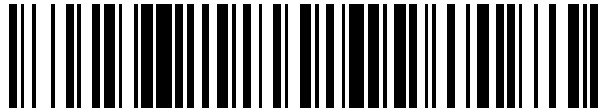


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **2 437 240**

21) Número de solicitud: 201230874

51) Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22) Fecha de presentación:

**05.06.2012**

43) Fecha de publicación de la solicitud:

**09.01.2014**

71) Solicitantes:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (33.3%)**

**Avda. de la Constitución, 18**

**41071 Sevilla ES;**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (33.3%) y**

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA (33.3%)**

72) Inventor/es:

**PAZ-ARES GONZAGA, Luis Gonzalo;**

**PASTOR HERRERA, María Dolores;**

**MOLINA PINELO, Sonia;**

**CARNERO MOYA, Amancio;**

**SALINAS, Ana y**

**BARBOSA DE SOUZA NOGAL, Ana**

74) Agente/Representante:

**ILLESCAS TABOADA, Manuel**

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 cáncer de pulmón**

57) Resumen:

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.

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 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. La presente invención describe además un kit de diagnóstico, así como un dispositivo y sus usos para el diagnóstico, pronóstico y clasificación de los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o cáncer de pulmón según se ha indicado anteriormente.

ES 2 437 240 A1

## DESCRIPCIÓN

### 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
  - individuos con EPOC
  - individuos con adenocarcinoma
  - 10 - individuos con carcinoma escamoso
  - individuos con EPOC y adenocarcinoma.
  - individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

### ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 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%.

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

40 Las citoquinas son un diverso grupo de proteínas que incluyen citoquinas pro-inflamatorias, citoquinas derivadas de las células T, citoquinas quimiotácticas (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 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-13, IP-10, INF- $\gamma$ , MCP-1 y TNF- $\alpha$ ) en muestras obtenidas mediante inducción de esputo en comparación con los controles sanos. Siguiendo esta línea, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$ - (TNF- $\alpha$ ) y los receptores solubles del TNF, se incrementan en el esputo de los pacientes con EPOC en comparación con los fumadores sanos.

50 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.

55 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 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.

60

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

65 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.

5 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:

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

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

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

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

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:

- 40 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
- 45 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.

55 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 $\beta$ , 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).

65

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).

5 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.

10 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 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.

15 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 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 secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

20 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 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 obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

30 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 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.

40 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.

45 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, d) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o e) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

50 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.

55 La forma soluble del receptor de la interleuquina 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. 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.

5 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,

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 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

15 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 interleuquina 1, alpha (L-1A, IL1, IL1-ALPHA, IL1F1, IL-1 alpha; hematopietin-1; interleukin-1 alpha; preinterleukin 1 alpha; pro-interleukin-1-alpha), se encuentra en el cromosoma 2 (2q14). codifica para una proteína que es miembro de la familia de citoquinas 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 interleuquina 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.

20 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:

30 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,

35 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.

40 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 citoquinas 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:

45 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,

50 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.

55 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). codifica para una proteína que es miembro de la familia de citocinas 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.

65 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 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,

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: 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 secuencia del GenBank (NCBI) NM\_002981.1 o SEQ ID NO: 7.

10 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), member 24; small-inducible cytokine A24), se encuentra en el cromosoma 17 (17q11.23). codifica para una proteína que es miembro de la familia de citocinas 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.

20 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,

25 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: 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.

35 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 cromosoma 7 (7p22). 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 plaquetas, donde los dímeros están conectados por puentes disulfuro. Se han identificado dos variantes de splicing para este gen.

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

45 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),

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

50 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 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.

55 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-RI; 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). codifica para una 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 interactúan con este receptor, y por tanto juegan un papel en la transducción de la señal mediada por receptor.

65

En el contexto de la presente invención, TNFRI 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:

- 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 TNFRI. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la secuencia del GenBank (NCBI) NM\_001065.3 o SEQ ID NO: 13.

El gen TNFRII ó *tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B* (TNFRSF1B, CD120b, TBPII, TNF-R-II, TNF-R75, TNFBR, 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) 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.

En el contexto de la presente invención, TNFRII 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:

- 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,
- 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 TNFRII. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en la 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.

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:

- 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,
- 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 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-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).

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:

- 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,

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 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 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:

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 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 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; monocyte chemoattractant protein 1; monocyte chemoattractant protein-1; monocyte chemotactic and 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).

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:

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,  
 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 secuencia del GenBank (NCBI) NM\_002982.3 o SEQ ID NO: 23.

El gen IGFBP2 ó *nsulin-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).

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:

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 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 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: 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.

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 de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de la proteína recogida en la SEQ ID NO: 34, 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: 34,
- 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: 34, 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: 33.

En otra realización preferida, la detección de la cantidad de cualquiera 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 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 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.

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. 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 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. 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 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  $^{32}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , 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 $\beta$* , *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 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 $\beta$*  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 $\beta$*  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.

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*.

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.

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 a través de un nebulizador.

Hay dos tipos principales de broncodilatadores, los agonistas  $\beta_2$  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  $\beta_2$  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).

#### Agonistas $\beta_2$

Los agonistas  $\beta_2$  estimulan los receptores en el músculo liso bronquial, haciendo que se relaje. Hay varios  $\beta_2$  agonistas disponibles. El salbutamol (nombre de marca común: Ventolin) y la terbutalina son ampliamente utilizados como agonistas  $\beta_2$  de acción corta, proporcionando un alivio rápido de los síntomas de la EPOC. Los agonistas  $\beta_2$  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.

*Los anticolinérgicos*

5 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.

*Los corticosteroides*

10 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.

15 *Otros medicamentos*

20 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*

25 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 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.

*Tratamiento de cáncer de pulmón*

35 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.

*Cirugía*

40 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.

45 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).

50 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.

55 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 CPCP está siendo reconsiderada. La cirugía puede mejorar los resultados cuando se añade a la quimioterapia y la radiación en la etapa temprana.

60 *Radioterapia*

65 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 postoperatoria en general, no se debe utilizar después de la cirugía con intención curativa para el carcinoma de pulmón de células no pequeñas.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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).

#### Quimioterapia

25 El régimen de quimioterapia depende del tipo de tumor.

#### Carcinoma de pulmón de células pequeñas

30 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.

#### Carcinoma de pulmón de células no pequeñas

35 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.

40 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.

#### *La quimioterapia adyuvante*

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

50 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.

#### Quimioterapia

60 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.

#### *La terapia dirigida*

65 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.

5 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 con mutaciones específicas en el EGFR.

10 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.

15 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.

25 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  $\beta_2$ , 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.

30 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.

35 Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "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.

45 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*, *TNFRI*, *TNFRII*, *EGF*, *MIP-1B*, *MIG*, *MCP-1*, *IGFBP2*, *IGFBP1*, *GDF-15*, *VEGF* o cualquiera de sus combinaciones.

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

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-TNFRI, anti-TNFRII, 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.

60 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.

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.

65

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, d) individuos con EPOC y adenocarcinoma, o e) individuos con EPOC y carcinoma escamoso.

5 .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).

10 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 cualquiera de sus combinaciones. En otra realización más preferida, el medio de almacenamiento legible por un ordenador comprende los anticuerpos anti-IGFBP1, anti-MIP1 $\beta$ , anti-CCL-1, anti-MIG, anti-PDGFAA, anti-GDF-15, anti-VEGF y anti-EGF

15 Los métodos de la invención pueden incluir etapas adicionales, como por ejemplo, la 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 proteínas.

20 En otra realización preferida, el medio de almacenamiento legible por un ordenador comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de una 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 $\beta$* , *CCL-1*, *MIG*, *PDGFAA*, *VEGF* y *EGF*.

30 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 fotomáscara. La fotomáscara puede ser física o virtual.

35 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 emplean aproximadamente unos 40 oligonucleótidos por gen.

40 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), 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.

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

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

55 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 codificantes, química o bioquímicamente modificados.

60 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**

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

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

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

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

**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.

15

**EJEMPLOS****EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

20

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

**Pacientes y muestras**

25 Se han analizado un total de 141 muestras de lavado broncoalveolar (LAB), 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.

30 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 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.

35

40 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 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 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**

45 Los experimentos se realizaron en aproximadamente 4.8 ml de muestra. Debido a su bajo contenido en proteínas, las muestras de LAB 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 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**

55

60 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 análisis de anticuerpos se realizó de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, la 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

65

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.

5 50ug 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-1 $\beta$  (CC14), 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  $\beta$ -actina (1:1000 Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.). Los experimentos se repitieron tres veces de forma independiente.

#### ELISA

25 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 utilizaron ensayos de ELISA sándwich para CCL4/MIP-1 $\beta$ , CXCL9/MIG, IGFBP-2, IGFBP-1, EGF, RI/TNFRSF1A sTNF, RI/TNFRSF1A sTNF, IL-1 RI, IL-6 R $\alpha$ , CCL2/MCP-1, VEGF, GDF-15, CCL24/Eotaxin-2/MIPF-2, CCL1/I-309, IL-11, PDGF-AA (DuoSet, R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, EE.UU.). Todas las muestras se analizaron por duplicado. Los límites de detección para estos ensayos se establecieron entre los 25 y 200 $\mu$ g de proteínas (Anexo II).

30 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 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 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N a cada pocillo para parar la reacción y se lee la absorbancia en un lector de placas a 450 nm (Emax, 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.

45 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 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 (CCL4/MIP-1 $\beta$ , CXCL9/MIG, IGFBP-2, IGFBP-1, EGF, RI/TNFRSF1A sTNF, RI/TNFRSF1A sTNF, IL-1 RI, IL-6 R $\alpha$ , CCL2/MCP-1, VEGF, GDF-15, CCL24/Eotaxin-2/MIPF-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 adenocarcinoma o adenocarcinoma con EPOC.

60 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 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.

65 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 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.

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 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 ayudo 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
<b>Género</b>				
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)
<b>Media de edad [rango]</b>	<b>61,3 [41-80]</b>	<b>61,5 [45-78]</b>	<b>60,7 [46-69]</b>	<b>60,7 [49-68]</b>
<b>Status</b>				
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)
<b>Packs-year</b>	<b>21,82</b>	<b>32,2</b>	<b>35,21</b>	<b>30,78</b>
<b>EPOC</b>				
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)
<b>Cáncer de Pulmón</b>				
ADC	-	-	70,6% (12)	33,3% (14)
SCC	-	-	29,4% (5)	66,7% (8)

Tabla 2. Características de la segunda cohorte de pacientes.

	<b>Control n=10</b>	<b>EPOC n=13</b>	<b>CP n=24</b>	<b>EPOC con CP n=34</b>
<b>Género</b>				
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)
<b>Media de Edad [rango]</b>	52,3 [42-58]	65,2 [51-75]	61,2 [48-75]	64,3 [48-75]
<b>Estatus</b>				
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)
<b>Años</b>	21,82	34,2	33,21	39,78
<b>EPOC</b>				
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)
<b>Cáncer de Pulmón</b>				
ADC	-	-	37,5% (9)	47,0% (16)
SCC	-	-	62,5% (15)	53,0% (18)

5

Tabla 3. Cantidad de proteínas empleadas en el ELISA

<b>PROTEÍNA</b>	<b>µg</b>
<b>GDF-15</b> <b>TNFR1</b> <b>VEGF</b> <b>EGF</b>	25
<b>MIG</b> <b>MCP-1</b> <b>IGFBP-1</b>	50
<b>PDGFAA</b>	75
<b>MIP1β</b>	125
<b>CL-1</b>	200

10

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.

<b>Grupo</b>	<b>CONDICIÓN</b>	<b>P-valor</b>	<b>OR(95%CI)</b>
<b>Control (sin EPOC ni CP)</b>	IGFP1 negativo MIP1B negativo CCL1 negativo MIG negativo PDGFAA negativo	P<0,001	50(5,64-500)
<b>EPOC</b>	IGFP1 negativo CCL1 negativo MIG positivo	0,002	12,071(2,485-58,629)
<b>Adenocarcinoma</b>	CCL1 positivo MIP1B negativo	0,002	20,83(7,69-76,92)
<b>Carcinoma escamoso</b>	CCL1 negativo EGF negativo PDGFAA o MIP1B positivo	0,009	5,88(1,52-22,2)
<b>Adenocarcinoma y EPOC</b>	CCL1 positivo VEGF negativo	0,001	5,31(1,96-14,49)
<b>Carcinoma escamoso y EPOC</b>	GDF 15 positivo VEGF positivo CCL-1 negativo EGF negativo	0,002	9,34(2,19-40)

**REIVINDICACIONES**

- 5 1.- El uso simultáneo de las citoquinas y de los factores de crecimiento que se seleccionan de la lista que consiste en IGFBP1, MIP1 $\beta$ , CCL-1, MIG, PDGFAA, GDF-15, VEGF y EGF, para la predicción, diagnóstico, pronóstico y clasificación de los individuos en:
- 10 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.
- 15 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, TNFR1, TNFR2, IGFBP2, MCP1 e GDF-15.
- 20 3.- 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:
- 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 $\beta$ , CCL-1, MIG, PDGFAA, GDF-15, VEGF y EGF.*
- 25 4.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:
- iii) comparar las cantidades obtenidas en el paso (ii) con una cantidad de referencia.
- 30 5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-4, 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, TNFR1, TNFR2, IGFBP2, y MCP-1.
- 35 6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-5, donde los pasos (ii) y/o (iii) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados.
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde la muestra biológica es fluido brocoalveolar.
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-7, donde la cuantificación se hace mediante un inmunoensayo.
- 40 9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 3-8, donde el inmunoensayo es un ELISA.
- 45 10.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, 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 $\beta$ , CCL-1, MIG y PDGFAA.*
- 50 11.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, 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*.
- 55 12.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, 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 $\beta$*  es menor a 20 pg/ml.
- 60 13.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, 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 $\beta$*  a cualquier nivel, y no se detecta la expresión de *CCL-1*.
- 14.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, 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.

- 15.- Un método de diagnóstico, pronóstico y clasificación de individuos que comprende los pasos (i)-(iii) según cualquiera de las reivindicaciones 3-9, 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*.
- 5
- 16.- Un kit o dispositivo, que comprende los anticuerpos anti-IGFBP1, anti-MIP-1B, anti-CCL-1, anti-MIG, anti-PDGFAA, anti-GDF-15, anti-VEGF o anti-EGF.
- 10
- 17.- El kit o dispositivo según la reivindicación 16, 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.
- 18.- El uso de un kit o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 16 -17, para llevar a cabo un método según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 3 a15.

FIGURA 1

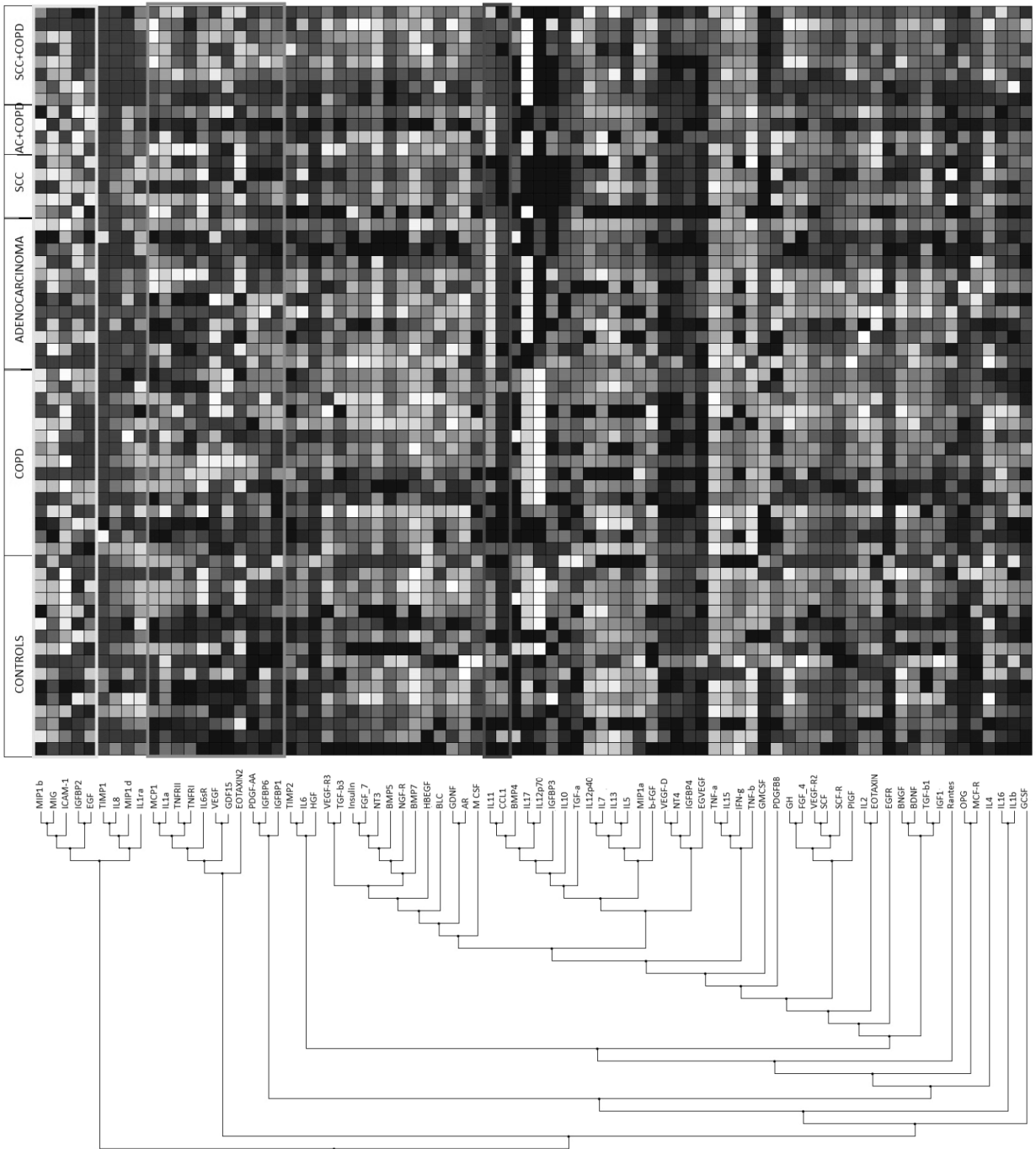


FIGURA 2

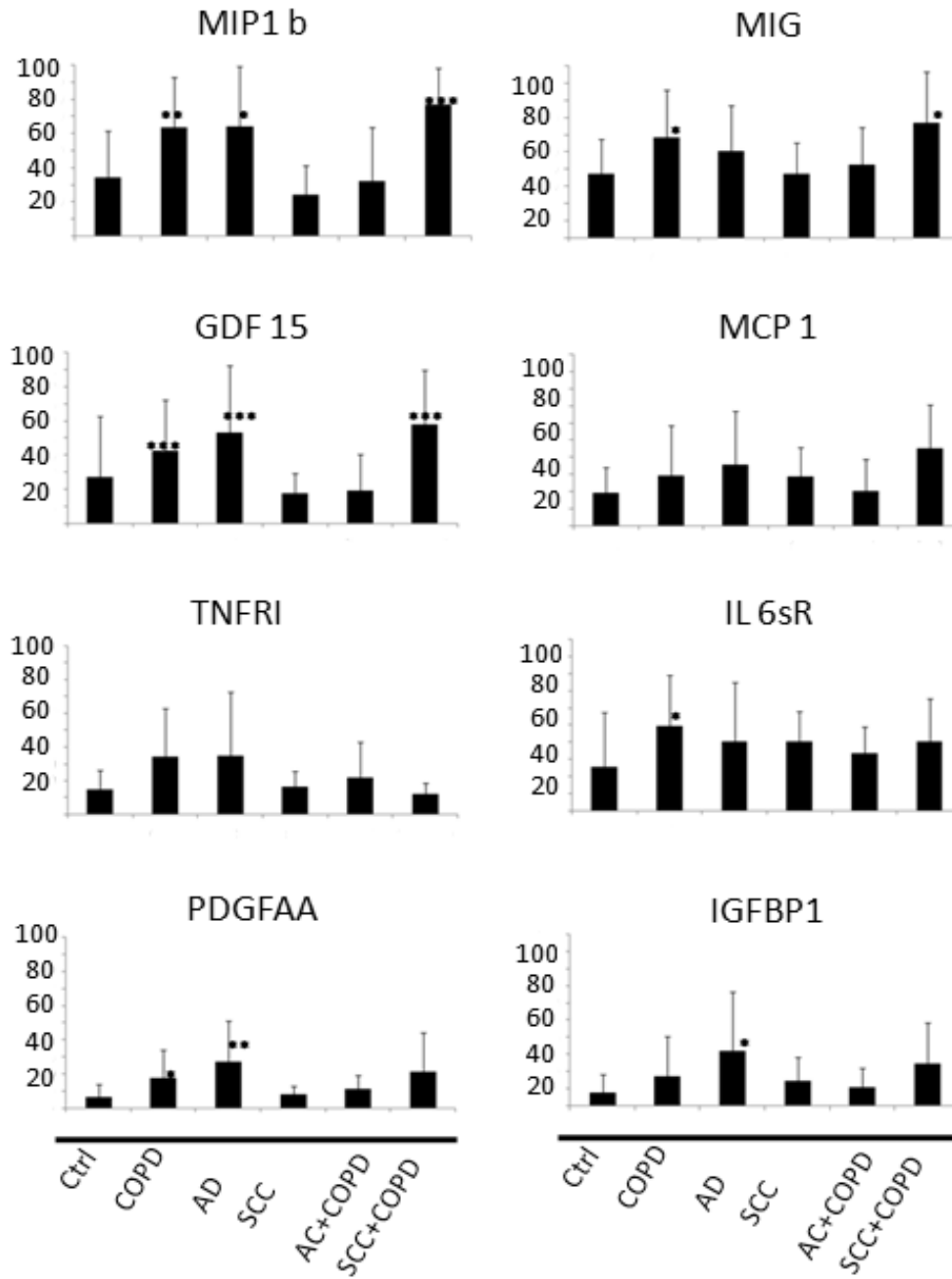


FIGURA 2 (continuación)

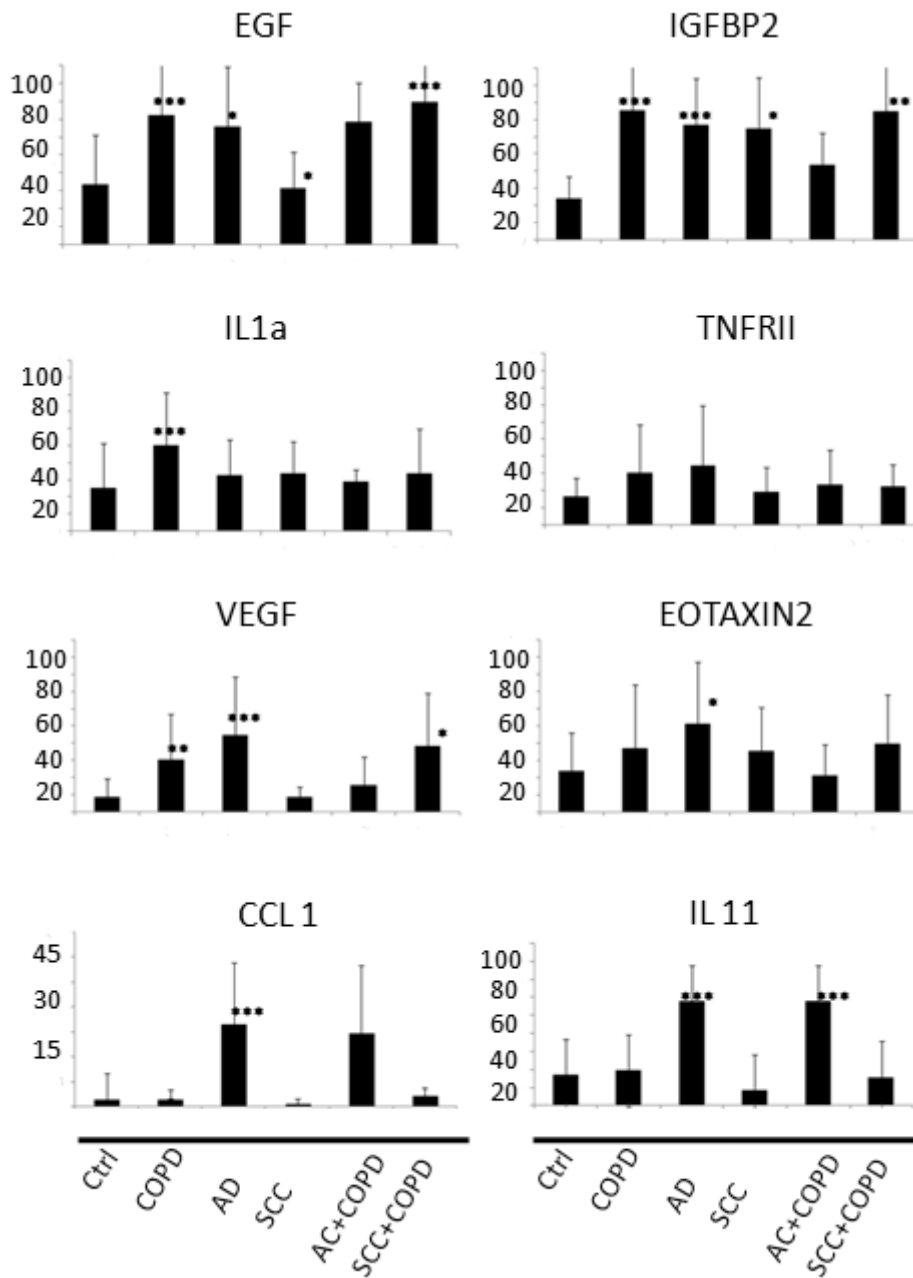




FIGURA 3

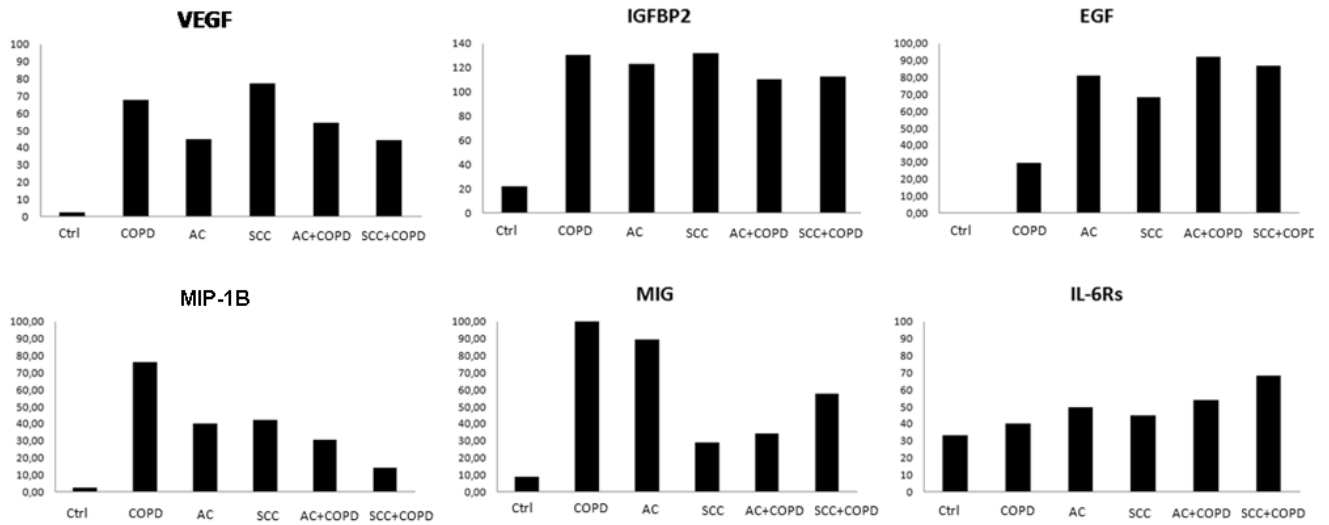
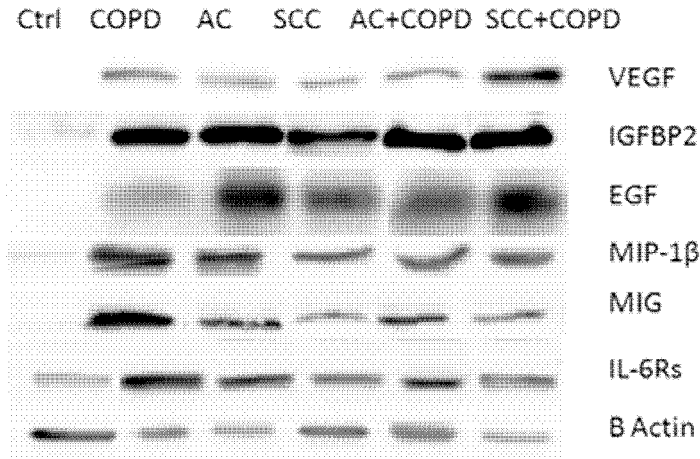


Figura 3 (continuación)

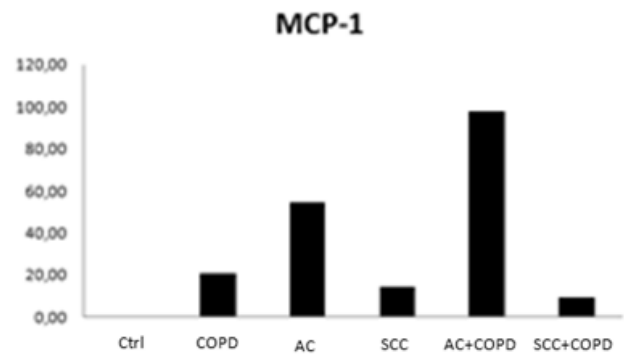
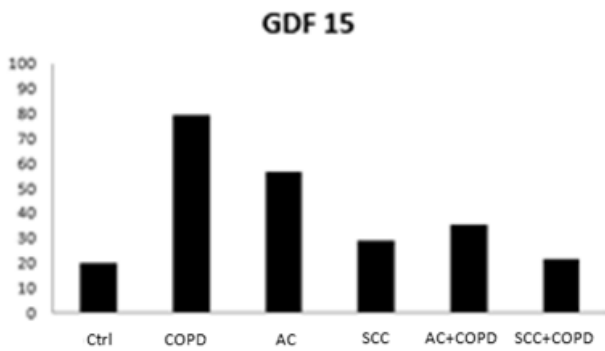
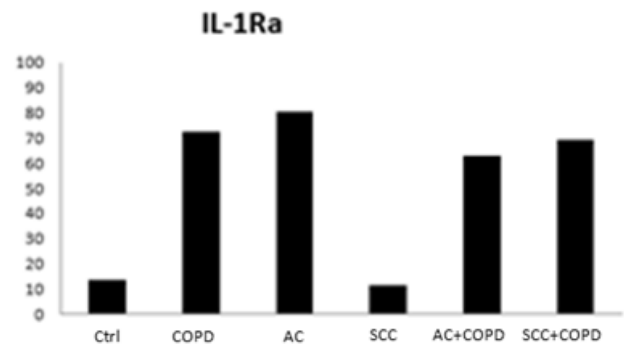
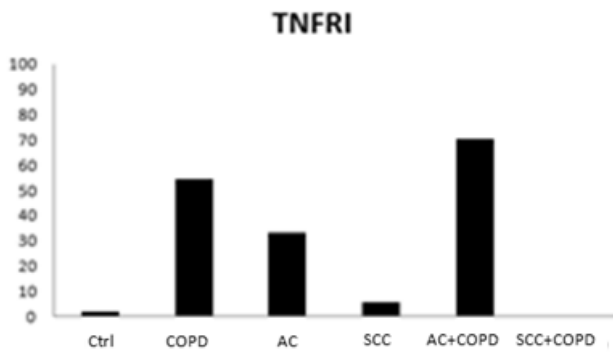
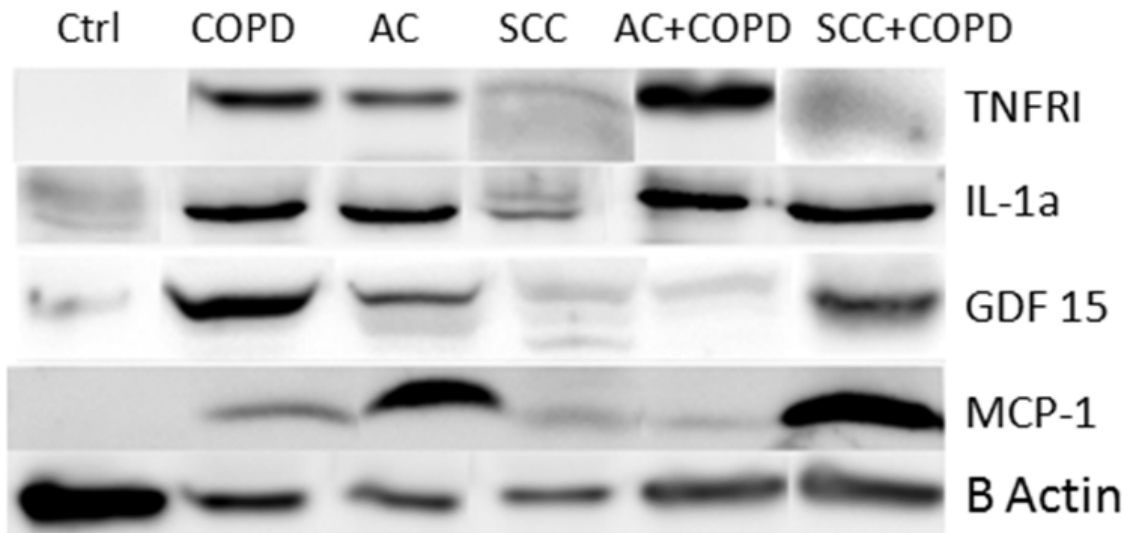


Figura 3 (continuación)

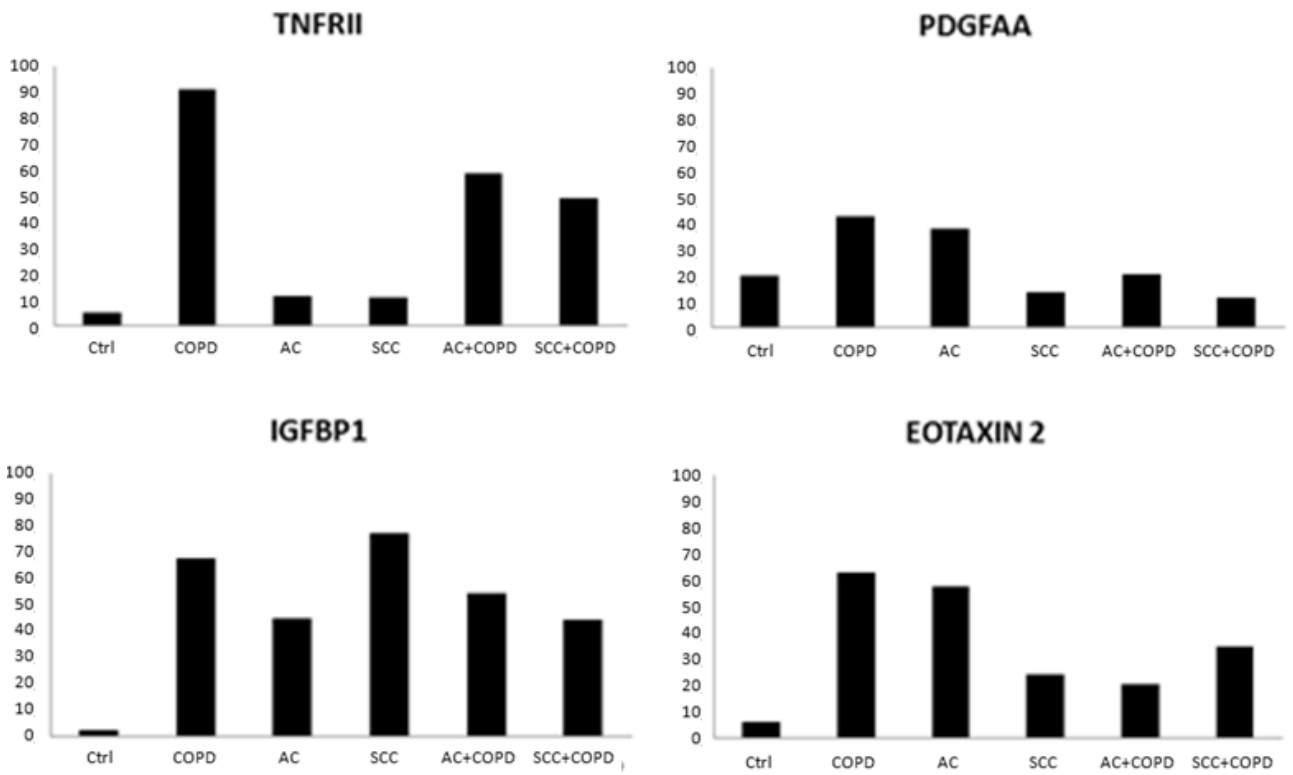
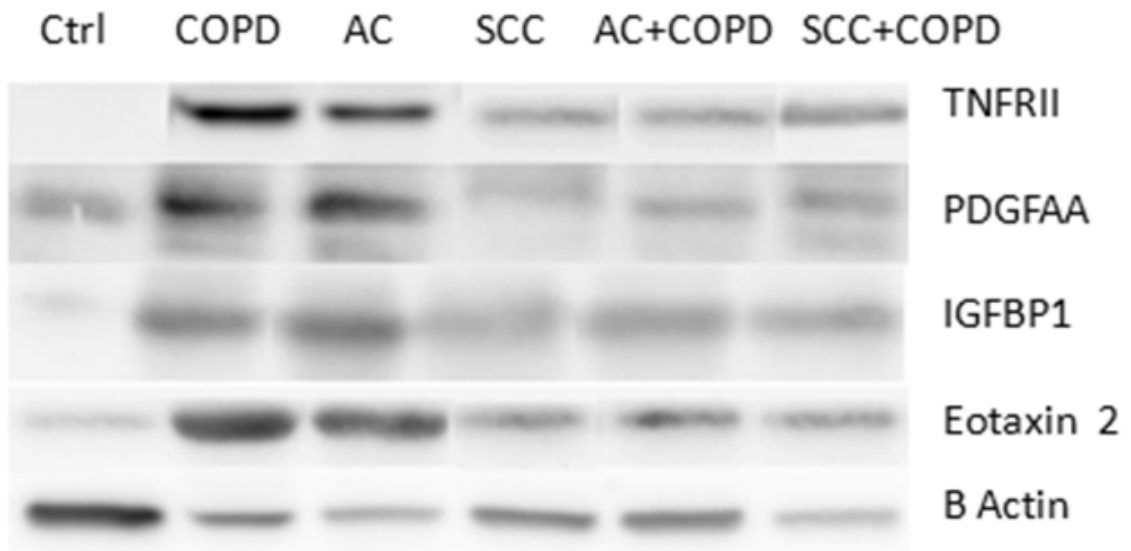


FIGURA 3 (Continuación)

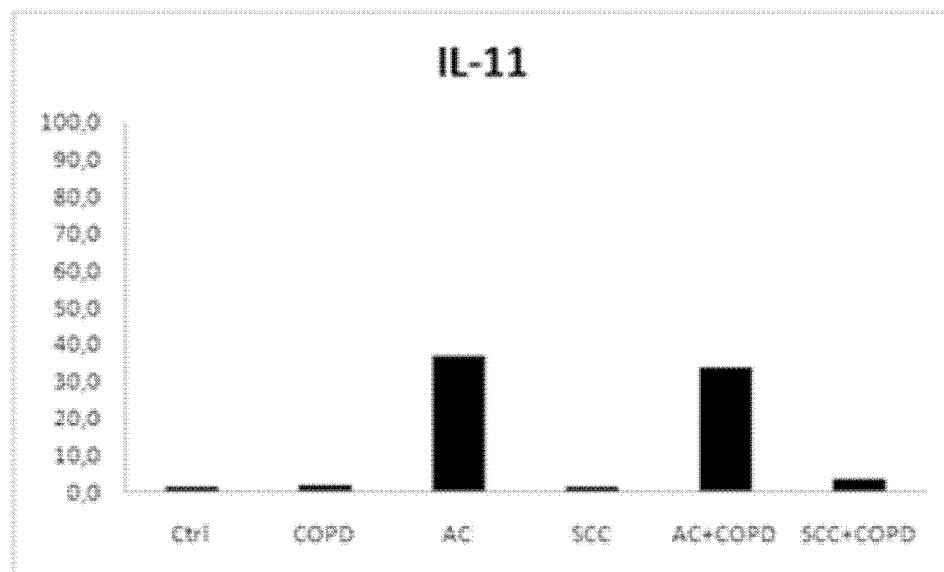
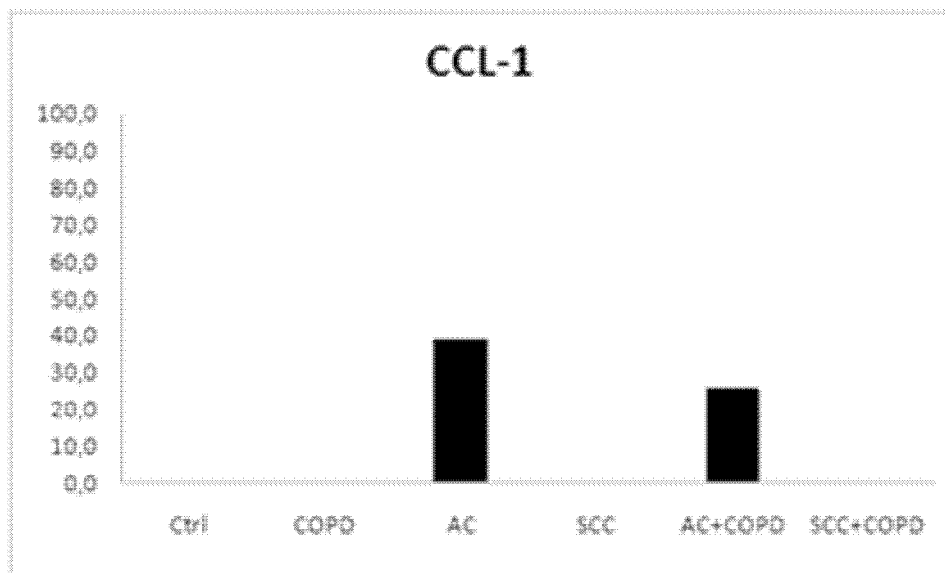
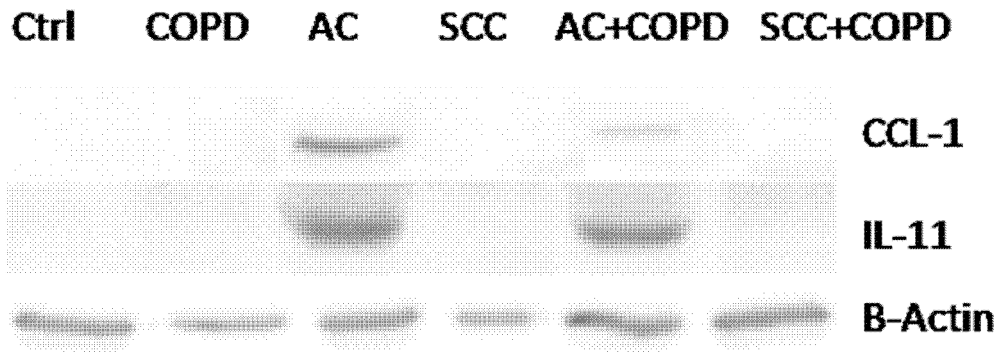


FIGURA 4

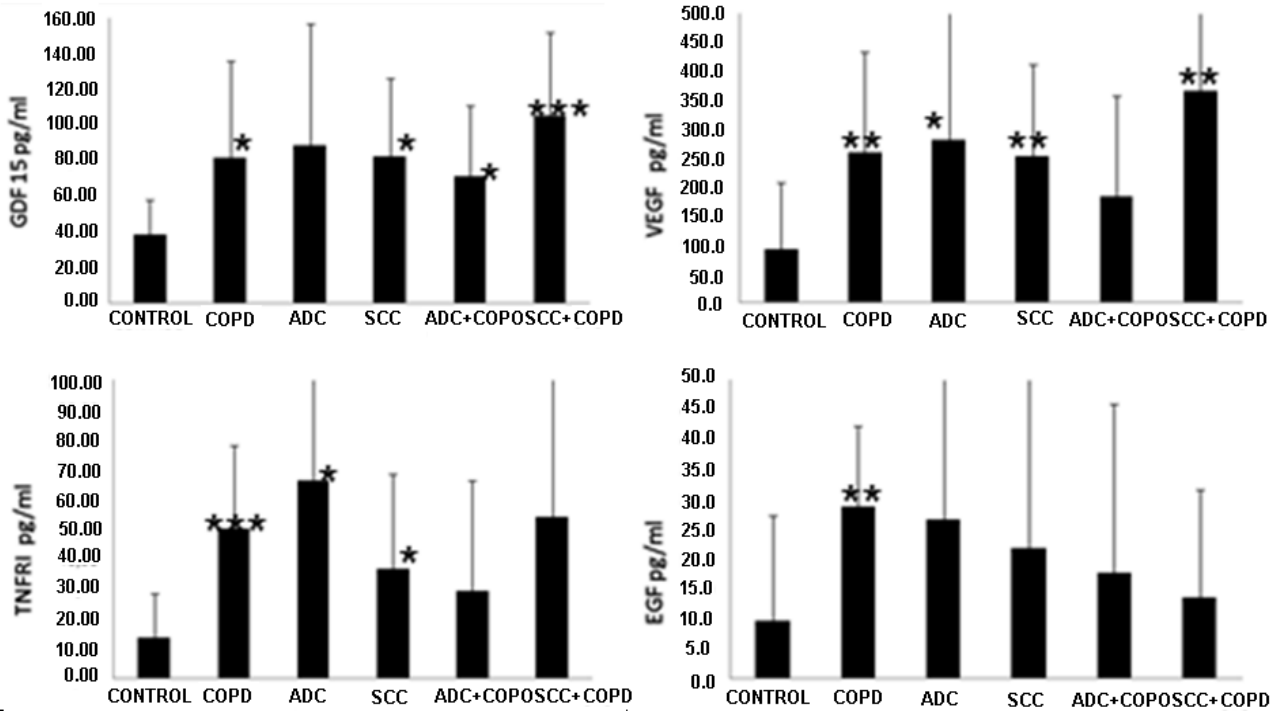


FIGURA 4 (continuación)

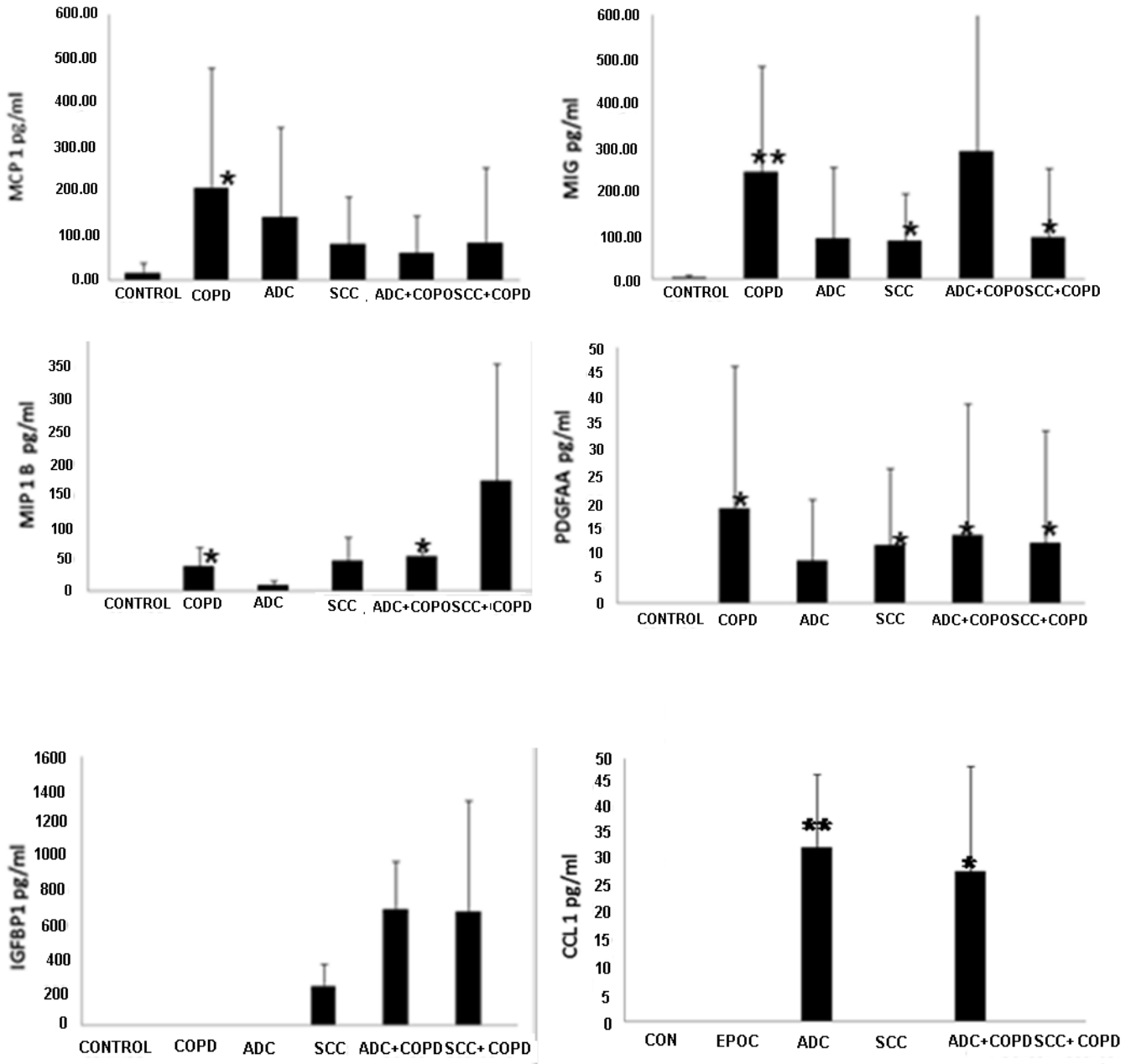


FIGURA 5

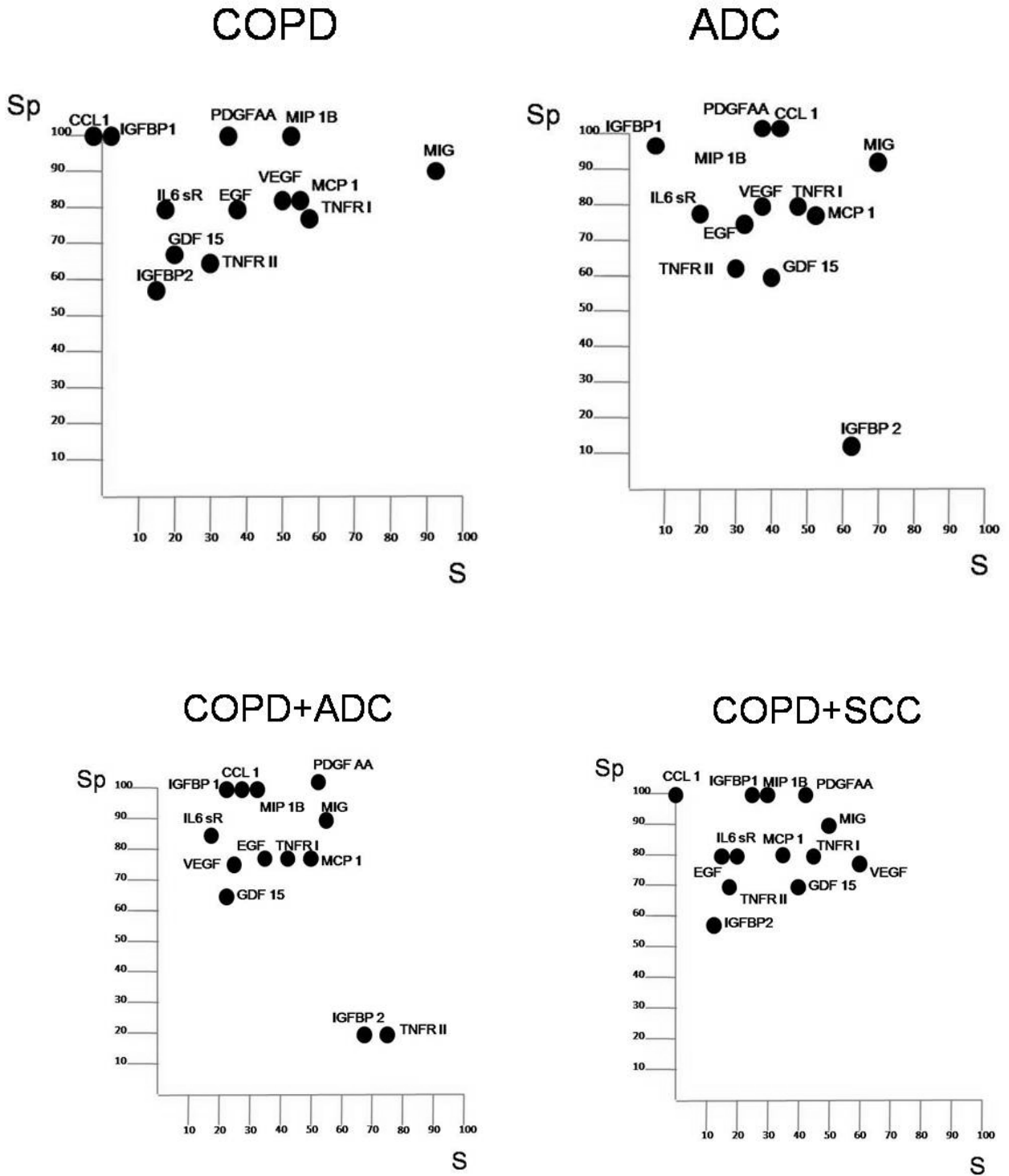
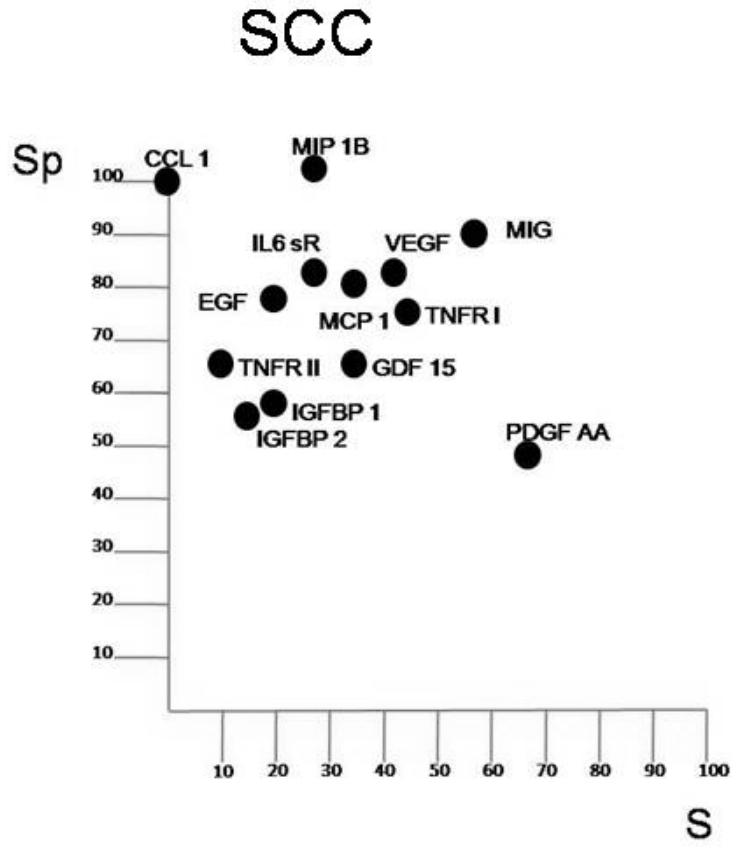


FIGURA 5 (continuación)







- ②① N.º solicitud: 201230874  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.06.2012  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	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.	1-18
A	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.	1-18
A	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.	1-18
A	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.	1-18
A	ES 2263228 T3 (TEIJIN LIMITED) 01.12.2006, página 2, línea 15; página 3, línea 39; reivindicaciones 1,2,4,5.	1-18

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia  
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría  
A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita  
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud  
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p><b>Fecha de realización del informe</b> 21.10.2013</p>	<p><b>Examinador</b> M. D. García Grávalos</p>	<p><b>Página</b> 1/4</p>
---	--	------------------------------

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

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (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.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 21.10.2013

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-18	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	JIANG F. et al. Cancer Prevention Research. 2010. Vol. 3(12), páginas: 1571-1578.	2010
D02	PINTO-PLATA VM. et al. CHEST. 2007. Vol. 131(1), páginas: 37-43.	2007
D03	MOERMANS C. et al. Cytokine. 2011. Vol. 56, páginas: 298-304.	2011
D04	TAKIZAWA H. et al. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. 2001. Vol. 163, páginas: 1476-1483.	2001
D05	ES 2263228 T3	01.12.2006

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga un método de obtención de datos útiles para diagnóstico, pronóstico y clasificación de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o cáncer de pulmón, mediante la cuantificación del producto de expresión de una serie de citoquinas y factores de crecimiento. Se refiere también a un kit o dispositivo para diagnóstico, pronóstico y siguiente clasificación de: a) sujetos sin EPOC ni cáncer de pulmón, b) sujetos con EPOC, c) sujetos con adenocarcinoma, o e) sujetos con EPOC y carcinoma escamoso (reivindicaciones 1-18).

El documento D01 divulga una búsqueda de marcadores genéticos de cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), mediante un estudio realizado con ADN aislado de muestras de esputos de 49 pacientes con cáncer de pulmón (NSCLC), de 49 pacientes que padecen enfermedad obstructiva respiratoria (EPOC) y de 49 individuos fumadores sanos. El resultado mostró en primer lugar un panel de quince genes que presentaban diferencias entre los individuos de una u otra enfermedad y los sanos. Con seis de estos genes se consigue una mayor predicción y especificidad para casos de individuos con cáncer de pulmón en diferentes estadios y en la identificación de casos de individuos con adenocarcinoma escamoso de pulmón (ver todo el documento).

El documento D02 divulga la alteración del entorno de citoquinas sistémicas en pacientes hospitalizados por exacerbación de EPOC (ver todo el documento).

El documento D03 divulga un estudio sobre la inflamación sistémica de las vías aéreas y liberación de citoquinas en pacientes con EPOC (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un estudio sobre el incremento de la expresión del factor de crecimiento transformante (TGF-beta1) en células epiteliales las vías aéreas en individuos fumadores y en pacientes con EPOC (ver todo el documento).

El documento D05 divulga un método para predecir la susceptibilidad de padecer una enfermedad pulmonar obstructiva en un humano basado en el polimorfismo del gen de la tripsina proteasa humana del tracto respiratorio (ver página 2, línea 15; página 3, línea 39; reivindicaciones 1, 2, 4 y 5).

**1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)**

El objeto técnico de la presente solicitud es un método de obtención de datos útiles para diagnóstico, pronóstico y clasificación de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o cáncer de pulmón, mediante la cuantificación del producto de expresión de una serie de citoquinas y factores de crecimiento.

**1.1. REIVINDICACIONES 1-18**

En el estado de la técnica se encuentran métodos para diagnóstico, pronóstico de sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y/o cáncer de pulmón. Por otra parte, también se encuentran documentos que relacionan la expresión de citoquinas o factores de crecimiento con estas enfermedades. Sin embargo, las características técnicas que presentan no coinciden con las reivindicadas en la presente solicitud.

La presente invención reivindica un método basado en la cuantificación del producto de expresión de una serie de citoquinas y factores de crecimiento seleccionados que no ha sido encontrado en el estado de la técnica.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-18 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D01-D05 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes a efectos de la valoración de la novedad y actividad inventiva de la presente solicitud de patente.