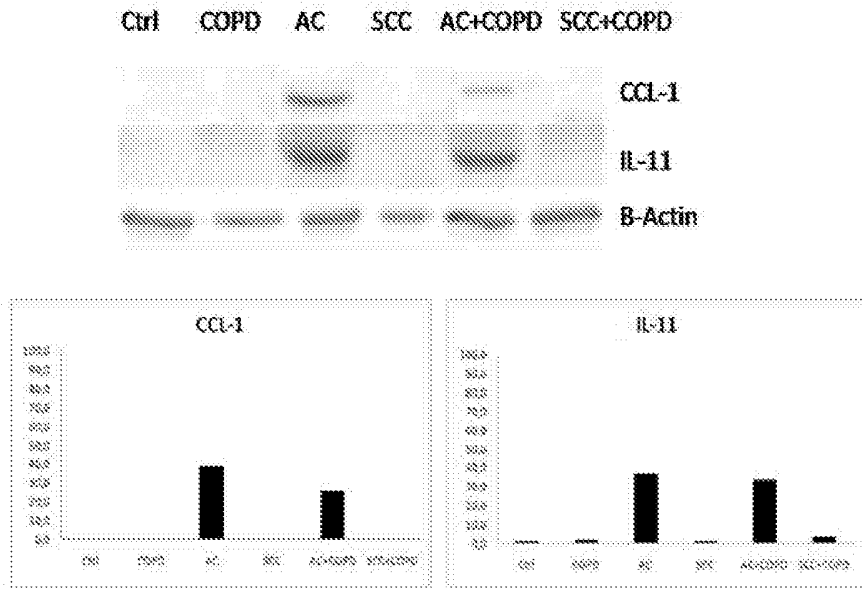


FIG. 4

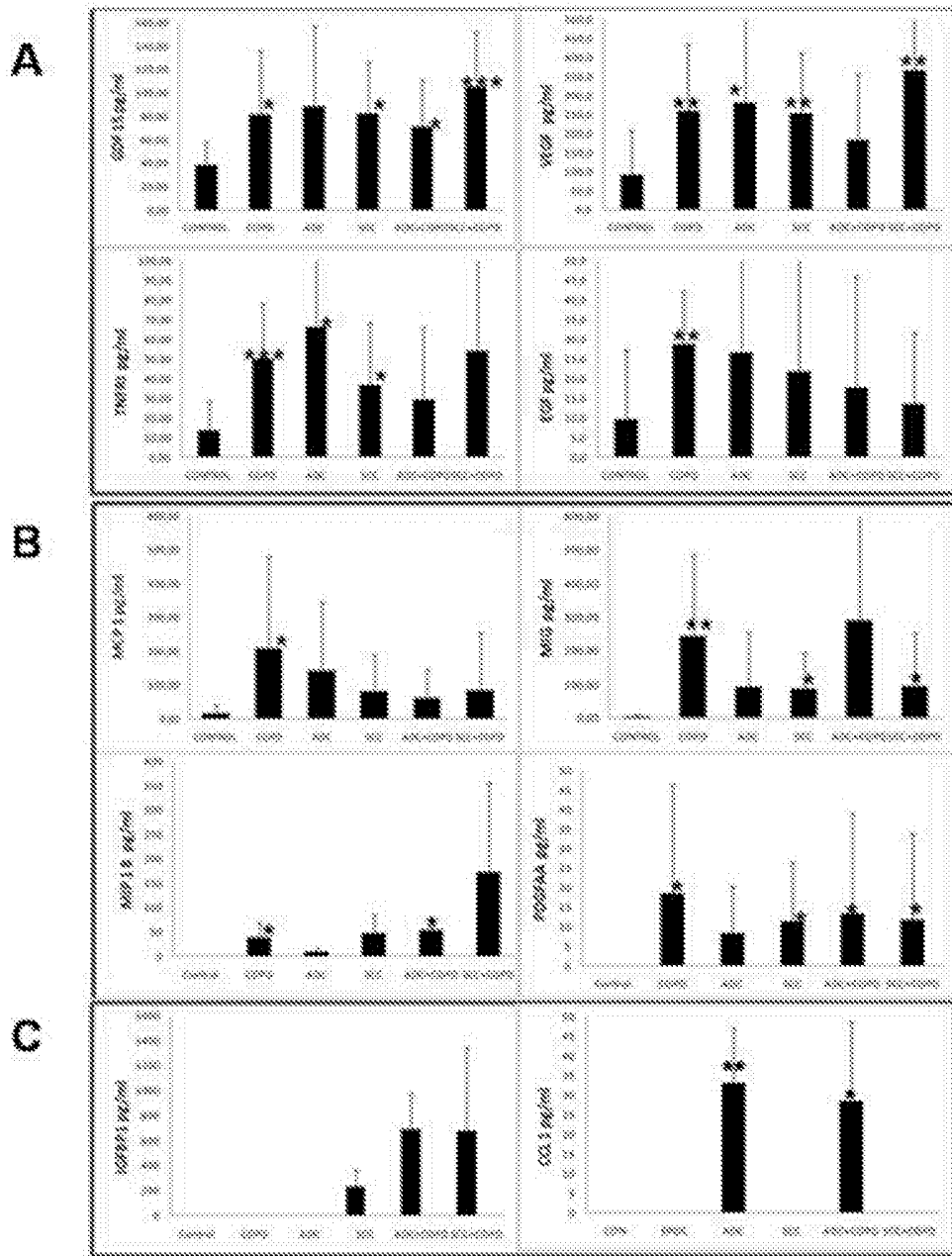


FIG. 5

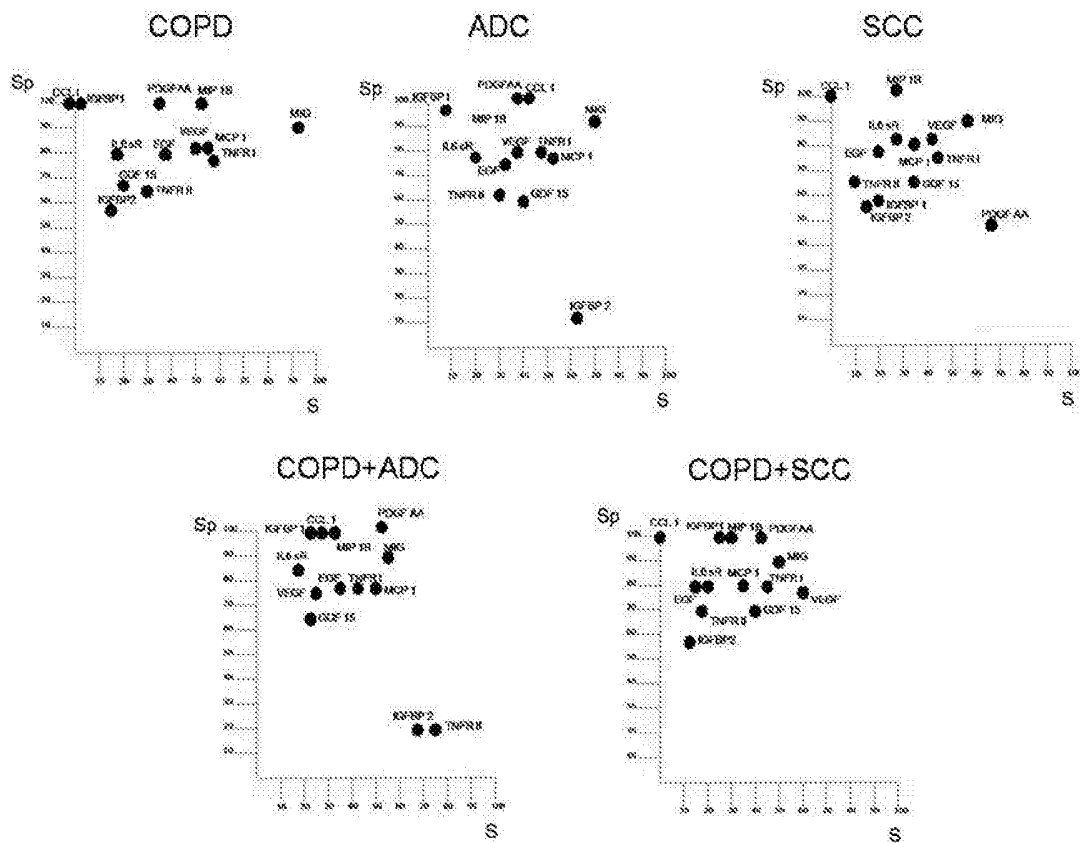


FIG. 6

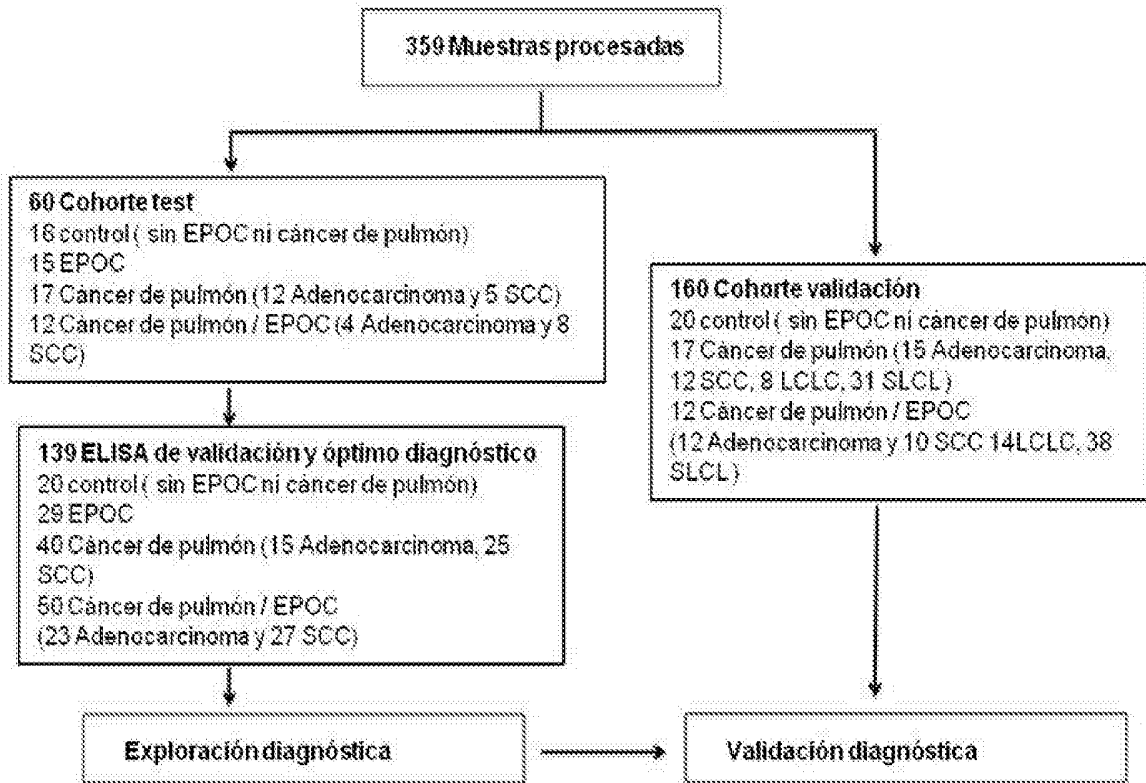


FIG. 7B

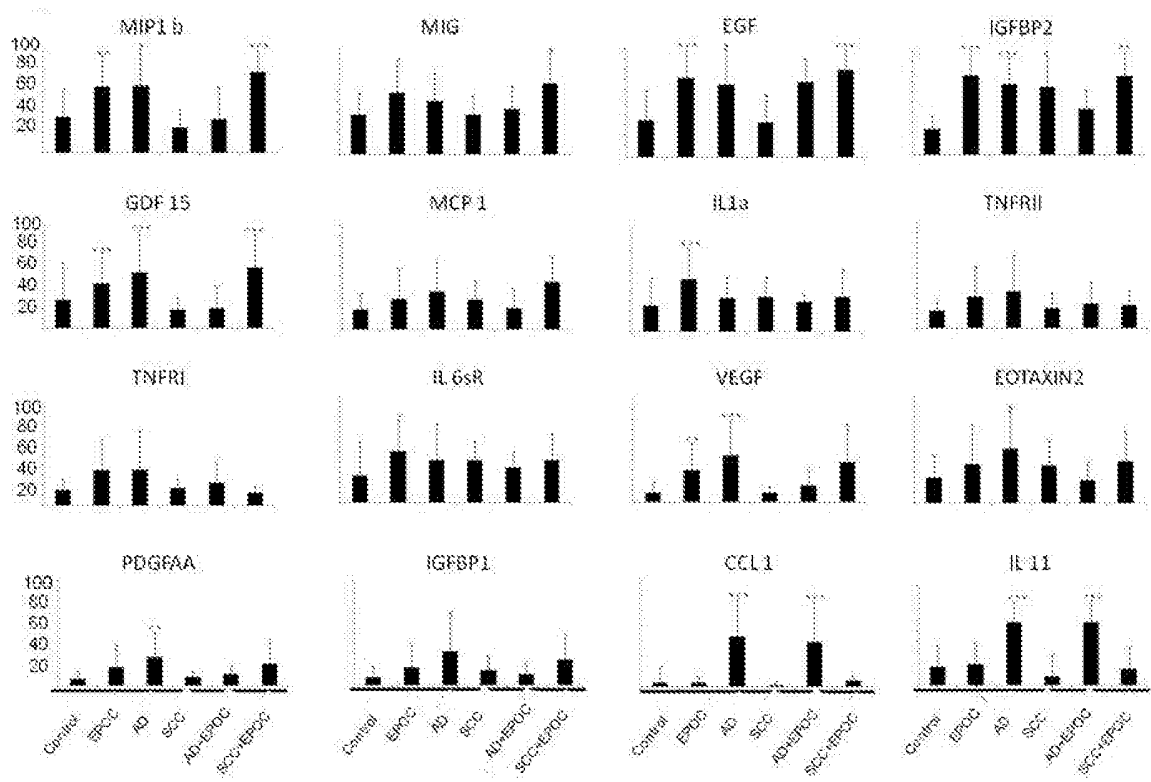
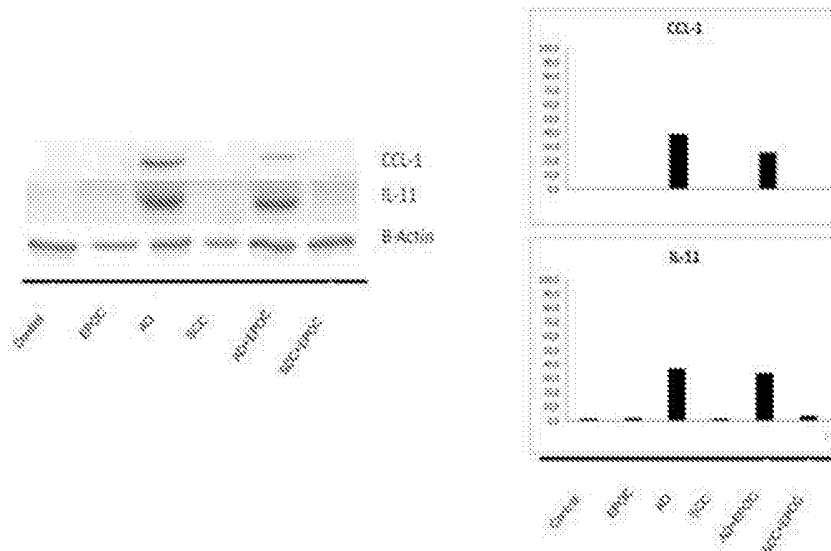
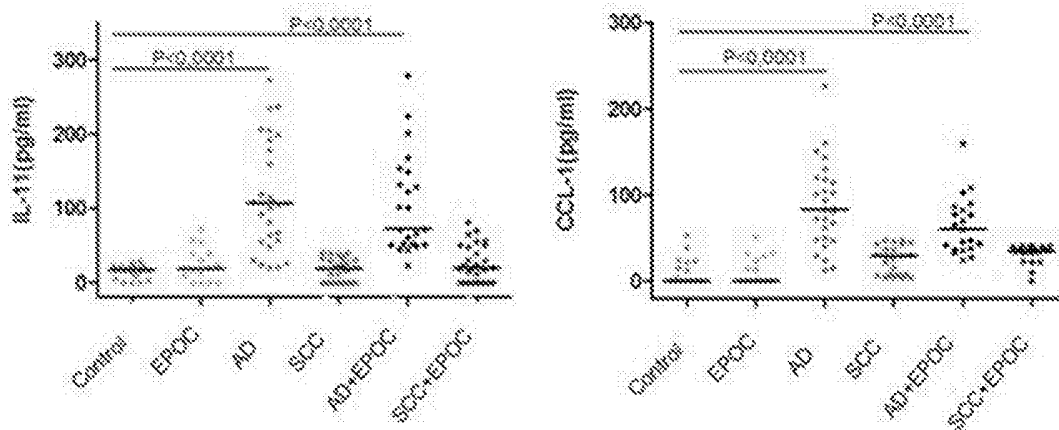


FIG. 8

A



B



C

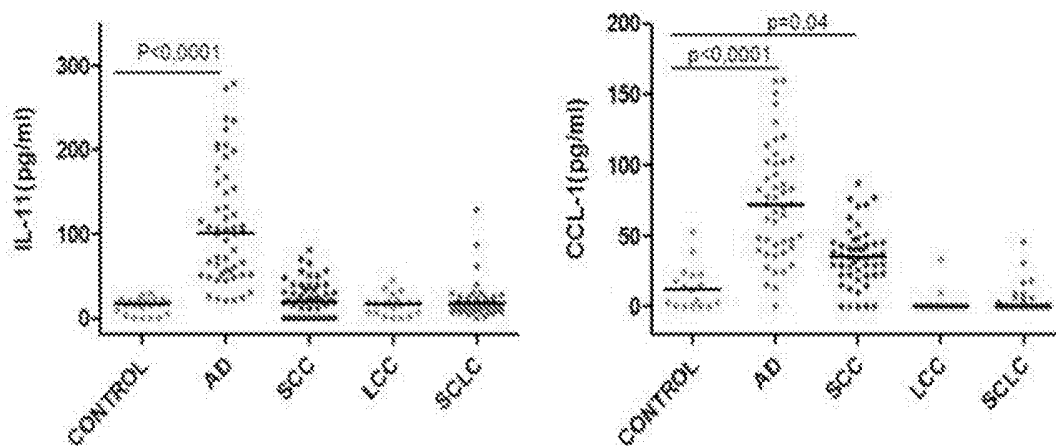
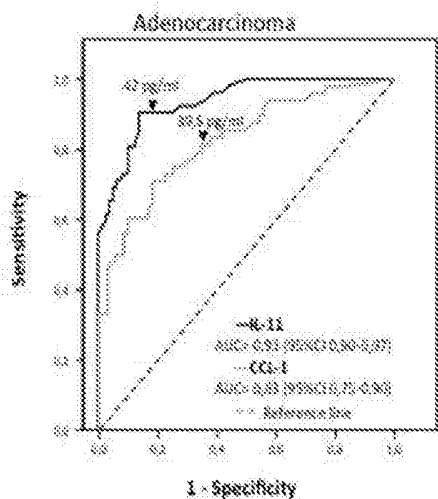


FIG. 9

A



B

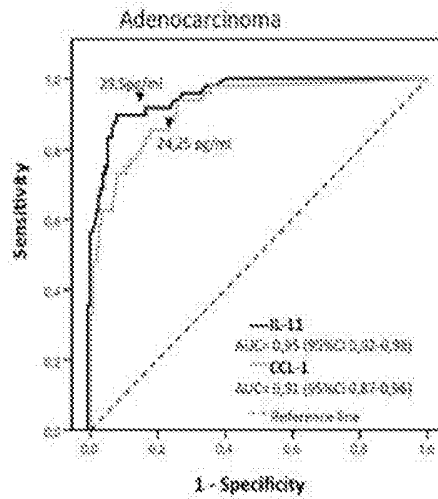
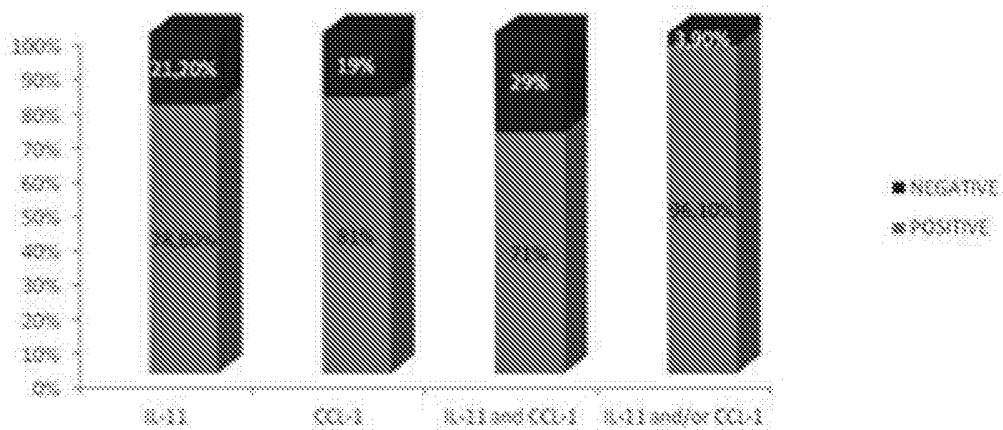
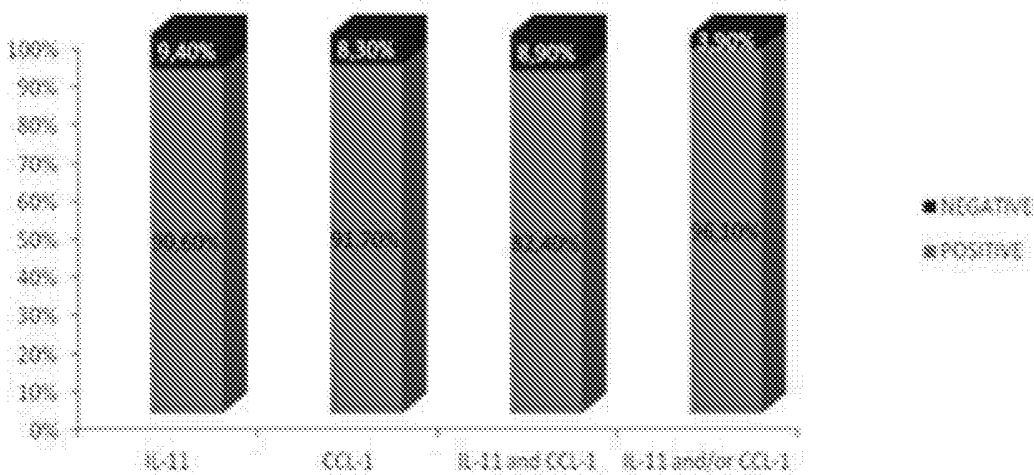


FIG. 10

A



B



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070364

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**G01N33/68** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	2010, JIANG F. et al. A Panel of Sputum-Based Genomic Marker for Early Detection of Lung Cancer. Cancer Prevention Research. 2010. Vol. 3(12), pages: 1571-1578, the whole document.	1, 2, 5-18, 25-33
A	2007, PINTO-PLATA VM. et al. Systemic Cytokines, Clinical and Physiological Changes in Patients Hospitalized for Exacerbation of COPD. CHEST. 2007. Vol. 131(1), pages: 37-43, the whole document.	1, 2, 5-18, 25-33
A	2011, MOERMANS C. et al. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease. Cytokine. 2011. Vol. 56, pages: 298-304, the whole document.	1, 2, 5-18, 25-33

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
17/10/2013Date of mailing of the international search report
(23.10.2013)

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04Authorized officer
M. García Grávalos

Telephone No. 91 3493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070364

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	2001, TAKIZAWA H. et al. Increased Expression of Transforming Growth Factor-b1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001. Vol. 163, pages: 1476-1483, the whole document.	1, 2, 5-18, 25-33
A	ES 2263228 T3 (TEIJIN LIMITED) 01.12.2006, page 2, line 15; page 3, line 39; claims 1, 2, 4 and 5.	1, 2, 5-18, 25-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070364

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 3, 4, 19-24
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
The subject matter of claims 3, 4 and 19 to 24 fails to meet the requirements of PCT Article 6 in respect of clarity and conciseness to such an extent that it is impossible to carry out a meaningful search on the basis of these claims, for the following reasons: lack of clarity and technical features.

3. Claims Nos.: 3 and 4
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2013/070364

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2263228T T3	01.12.2006	HK1032077 A1	15.09.2006
		US6346385 B1	12.02.2002
		WO9931271 A1	24.06.1999
		JP4031199B B2	09.01.2008
		EP1043406 A1	11.10.2000
		EP1043406 A4	04.11.2002
		DE69834949T T2	24.05.2007
		DE69834949T T8	09.10.2008
		CN1285002 A	21.02.2001
		CN1222615C C	12.10.2005
		CA2315218 A1	24.06.1999
		CA2315218 C	20.03.2007
		AU1682399 A	05.07.1999
		AU747991B B2	30.05.2002
		AT330029T T	15.07.2006

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070364

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/68 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	2010, JIANG F. et al. A Panel of Sputum-Based Genomic Marker for Early Detection of Lung Cancer. Cancer Prevention Research. 2010. Vol. 3(12), páginas: 1571-1578, todo el documento.	1, 2, 5-18, 25-33
A	2007, PINTO-PLATA VM. et al. Systemic Cytokines, Clinical and Physiological Changes in Patients Hospitalized for Exacerbation of COPD. CHEST. 2007. Vol. 131(1), páginas: 37-43, todo el documento.	1, 2, 5-18, 25-33
A	2011, MOERMANS C. et al. Local and systemic cellular inflammation and cytokine release in chronic obstructive pulmonary disease. Cytokine. 2011. Vol. 56, páginas: 298-304, todo el documento.	1, 2, 5-18, 25-33

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
17/10/2013

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
23 Octubre 2013 (23.10.2013)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
M. García Grávalos
Nº de teléfono 91 3493404

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (continuación del punto 1.c de la primera hoja)

1 En lo que se refiere a **las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

en papel

en formato electrónico

b. Cuando

en la solicitud internacional tal y como se presentó

junto con la solicitud internacional en formato electrónico

posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070364

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	2001, TAKIZAWA H. et al. Increased Expression of Transforming Growth Factor-b1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD). American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001. Vol. 163, páginas: 1476-1483, todo el documento.	1, 2, 5-18, 25-33
A	ES 2263228 T3 (TEIJIN LIMITED) 01.12.2006, página 2, línea 15; página 3, línea 39; reivindicaciones 1, 2, 4 y 5.	1, 2, 5-18, 25-33

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2013/070364

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones n°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones n°s: 3, 4, 19-24
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
El objeto de las reivindicaciones 3, 4, 19-24 no alcanza a cumplir los requisitos de claridad y concisión del Artículo 6 del PCT hasta tal extremo que una búsqueda significativa, basada en esas reivindicaciones, resulta imposible por las siguientes razones: acusar falta de claridad y características técnicas.

3. Las reivindicaciones n°s: 3 y 4
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4(a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.

2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.

3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°s:

4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido para ello.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070364

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2263228T T3	01.12.2006	HK1032077 A1	15.09.2006
		US6346385 B1	12.02.2002
		WO9931271 A1	24.06.1999
		JP4031199B B2	09.01.2008
		EP1043406 A1	11.10.2000
		EP1043406 A4	04.11.2002
		DE69834949T T2	24.05.2007
		DE69834949T T8	09.10.2008
		CN1285002 A	21.02.2001
		CN1222615C C	12.10.2005
		CA2315218 A1	24.06.1999
		CA2315218 C	20.03.2007
		AU1682399 A	05.07.1999
		AU747991B B2	30.05.2002
		AT330029T T	15.07.2006
