

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 299**

21 Número de solicitud: 201730947

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

19.07.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.01.2019

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
SANITARIA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (100.0%)
Avenida de los Reyes Católicos 2
28040 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**CÁRDABA OLOMBRADA, Blanca;
BAOS MUÑIZ, Selene;
CALZADA RICOTE, David y
CREMADES JIMENO, Lucía**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

54 Título: **BIOMARCADORES DIFERENCIALES DE ASMA**

57 Resumen:

En la presente invención, se propone, por tanto, la utilidad del estudio de la expresión de 8 proteínas, 5 en suero y 3 por western-blot (tal y como se describe en los ejemplos de la invención), como potenciales biomarcadores diferenciales de varios fenotipos clínicos: Asma No Alérgica (ANA), Asma Alérgica (AA) y Alergia sin asma (A), así como, de biomarcadores diferenciales de gravedad en asma: ANA Grave vs ANA Moderada/leve (M/I) y AA Grave vs AA Moderada/leve (M/I). Asimismo, la presente invención proporciona una serie de biomarcadores capaces de discriminar entre distintos fenotipos clínicos tal y como se ilustra a lo largo de la descripción.

ES 2 697 299 A1

DESCRIPCIÓN

Biomarcadores diferenciales de asma

Campo de la técnica

La presente invención se enmarca en el ámbito médico, en particular en el ámbito del diagnóstico médico utilizando biomarcadores capaces de discriminar entre individuos con
5 distintos fenotipos clínicos de asma así como la gravedad de cada uno de dichos fenotipos clínicos.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades respiratorias inflamatorias crónicas, incluidas las enfermedades alérgicas y el asma, son enfermedades comunes, complejas y heterogéneas, motivos por los que
10 tanto su evolución clínica como su tratamiento, no siempre son previsibles.

Las enfermedades alérgicas son reacciones adversas del sistema inmune frente a sustancias teóricamente inocuas cuya prevalencia, además de ser muy alta en todo el mundo, está aumentando, aunque de forma variable según el estilo de vida, reflejo de su carácter multifactorial. Como destaca la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica
15 (EAACI), hoy en día, la alergia es un problema de salud pública de proporciones pandémicas, que afecta a más de 150 millones de personas en Europa; de hecho, es la enfermedad crónica más común. Teniendo en cuenta las tendencias epidemiológicas, la EAACI estima que más de la mitad de la población europea sufrirá algún tipo de alergia en el 2025. Esta alta prevalencia y su impacto en la calidad de vida hacen que sea un serio
20 problema económico (menor productividad de los afectados y mayor absentismo laboral) y para los sistemas de salud pública. Se estima que las manifestaciones clínicas más usuales de este tipo de enfermedades, asma y rinitis, representan más de 100 millones de días de absentismo laboral o escolar al año.

El asma bronquial es una enfermedad inflamatoria de las vías respiratorias que provoca
25 hiperrespuesta bronquial y/o obstrucción del flujo de aire caracterizado por síntomas como tos, sibilancias o disnea. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo define como la enfermedad crónica más común en niños y se estima que hay más de 300 millones de afectados. De éstos, aproximadamente un 10% muestran una clínica de asma severa, con una importante morbilidad y mortalidad. En la última Iniciativa Global para el Asma (GINA)
30 se definió como "una enfermedad heterogénea, usualmente caracterizada por inflamación

crónica de las vías respiratorias". Se caracteriza por la historia de síntomas respiratorios como sibilancias, falta de aire, opresión torácica y tos que varían en intensidad con el tiempo y se asocia a una limitación variable del flujo aéreo espiratorio. Sin embargo, uno de los principales problemas para definir esta patología es su amplio espectro clínico, desde un episodio ocasional (que puede ser fácilmente revertido) hasta un bloqueo mantenido que requiere altas dosis de corticosteroides orales o inhalados. En la comunidad médica, se acepta de forma general que las diferencias clínicas observadas en las respuestas frente al tratamiento o en el curso de la enfermedad a lo largo del tiempo están relacionadas con múltiples variaciones subyacentes en los mecanismos genéticos, farmacológicos, fisiológicos, biológicos y/o inmunológicos que producen subclases de fenotipos denominados endotipos. Esta heterogeneidad ha conducido al llamamiento de la búsqueda de medicina de precisión o personalizada (entre otros). Por esta razón, hay cada vez más grupos que hablan de endotipos o de varias formas de la enfermedad, lo que requiere diferentes enfoques diagnósticos y terapéuticos, como ha sido recientemente revisado por expertos en este área.

Probablemente debido a esta gran complejidad y heterogeneidad, hasta el momento, no hay ninguna cura para el asma. El objetivo principal del tratamiento del asma es lograr y mantener el control de la enfermedad lo antes posible, además de prevenir las exacerbaciones y la obstrucción crónica al flujo aéreo y reducir al máximo su mortalidad. Los objetivos del tratamiento, tanto en su vertiente de controlar los síntomas diarios (dominio control actual), como para prevenir las exacerbaciones y una pérdida exagerada de función pulmonar (dominio riesgo futuro), pueden alcanzarse en un alto porcentaje de pacientes con un tratamiento adecuado, pero siempre hay una proporción que no responde de forma adecuada a ningún tratamiento.

Múltiples estudios han caracterizado diversos fenotipos de la enfermedad en determinados grupos de pacientes de características demográficas, clínicas o fisiopatológicas reconocibles. Sin embargo, aunque en pacientes con asma grave no controlada, dicha clasificación puede resultar de ayuda al orientar tratamientos específicos, por el momento no existen pruebas robustas para recomendar una clasificación de la enfermedad basada en fenotipos del asma en general, y en el que se controla con el tratamiento habitual, en particular. Los fenotipos de asma se pueden agrupar en tres grandes bloques (no excluyentes entre sí): clínicos o fisiológicos, relacionados con desencadenantes e inflamatorios (Tabla 1).

Tabla 1. Fenotipos Asmáticos

| | |
|----------------------------------|--|
| Clínicos fisiológicos | <ul style="list-style-type: none"> o Asma grave. Asma con exacerbaciones graves. Asma refractaria al tratamiento, sobre todo en pacientes sin alergia y asma corticodependiente. Asma de inicio precoz, en menores de 12 años, que suele ser alérgica. Asma de inicio tardío, sobre todo mujeres, se inicia en la edad adulta y suelen cursar sin alergia. Asma con limitación fija al flujo aéreo, por remodelación bronquial; por síndrome de solapamiento asma y EPOC. Asma y obesidad, con síntomas graves. |
| Relacionados con desencadenantes | <ul style="list-style-type: none"> Asma alérgica, por alérgenos ambientales u ocupacionales. Asma inducida por antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Asma inducida por menstruación. Asma inducida por ejercicio. |
| Inflamatorios | <ul style="list-style-type: none"> Asma eosinofílica, suele ser alérgica y tener buena respuesta a glucocorticoides inhalados, en general. Asma neutrofílica, suele darse en pacientes con enfermedad grave y exacerbaciones graves, con peor respuesta a glucocorticoides inhalados. Asma paucigranulocítica. |

Sacado de la Guía Española para el Manejo del Asma, GEMA 4.0

Clasificación del asma del adulto. Gravedad clínica. El asma se ha clasificado habitualmente en función de la gravedad, aunque la definición ha ido evolucionando con el tiempo. La gravedad del asma es una propiedad intrínseca de la enfermedad, que refleja la intensidad de las anomalías fisiopatológicas. Hay que tener en cuenta que la gravedad del asma implica tanto la intensidad del proceso, como la respuesta al tratamiento. La gravedad habitualmente se evalúa cuando el paciente está siendo tratado y se clasifica en función de las necesidades de tratamiento de mantenimiento que se requieren para alcanzar el control de los síntomas y las exacerbaciones. Tradicionalmente se divide en cuatro categorías: intermitente, persistente leve, persistente moderada y persistente grave (Tabla 2).

La gravedad no es una característica del asma necesariamente constante, sino que puede variar a lo largo del tiempo (en meses o años), por lo que es necesario reevaluarla periódicamente. La gravedad se determina de forma retrospectiva en el paciente cuyo asma

está controlada según el escalón terapéutico en que se encuentre, es decir, basándose en la cantidad de medicación que es necesaria para mantener el control de la enfermedad, recurriéndose a la reducción del escalón si ello fuera necesario para estipular las cantidades mínimas de tratamiento. Se puede establecer en un paciente que no esté recibiendo tratamiento de mantenimiento, pero esto es infrecuente.

Control. El control del asma es el grado en el que las manifestaciones del asma están ausentes o se ven reducidas al máximo por las intervenciones terapéuticas y se cumplen los objetivos del tratamiento. El control refleja en buena medida la idoneidad del tratamiento para el asma. No obstante, hay que tener en cuenta otro factor, que difiere de un paciente a otro, y es la respuesta al tratamiento y la facilidad y la rapidez con las que se alcanza el control. Aunque el término control es amplio y puede englobar todos los aspectos clínicos y fisiopatológicos del asma, a efectos prácticos, incluye las características clínicas de la enfermedad (síntomas y exacerbaciones) y las pruebas de función pulmonar.

Tabla 2. Clasificación del asma en función de la gravedad

| | Intermitente | Persistente Leve | Persistente moderada | Persistente grave |
|---|----------------------------------|---|-----------------------------|--|
| Síntomas diurnos | No (2 veces o menos a la semana) | Más de 2 veces a la semana | Síntomas a diario | Síntomas continuos (varias veces al día) |
| Medicación de alivio (agonista β_2-adrenérgico de acción corta) | No (2 veces o menos / semana) | Más de 2 veces a la semana pero no diario | Todos los días | Varias veces al día |
| Síntomas nocturnos | No más de 2 veces al mes | Más de 2 veces al mes | Más de una vez a la semana | Frecuentes |
| Limitación de la actividad | Ninguna | Algo | Bastante | Mucho |
| Función pulmonar (FEV₁ o PEF) % teórico | > 80% | < 80% | > 60%- < 80% | < 60% |
| Exacerbaciones | Ninguna | Una o ninguna al año | Dos o más al año | Dos o más al año |

15 Sacado de la Guía Española para el Manejo del Asma, GEMA 4.0. FEV₁: Volumen espiratorio forzado en el primer segundo; PEF: Flujo espiratorio máximo.

Los fármacos para tratar el asma se clasifican como de control o mantenimiento, y de alivio, también llamados “de rescate”. Los **medicamentos de control o mantenimiento**, que deben administrarse a diario durante períodos prolongados, incluyen glucocorticoides inhalados (GCI) o sistémicos, antagonistas de los receptores de los leucotrienos (ARLT),
5 agonistas β 2-adrenérgicos de acción larga (LABA), tiotropio y anticuerpos monoclonales anti-IgE (omalizumab). Las cromonas y la teofilina de liberación retardada han caído en desuso por su menor eficacia. Los **medicamentos de alivio** se utilizan a demanda para tratar o prevenir la broncoconstricción de forma rápida y, entre ellos, se encuentran los
10 agonistas β 2-adrenérgicos de acción corta (SABA) inhalados (de elección) y los anticolinérgicos inhalados (bromuro de ipratropio).

El **asma grave** se caracteriza por la necesidad de precisar múltiples fármacos y a altas dosis para su tratamiento. Se asocia a un mayor consumo de recursos económicos en comparación con el asma moderada o leve. Se define al **asma grave no controlada (AGNC)** como la enfermedad asmática que persiste mal controlada pese a recibir
15 tratamiento con una combinación de GCI/ LABA, a dosis elevadas en el último año, o bien glucocorticoides orales durante al menos seis meses del mismo periodo.

Problemas técnicos que resuelve la presente invención

Como ya se ha descrito anteriormente, desde un punto de vista clínico, el asma es una
20 enfermedad muy heterogénea, con un gran número de fenotipos diferentes. Sin embargo, a pesar de esta heterogeneidad clínica del asma, los mecanismos alérgicos han sido implicados en el 50-80% de los pacientes asmáticos y en aproximadamente el 50% del asma grave. Esta es una de las razones por las que el asma se ha asociado habitualmente con la inflamación respiratoria de tipo 2 (Th2), caracterizada por los elevados niveles de IgE,
25 eosinófilos y algunas citocinas como IL4, IL5, IL13 e IL9, canónicamente asociados a respuestas alérgicas y por esa razón, una gran parte de los esfuerzos en la búsqueda de nuevos tratamientos para el asma, se han centrado en la vía de las citocinas Th2. Sin embargo, la respuesta inmune de tipo 2 es un endotipo complejo, con varios subendotipos, tales como los endotipos definidos como *IL-5-high*, *IL-13-high* o *IgE-high* que definen
30 subgrupos de pacientes que tendrían beneficios terapéuticos con distintas dianas de tratamiento. Se han utilizado nuevas estrategias para el descubrimiento y validación de biomarcadores moleculares como los enfoques ómicos para revelar los mecanismos

responsables de los endotipos de asma en diferentes tejidos. Un biomarcador se define como un parámetro objetivo, medible, que puede ser la firma de una vía subyacente compleja o una molécula clave asociada con, o que directamente tenga un papel esencial en un endotipo de una enfermedad concreta. Varios nuevos tratamientos experimentales, conocidos como terapias biológicas, están en diversas etapas de desarrollo clínico para pacientes con inflamación dirigida por una respuesta inmune de tipo 2: anticuerpos anti-IL-4 / IL-13, anti-IL-4, anti-IL-5 y anti-IgE, así como CRTH2 (receptor de quimocinas homólogo de una molécula expresada en los linfocitos Th2). Un resumen del estado de estas terapias biológicas en la actualidad se esquematiza en la Tablas 3 y 4. Sin embargo, en la actualidad, los biomarcadores disponibles no son lo suficientemente específicos para seleccionar el subendotipo del asma de respuesta inmune de tipo 2 que responde específicamente a un tratamiento dirigido. Esto puede deberse a varios factores, como la influencia genética (o epigenética) o el desconocimientos de la vía inflamatoria inmunitaria predominante o la contribución en la respuesta del propio tejido remodelado. En resumen, aunque los recientes avances terapéuticos han desentrañado algunas de las contribuciones de distintos fenotipos y endotipos a la patogénesis del asma y las respuestas a terapias específicas, aún es necesaria más información para que se optimicen las respuestas terapéuticas del paciente, intentando evitar al mismo tiempo efectos adversos.

Tabla 3. Tratamientos del asma con enfoques dirigidos por biomarcadores

| Biomarcador | Tratamiento con el que se espera producir una respuesta | Asociaciones | Comentarios (puntos a tener en cuenta, variabilidad/fluctuación) |
|-------------------------|---|--|--|
| Sangre | | | |
| Eosinófilos | Anti-IL-5 | Exacerbaciones | Disponible fácilmente |
| | Anti-IgE | Reducción de la FP | Fluctuación significativa |
| | Anti-IL-4/IL-13 | Obstrucción fija de las vías respiratorias | |
| | Corticosteroides | | |
| | Antagonistas CRTH2 | | |
| IgE específica | Anti-IgE | Exacerbaciones | |
| | AIT | AHR (AIT) | |
| Periostina | Anti-IL-13 | Disminución de la FP | En investigación |
| DPP-4 | | Exacerbaciones | Dependiente de ensayo |
| Espujo inducido | | | |
| Eosinófilos | Anti-IL-5 | Exacerbaciones | En investigación |
| | ICS | | Fluctuación significativa |
| IL-13 | Anti-IL-13 | Desconocida | En investigación |
| Aire exhalado | | | |
| FENO | Anti-IL-5 | Exacerbaciones, | Disponible fácilmente |
| | Anti-IgE | disminución de la FP | Fluctuación significativa |
| | Anti-IL-13 | | |
| | ICS | | |
| Metabólica (VOC) | ICS | Desconocida | En investigación |

Hay un solapamiento significativo entre los biomarcadores empleados para predecir la respuesta a diferentes estrategias dirigidas por el endotipo. Además, pocos biomarcadores están disponibles fácilmente, la mayoría fluctúan de forma significativa, y ninguno está aún validado ni garantizada su calidad. AIT, inmunoterapia con alérgeno; DPP-4, dipeptidil peptidasa 4; ICS, corticosteroides inhalados; FP, función pulmonar; VOC, componentes orgánicos volátiles.

Tabla 4. Tratamientos dirigidos por endotipos en asma de tipo Th2

| Biomarcador predictivo | Medicamento | Diana | Efectos | Estado de regulación |
|--|--------------------|----------------|--|--|
| Eosinófilos en sangre Periostina FENO | Omalizumab | IgE | Reduce las exacerbaciones Mejora los síntomas y la calidad de vida | Aprobado por FDA y EMA |
| Eosinófilos en sangre/esputo FENO | Mepolizumab | IL-5 | Reduce el número de eosinófilos, exacerbaciones y OCS Mejora FEV ₁ | Aprobado por FDA En evaluación por EMA Probado para CRSwNP |
| Eosinófilos en sangre | Reslizumab | IL-5 | Reduce el número de eosinófilos, exacerbaciones Mejora FEV ₁ | En evaluación por FDA |
| Eosinófilos en sangre | Benralizumab | IL-5R α | Reduce el número de eosinófilos y basófilos, exacerbaciones Mejora FEV ₁ | Fase III |
| Eosinófilos en sangre | Dupilumab | IL-4R α | Reduce las exacerbaciones Mejora FEV ₁ Mejora los síntomas y la calidad de vida | Fase III Probado para CRSwNP, AD y EoE |
| Periostina DPP-4 | Tralokinumab | IL-13 | Reduce el número de eosinófilos y exacerbaciones Mejora FEV ₁ | Fase II |
| Periostina | Lebrikizumab | IL-13 | Reduce las exacerbaciones Mejor FEV ₁ | Fase III |

Las vías de IgE, IL-5, e IL-4/IL-13 pueden ser abordadas con anticuerpos monoclonales (mAbs). Hay un notable solapamiento entre los llamados biomarcadores predictivos y una heterogeneidad significativa en la respuesta clínica. CRSwNP, Rinosinusitis crónica con pólipos nasales; DPP-4, dipeptidil peptidasa 4; EMA, Agencia Europea del Medicamento; EoE, esofagitis eosinofílica; FDA, Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos; IL-4R α , Receptor α de IL-4; IL-5R α , Receptor α de IL-5; OCS, corticosteroides orales.

Por otro lado, aunque el asma alérgica (AA) afecta a una importante proporción de pacientes, del 10% al 33% de sujetos con asma, son sujetos no alérgicos (NA), definidos como sujetos con asma pero sin ninguna sensibilización alérgica asociada. En estos sujetos, los mecanismos que contribuyen a la respuesta inmune de tipo 2 son menos claros. En muchos casos, en lugar de inflamación eosinofílica, existe una prevalencia de neutrófilos. El endotipo del asma de respuesta inmune no mediado por Th2 es mucho menos conocido que el de tipo Th2 y hasta ahora no se han demostrado terapias dirigidas frente a este endotipo que sean efectivas. Por tanto, los esfuerzos dirigidos hacia este tipo de asma son claramente una necesidad insatisfecha y las terapias biológicamente dirigidas son un campo por desarrollar.

Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Estudio preliminar de los datos de expresión por PCA (*Principal Component Assay*) tal y como se explica en el ejemplo 1, en particular en el apartado de estudio de expresión génica.

Fig. 2. Cuantificación de MSR1. Cuantificación relativa de las 2 bandas detectadas por el anticuerpo de MSR1 de todos los sujetos estudiados del grupo control (C) y grupo con asma no alérgica (ANA). *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0.001$) entre el grupo con asma no alérgico y el grupo control.

Fig. 3. Cuantificación de SERPINB2. Cuantificación relativa de la banda detectada alrededor de los 43kDa por el anticuerpo de SERPINB2 de todos los sujetos estudiados para esta proteína del grupo control (C), asma no alérgica (ANA), asma alérgica (AA) y alergia sin asma (A). *Comparación estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) entre el grupo control y el indicado. #Comparación estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre el grupo con alergia sin asma y el indicado.

Fig. 4. Cuantificación PHLDA1. Cuantificación relativa de la banda detectada alrededor de los 43kDa por el anticuerpo de PHLDA1 de todos los sujetos estudiados para esta proteína del grupo control (C), asma no alérgica (ANA), asma alérgica (AA) y alergia sin asma (A).

Fig. 5. Niveles de proteína en suero. A) Niveles medios de IL8 en el suero de los grupos control (C), asma no alérgica (ANA), asma alérgica (AA) y alergia sin asma (A). B) Niveles medios de IL10 en el suero de los grupos C, ANA, AA y A. C) Niveles medios de CHI3L1 en el suero de los grupos C, ANA, AA y A. D) Niveles medios de PI3 en el suero de los grupos C, ANA, AA y A. D) Niveles medios de POSTN en el suero de los grupos C, ANA, AA y A.
*Comparación estadísticamente significativa ($p<0.001$) entre el grupo A y el grupo indicado.
#Comparación estadísticamente significativa ($p<0.0001$) entre el grupo C y el grupo indicado.**Comparación estadísticamente significativa ($p<0.05$) entre los grupos indicados.
##Comparación estadísticamente significativa ($p<0.001$) entre los grupos indicados.

10

Descripción de la invención

Definiciones

Para los fines de la presente invención, a continuación, se incluyen las siguientes definiciones:

15

- en la presente invención, por “Asma” se entiende una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, en cuya patogenia intervienen diversas células y mediadores de la inflamación, condicionada en parte por factores genéticos y que cursa con hiperrespuesta bronquial (HRB) y una obstrucción variable del flujo aéreo, total o parcialmente reversible, ya sea por la acción de medicamentos o espontáneamente.
- En la presente invención, por “Asma no alérgica” se entiende al diagnóstico clínico de asma realizado por un Alergólogo o Neumólogo especialista, según los criterios de la Guía Española del Manejo del Asma (GEMA) y sin ningún síntoma alérgico asociado (historia clínica no sospechosa de ninguna alergia y pruebas cutáneas negativas frente a batería de alérgenos comunes).
- En la presente invención, por “Asma alérgica” se entiende al diagnóstico clínico de asma realizado por un Alergólogo o Neumólogo especialista, según los criterios de la Guía Española del Manejo del Asma (GEMA), asociado a síntomas alérgicos caracterizados (historia de sospecha de enfermedades alérgicas, pruebas cutáneas positivas frente a algún alérgeno de una batería de alérgenos comunes, IgE total elevada).

20

25

30

- el término "selección" se entiende como el examen o ensayo de un grupo de individuos que pertenecen a la población general, con riesgo de padecer asma, con el objetivo de distinguir los individuos sanos o alérgicos de los que padecen asma, más particularmente con el objetivo de distinguir la gravedad del asma entre aquellos individuos que padecen asma.
- La expresión "regulado positivamente", "nivel de concentración aumentado" o "sobrexpresado" referida a cualquiera de las proteínas o combinaciones de las mismas descritas en la presente invención, se refiere a un aumento en su nivel de la concentración de proteína con respecto a un "valor umbral" o "valor límite" dado de al menos un 5 %, de al menos un 10 %, de al menos un 15 %, de al menos un 20 %, de al menos un 25 %, de al menos un 30 %, de al menos un 35 %, de al menos un 40 %, de al menos un 45 %, de al menos un 50 %, de al menos un 55 %, de al menos más de un 60 %, de al menos más de un 65 %, de al menos un 70 %, de al menos un 75 %, de al menos un 80 %, de al menos un 85 %, de al menos un 90 %, de al menos un 95 %, de al menos un 100 %, de al menos un 110 %, de al menos un 120 %, de al menos un 130 %, de al menos un 140 %, de al menos un 150 %, o más.
- La expresión "regulado negativamente", "nivel de concentración reducido" o "infraexpresado" referida a cualquiera de las proteínas o combinaciones de las mismas descritas en la presente invención, se refiere a una reducción en su nivel de la concentración de proteína con respecto a un "valor umbral" o "valor límite" dado de al menos un 5 %, de al menos un 10 %, de al menos un 15 %, de al menos un 20 %, de al menos un 25 %, de al menos un 30 %, de al menos un 35 %, de al menos un 40 %, de al menos un 45 %, de al menos un 50 %, de al menos un 55 %, de al menos más de un 60 %, de al menos más de un 65 %, de al menos un 70 %, de al menos un 75 %, de al menos un 80 %, de al menos un 85 %, de al menos un 90 %, de al menos un 95 %, de al menos un 100 %, de al menos un 110 %, de al menos un 120 %, de al menos un 130 %, de al menos un 140 %, de al menos un 150 %, o más.
- En la presente memoria con objeto de separar el número entero de los decimales se utiliza el modo anglosajón utilizando por tanto un punto en vez de una coma.
- La expresión "valor umbral" o "valor límite", cuando hace referencia a los niveles de concentración de las proteínas descritas en la presente invención, se refiere a un nivel de la concentración de referencia indicativo de que es probable que un sujeto padezca asma o un tipo de asma determinado como asma intermitente o asma persistente leve, moderado o grave con una sensibilidad y especificidad dadas si los

niveles de concentración del paciente están por encima o por debajo de dichos niveles umbral, límite o de referencia.

- La expresión "que comprende" pretende incluir, pero sin limitación, lo que sigue a la expresión "que comprende". Por lo tanto, el uso de la expresión "que comprende" indica que los elementos citados son necesarios u obligatorios, pero que son opcionales otros elementos y existe la posibilidad de que estén presentes o no.
- Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a lo que sigue a la expresión "que consiste en". Por lo tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos citados son necesarios u obligatorios y que no puede estar presente ningún otro elemento.
- También debe tenerse en cuenta que el término "kit", como se usa en el presente documento, no está limitado a ningún dispositivo específico e incluye cualquier dispositivo adecuado para poner en práctica la invención.
- SERPINB2 (miembro del grupo de inhibidores de la familia de serín-proteasas, enzimas que inhiben la proteasa catepsina G de neutrófilos y la quimasa de mastocitos. SERPINB2 se ha detectado en diferentes tipos de células, desempeñando un papel en la inflamación y remodelación (Swartz, J.M., Byström, J., Dyer, K.D., Nitto, T., Wynn, T.A., Rosenberg, H.F., 2004. Plasminogen activator inhibitor-2 (PAI-2) in eosinophilic leukocytes. *J. Leukoc.Biol.* 76, 812–819).
- MSR1 (Receptor "basura" de macrófagos de clase A, también llamados SR-A o CD204. Estos receptores son glicoproteínas triméricas integrales de membrana, inicialmente descritas como específicas de macrófagos (Naito, M., Kodama, T., Matsumoto, A., Doi, T., Takahashi, K., 1991. Tissue distribution, intracellular localization, and in vitro expression of bovine macrophage scavenger receptors. *Am. J. Pathol.* 139, 1411–1423), que han sido implicados en muchos procesos fisiológicos y patológicos asociados a este tipo celular. Posteriormente, se encontraron además en otros tipos de células (normalmente de localización tisular), tales como células musculares lisas vasculares, células endoteliales (EC), células epiteliales pulmonares humanas, etc (Tomokiyo, R., Jinnouchi, K., Honda, M., Wada, Y., Hanada, N., Hiraoka, T., et al., 2002. Production, characterization, and interspecies reactivities of monoclonal antibodies against human class A macrophage scavenger receptors. *Atherosclerosis* 161, 123–132), hecho que incrementa su potencial fisiopatológico, señalado como un pivote central de salud y enfermedad (Kelley, J.L., Ozment, T.R.,

Li, C., Schweitzer, J.B., Williams, D.L., 2014. Scavenger Receptor-A (CD204): a two-edged sword in health and disease. *Crit. Rev. Immunol.* 34, 241–261).

- MSR1 inferior (banda de menor peso molecular reconocida por el anticuerpo monoclonal específico de MSR1 humano, en el análisis proteico por *western*).
- 5 - MSR1 superior (banda de mayor peso molecular reconocida, por el anticuerpo monoclonal específico de MSR1 humano, en el análisis proteico por *western*).
- PHLDA1(pleckstrin homology-like domain, family A, member 1, una proteína nuclear rica en prolina-histidina que ha sido descrita en humanos como marcador putativo de células madre epiteliales en el intestino (Sakthianandeswaren, A., Christie, M., D'Andreti, C., Tsui, C., Jorissen, R.N., Li, S., et al., 2011. PHLDA1 expression marks the putative epithelial stem cells and contributes to intestinal tumorigenesis. *Cancer Res.* 71, 3709–3719).
- 10 - CHI3L1(*chitinase 3-like 1*, una glicoproteína, miembro de la familia 18 de glicosil transferasas o YKL-40. Carece de actividad quitinasa y es secretada por macrófagos activados, condrocitos, neutrófilos y células del líquido sinovial. Se piensa que juegan un papel la inflamación y remodelado tisular y su papel como posible biomarcador ha sido revisado en mecanismos de señalización regulados por YKL-40.
- IL10 (Citocina con efectos pleiotrópicos, producida principalmente por monocitos y en menor cantidad por linfocitos, que ha sido descrita como potencial controladora de la respuesta inmune.
- 20 - IL8 (Interleucina 8, o miembro de la familia CXC de quimocinas, considerada como uno de los principales mediadores de la respuesta inflamatoria y muy importante para la supervivencia y quimiotaxis de los neutrófilos. Es secretado por diversos tipos celulares y se le considera relacionado con la patogénesis de la bronquiolitis, enfermedad respiratoria causada por infección viral, así como implicado en el daño pulmonar agudo, por afectar entre otras cosas, a la supervivencia de los neutrófilos.
- PI3 (Inhibidor de peptidasa 3 derivado de la piel o inhibidor específico de elastasa (Trappin-2 o Elafin) que funciona como un péptido antimicrobiano. Es un potente inhibidor de serín-proteasas, por lo que previene el daño excesivo en los sitios inflamatorios. Modula un gran rango de parámetros que son críticos para la inflamación, aunque con efectos pleiotrópicos y/o Periostina (Proteína secretada compuesta por 4 dominios de fascilina 1 alineados en tándem, de la que se sospecha que es una molécula de adhesión y que puede estar implicada en la fibrosis subepitelial.
- 30

En la técnica anterior se conoce una diversidad de métodos estadísticos y matemáticos para establecer el nivel umbral o límite de concentración. Un nivel de concentración umbral o límite para un biomarcador particular puede seleccionarse, por ejemplo, basándose en datos de los gráficos de características operativas del receptor (ROC), como se describe en los Ejemplos y Figuras de la presente invención. Un experto en la materia apreciará que estos niveles de concentración umbral o límite pueden variarse, por ejemplo, moviéndose a lo largo del gráfico ROC para cualquiera de los biomarcadores descritos en la presente invención, o para cualquier combinación de los mismos, para obtener diferentes valores de sensibilidad o especificidad, afectando de esta manera al rendimiento global del ensayo. Por ejemplo, si el objetivo es tener un método de diagnóstico sólido desde el punto de vista clínico, se debería intentar tener una alta sensibilidad. Sin embargo, si el objetivo es tener un método económico, se debería intentar conseguir una alta especificidad. El mejor límite se refiere al valor obtenido a partir del gráfico ROC para un biomarcador particular, o una combinación particular, que produce la mejor sensibilidad y especificidad. Los valores de sensibilidad y especificidad se calculan sobre el intervalo de umbrales (límites). De esta manera, los valores umbral o límite pueden seleccionarse de tal forma que la sensibilidad y/o especificidad sean al menos de aproximadamente un 70%, y pueden ser, por ejemplo, de al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o al menos un 100% en al menos el 60% de la población de pacientes ensayada, o en al menos el 65 %, 70 %, 75 % u 80 % de la población de pacientes ensayada.

Por consiguiente, cada una de las realizaciones citadas a lo largo de la presente invención preferentemente se realiza determinando los niveles de concentración de al menos uno de los biomarcadores descritos en la presente invención en una muestra aislada a partir de un sujeto a diagnosticar o explorar, y comparando los niveles de concentración de dicho biomarcador con valores umbral o límite predeterminados.

Descripción detallada de la invención

Considerando los conocimientos anteriores, la presente invención, pretende aportar nuevos marcadores y/o combinaciones de biomarcadores, capaces de definir en muestras sencillas de analizar, preferiblemente derivadas de sangre periférica como suero, plasma o proteínas derivadas de PBMCs, así como, esputo u otra muestra biológica del órgano diana (por órgano diana se entiende pulmón o cualquier parte de las vías áreas de un sujeto humano),

grupos de pacientes diferenciales de 3 fenotipos clínicos: AA (Asma Alérgica), ANA (Asma No Alérgica) y Alergia sin asma (A), así como marcadores potenciales capaces de diferenciar gravedad.

5 En la presente invención, se propone, por tanto, la utilidad del estudio de la expresión de 8 proteínas, 5 en suero y 3 por *western-blot* (tal y como se describe en los ejemplos de la invención), como potenciales biomarcadores diferenciales de varios fenotipos clínicos: Asma No Alérgica (ANA), Asma Alérgica (AA) y Alergia sin asma (A), así como, de biomarcadores diferenciales de gravedad en asma: ANA Grave vs ANA Moderada/leve (M/L) y AA Grave vs AA Moderada/leve (M/L). Asimismo, la presente invención proporciona una serie de biomarcadores capaces de discriminar entre distintos fenotipos clínicos tal y como se ilustra a lo largo de la descripción.

15 Para definir los biomarcadores específicos de cada condición, se ha realizado un análisis de curvas ROC (cuantitativo, que nos permite definir un umbral idóneo de discriminación y cualitativo) de la expresión proteica, comparando el AUC de los potenciales biomarcadores de forma individual y combinándolos de dos en dos o tres en tres.

Las comparaciones realizadas son:

1. Cada fenotipo clínico (ANA total, AA total y A) respecto al grupo control.
2. Cada sub-fenotipo de asmáticos atendiendo a la gravedad:
 - a. Moderado/leve respecto al control
 - 20 b. Grave respecto al control
 - c. Moderado/leve respecto al Grave
3. Además se han comparado los fenotipos clínicos entre sí: ANA total vs AA total, ANA Grave vs AA Grave, ANA M/L vs AA M/L, AA total vs A, AA Grave vs A, AA M/L vs A.

25 Adjuntamos las tablas de resultados, de todos los biomarcadores analizados, señalando sólo los resultados que dan una curva de ROC cuantitativa buena (AUC: 0.75-0.9), muy buena (AUC: 0.9-0.97) o excelente (AUC: 0.97-1). Se ha optado por el criterio del valor AUC cuantitativo porque nos permite definir umbrales de separación entre grupos, de una forma objetiva y por tanto, sería de utilidad para futuros *Kits*.

BIOMARCADORES PARA ASMA NO ALÉRGICA (ANA)**1. Comparaciones entre Controles sanos y Asmáticos no alérgicos (Población total) (ANA)**

- N0=Observaciones en grupo Control
- 5 - N1=Observaciones en Grupo Asmático no alérgico (ANA)
- AUC: Área Bajo la Curva ROC a nivel cuantitativo. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo denominado en las tablas como “Variables cuantitativas” y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como “Variables cualitativas”.
- 10

Tabla 5. Curvas ROC Individual

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 30 | 30 | 0.60 (0.45 - 0.75) | 13064 |
| IL10 | 9 | 11 | 0.42 (0.15 - 0.70) | 102.9 |
| IL8 | 9 | 14 | 0.50 (0.25 - 0.75) | 39 |
| PI3 | 30 | 29 | 0.50 (0.35 - 0.65) | 6528 |
| Periostina | 30 | 30 | 0.62 (0.48 - 0.77) | 13633 |
| MSR1 superior | 9 | 18 | 0.60 (0.38 - 0.81) | 0.208 |
| MSR1 inferior | 9 | 18 | 0.96 (0.89 - 1.00) | 0.148 |
| PHLDA1 | 8 | 5 | 0.42 (0.07 - 0.78) | 0.011 |
| SERPINB2 | 6 | 11 | 0.91 (0.72 - 1.00) | 0.404 |

El valor del umbral sólo se detalla aquí, a nivel individual, porque será el mismo para cada biomarcador, aunque vaya combinado.

Tabla 6. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|-------------------------------|-----------|-----------|----------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 9 | 11 | 0.48 (0.20 - 0.77) | 0.63 (0.37 - 0.89) |
| CHI3L1+IL8 | 9 | 14 | 0.67 (0.44 - 0.91) | 0.64 (0.43 - 0.84) |
| CHI3L1+PI3 | 30 | 29 | 0.59 (0.44 - 0.74) | 0.70 (0.57 - 0.82) |
| CHI3L1+Periostina | 30 | 30 | 0.63 (0.49 - 0.78) | 0.72 (0.60 - 0.85) |
| CHI3L1 + MSR1 superior | 9 | 18 | 0.78 (0.60 - 0.95) | 0.84 (0.71 - 0.98) |
| CHI3L1 + MSR1 inferior | 9 | 18 | 0.97 (0.91 - 1.00) | 0.99 (0.97 - 1.00) |
| CHI3L1+PHLDA1 | 8 | 5 | 0.70 (0.39 - 1.00) | 0.68 (0.37 - 0.98) |
| CHI3L1 + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.92 (0.77 - 1.00) | 0.92 (0.78 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 9 | 11 | 0.59 (0.32 - 0.85) | 0.58 (0.33 - 0.82) |
| IL10+Periostina | 9 | 11 | 0.47 (0.19 - 0.76) | 0.64 (0.39 - 0.89) |
| IL8+PI3 | 9 | 14 | 0.61 (0.37 - 0.85) | 0.70 (0.53 - 0.87) |
| IL8+Periostina | 9 | 14 | 0.74 (0.52 - 0.95) | 0.74 (0.59 - 0.89) |
| PI3+Periostina | 30 | 29 | 0.67 (0.53 - 0.82) | 0.69 (0.56 - 0.82) |
| PI3+MSR1 superior | 9 | 17 | 0.63 (0.41 - 0.84) | 0.73 (0.56 - 0.89) |
| PI3 + MSR1 inferior | 9 | 17 | 0.96 (0.88 - 1.00) | 0.99 (0.98 - 1.00) |
| PI3+PHLDA1 | 8 | 5 | 0.47 (0.09 - 0.86) | 0.75 (0.50 - 1.00) |
| PI3 + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.91 (0.72 - 1.00) | 0.96 (0.88 - 1.00) |
| Periostina+MSR1 superior | 9 | 18 | 0.73 (0.54 - 0.93) | 0.75 (0.63 - 0.87) |
| Periostina + MSR1 inferior | 9 | 18 | 0.96 (0.89 - 1.00) | 0.97 (0.92 - 1.00) |
| Periostina + PHLDA1 | 8 | 5 | 0.82 (0.59 - 1.00) | 0.81 (0.50 - 1.00) |
| Periostina + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.95 (0.85 - 1.00) | 0.98 (0.95 - 1.00) |

Tabla 7. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | Variables |
|--|----|----|---------------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 9 | 11 | 0.59 (0.31 - 0.86) | 0.68 (0.43 - 0.93) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 9 | 11 | 0.53 (0.25 - 0.80) | 0.73 (0.50 - 0.95) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 9 | 14 | 0.67 (0.43 - 0.90) | 0.74 (0.55 - 0.94) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 9 | 14 | 0.72 (0.50 - 0.94) | 0.75 (0.55 - 0.94) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 29 | 0.66 (0.52 - 0.80) | 0.78 (0.66 - 0.89) |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior | 9 | 17 | 0.77 (0.59 - 0.96) | 0.88 (0.76 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior | 9 | 17 | 0.97 (0.91 - 1.00) | |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 8 | 5 | 0.70 (0.39 - 1.00) | 0.86 (0.64 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.92 (0.77 - 1.00) | 0.97 (0.91 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + MSR1 superior | 9 | 18 | 0.83 (0.67 - 0.98) | 0.86 (0.73 - 0.99) |
| CHI3L1 + Periostina + MSR1 inferior | 9 | 18 | 0.97 (0.91 - 1.00) | 0.99 (0.97 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + PHLDA1 | 8 | 5 | 0.78 (0.51 - 1.00) | 0.84 (0.61 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.94 (0.81 - 1.00) | 0.99 (0.97 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 9 | 11 | 0.57 (0.30 - 0.83) | 0.65 (0.39 - 0.90) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 9 | 14 | 0.75 (0.53 - 0.96) | 0.76 (0.59 - 0.92) |
| PI3 + Periostina + MSR1 superior | 9 | 17 | 0.77 (0.58 - 0.96) | 0.80 (0.65 - 0.95) |
| PI3 + Periostina + MSR1 inferior | 9 | 17 | 0.97 (0.90 - 1.00) | 0.99 (0.98 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + PHLDA1 | 8 | 5 | 0.78 (0.51 - 1.00) | 0.89 (0.68 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.94 (0.81 - 1.00) | 0.980.95 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 5 a 7, proponemos como primer aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLDA1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido o con el nivel de concentración de un sujeto sano, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica. Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al individuo sano o con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 5 indica

claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica. Por otro lado, las tablas 6 y 7 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo de padecer asma no alérgica. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el primer aspecto de la invención.

Una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma no alérgica, que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma no alérgica, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma no alérgica, que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma no alérgica. Se hace notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la descripción, en particular son especialmente útiles medicamentos de control o mantenimiento, que deben administrarse a diario durante períodos prolongados, incluyen glucocorticoides inhalados (GCI) o sistémicos, antagonistas de los receptores de los leucotrienos (ARLT), agonistas β 2-adrenérgicos de acción larga (LABA), tiotropio y anticuerpos monoclonales anti-IgE (omalizumab). Las cromonas y la teofilina de liberación retardada podrían también ser terapia útiles en este tipo de patologías. Los medicamentos de alivio también se podrían utilizar a demanda para tratar o prevenir la broncoconstricción de forma rápida y, entre ellos, se encuentran los agonistas β 2-adrenérgicos de acción corta (SABA) inhalados (de elección) y los anticolinérgicos inhalados (bromuro de ipratropio). En un supuesto de asma grave puede existir la necesidad de precisar múltiples fármacos y a altas dosis para su tratamiento.

Otra realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en una muestra biológica mínimamente invasiva de los sujetos a seleccionar, tal como una muestra de sangre (tal y como una muestra de sangre total) o derivadas de sangre periférica como suero, plasma o proteínas derivadas de PBMCs, así como, esputo u otra muestra biológica del órgano diana (por órgano diana se entiende pulmón o cualquier parte de las vías áreas de un sujeto humano). Preferiblemente, el sujeto es un sujeto humano.

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 5 a 7, proponemos como segundo aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el primer aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de tener asma no alérgica, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma no alérgica.

Una realización preferida del segundo aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, Donde el kit descrito en el párrafo anterior puede implementarse o utilizarse para llevar a cabo la presente invención utilizando cualquier técnica adecuada para ello. En este sentido, diversas técnicas capaces de implementar o de llevar a la práctica la presente invención son bien conocidas en el estado del arte. A continuación detallo algunas de las mismas: formación de inmuno-precipitados solos o combinados con difusión y/o electroforesis (Western-blot), técnicas colorimétricas, o medición directa de la unión del anticuerpo al antígeno (ELISAS). Todos estos principios se usan de una u otra manera en kits que están comercialmente disponibles para el diagnóstico de enfermedades y pueden implementarse fácilmente en la presente invención.

2. Comparaciones entre controles y asmáticos no alérgicos (ANA) leves o moderados

- N0=Observaciones en grupo Control
- N1=Observaciones en Grupo ANA Moderado/leve
- AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo

denominado en las tablas como “Variables cuantitativas” y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como “Variables cualitativas”.

Tabla 8. Curvas ROC Individual

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|----------------------|----------|----------|---------------------------|--------------|
| CHI3L1 | 30 | 15 | 0.56 (0.39 - 0.73) | 13064 |
| IL10 | 9 | 6 | 0.41 (0.08 - 0.74) | 102.9 |
| IL8 | 9 | 7 | 0.62 (0.30 - 0.94) | 677 |
| PI3 | 30 | 15 | 0.51 (0.34 - 0.69) | 3074 |
| Periostina | 30 | 15 | 0.69 (0.52 - 0.86) | 15787 |
| MSR1 superior | 9 | 8 | 0.60 (0.29 - 0.90) | 0.208 |
| MSR1 inferior | 9 | 8 | 1.00 (1.00 - 1.00) | 0.148 |
| PHLDA1 | 8 | 7 | 0.48 (0.15 - 0.81) | 0.014 |
| SERPINB2 | 6 | 6 | 0.89 (0.66 - 1.00) | 0.404 |

Tabla 9. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|------------------------------|----------|----------|---------------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 9 | 6 | 0.41 (0.08 - 0.74) | 0.73 (0.45 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 | 9 | 7 | 0.63 (0.32 - 0.95) | 0.77 (0.54 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 30 | 15 | 0.56 (0.39 - 0.73) | 0.71 (0.60 - 0.81) |
| CHI3L1 + Periostina | 30 | 15 | 0.70 (0.53 - 0.86) | 0.81 (0.68 - 0.94) |
| CHI3L1 + MSR1 superior | 9 | 8 | 0.83 (0.63 - 1.00) | 0.90 (0.78 - 1.00) |
| CHI3L1 + SERPINB2 | 6 | 6 | 0.97 (0.90 - 1.00) | 0.92 (0.75 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 9 | 6 | 0.67 (0.35 - 0.99) | 0.67 (0.40 - 0.94) |
| IL10+Periostina | 9 | 6 | 0.63 (0.32 - 0.94) | 0.74 (0.49 - 0.99) |
| IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.76 (0.50 - 1.00) | 0.90 (0.79 - 1.00) |
| IL8 + Periostina | 9 | 7 | 0.87 (0.70 - 1.00) | 0.90 (0.79 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 30 | 15 | 0.69 (0.52 - 0.86) | 0.73 (0.61 - 0.86) |
| PI3 + MSR1 superior | 9 | 8 | 0.61 (0.32 - 0.90) | 0.81 (0.60 - 1.00) |
| PI3 + SERPINB2 | 6 | 6 | 0.89 (0.66 - 1.00) | 0.97 (0.91 - 1.00) |
| Periostina + MSR1 superior | 9 | 8 | 0.81 (0.58 - 1.00) | 0.80 (0.60 - 1.00) |
| Periostina + SERPINB2 | 6 | 6 | 0.97 (0.90 - 1.00) | 0.99 (0.95 - 1.00) |

Tabla 10. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | |
|---------------------------------------|----|----|--------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 9 | 6 | 0.67 (0.34 - 0.99) | 0.74 (0.49 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 9 | 6 | 0.63 (0.31 - 0.95) | 0.80 (0.57 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.79 (0.55 - 1.00) | 0.91 (0.79 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 9 | 7 | 0.87 (0.70 - 1.00) | 0.91 (0.79 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 15 | 0.68 (0.51 - 0.85) | 0.82 (0.70 - 0.94) |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior | 9 | 8 | 0.83 (0.63 - 1.00) | 0.92 (0.81 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 6 | 6 | | 0.97 (0.91 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + MSR1 superior | 9 | 8 | 0.88 (0.71 - 1.00) | 0.98 (0.93 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 6 | | 0.99 (0.95 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 9 | 6 | 0.61 (0.29 - 0.93) | 0.77 (0.52 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 9 | 7 | 0.84 (0.64 - 1.00) | 0.97 (0.90 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + MSR1 superior | 9 | 8 | 0.81 (0.58 - 1.00) | 0.88 (0.74 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 6 | 0.97 (0.90 - 1.00) | 0.99 (0.95 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 8 a 10, proponemos como tercer aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica con persistencia leve o moderada que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLD1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido o con el nivel de concentración de un sujeto sano, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica con persistencia leve o moderada. Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al individuo sano o con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 8 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica con persistencia leve o moderada. Por otro lado, las tablas 9 y 10 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo de padecer asma no

alérgica con persistencia leve o moderada. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el tercer aspecto de la invención.

5 Una realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma no alérgica con persistencia leve o moderada, que comprende las etapas a) y b) del primer aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma no alérgica con persistencia leve o moderada por medio de un examen clínico.

10 Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma no alérgica con persistencia leve o moderada, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) del tercer aspecto de la invención.

15 Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma no alérgica con persistencia leve o moderada, que comprende las etapas a) y b) del tercer aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma no alérgico con persistencia leve o moderada. Se hace
20 notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la descripción, en particular en el primer aspecto de la invención.

Otra realización preferida del tercer aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo de muestras biológicas detalladas en el primer aspecto de la invención.

25

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 8 a 10, proponemos como cuarto aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el tercer aspecto de la invención, donde
30 diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de tener asma no alérgico con persistencia leve o moderada, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma no alérgico con persistencia leve o moderada.

Una realización preferida del cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, donde dicho *kit* puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

5 **3.Comparaciones entre controles y asmáticos no alérgicos (ANA) graves**

- N0=Observaciones en grupo Control
- N1=Observaciones en Grupo ANA Grave
- AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo denominado en las tablas como "Variables cuantitativas" y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como "Variables cualitativas".

10

Tabla 11. Curvas ROC Individual

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 30 | 15 | 0.63 (0.45 - 0.81) | 14367 |
| IL10 | 9 | 5 | 0.56 (0.23 - 0.88) | 32.5 |
| IL8 | 9 | 7 | 0.62 (0.28 - 0.96) | 262 |
| PI3 | 30 | 14 | 0.52 (0.33 - 0.71) | 6528 |
| Periostina | 30 | 15 | 0.55 (0.37 - 0.74) | 13633 |
| MSR1 superior | 9 | 10 | 0.60 (0.31 - 0.89) | 0.254 |
| MSR1 inferior | 9 | 10 | 0.93 (0.80 - 1.00) | 0.137 |
| PHLDA1 | 8 | 7 | 0.48 (0.15 - 0.81) | 0.014 |
| SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.359 |

15

Tabla 12. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|-------------------------------|----|----|--------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 9 | 5 | 0.62 (0.30 - 0.94) | 0.77 (0.54 - 0.99) |
| CHI3L1+IL8 | 9 | 7 | 0.67 (0.37 - 0.96) | 0.78 (0.55 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 30 | 14 | 0.63 (0.45 - 0.81) | 0.68 (0.53 - 0.84) |
| CHI3L1+Periostina | 30 | 15 | 0.64 (0.46 - 0.82) | 0.72 (0.57 - 0.88) |
| CHI3L1 + MSR1 superior | 9 | 10 | 0.76 (0.50 - 1.00) | 0.83 (0.66 - 1.00) |
| CHI3L1 + MSR1 inferior | 9 | 10 | 0.94 (0.83 - 1.00) | 0.99 (0.96 - 1.00) |
| CHI3L1 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.93 (0.80 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 9 | 5 | 0.51 (0.18 - 0.84) | 0.70 (0.44 - 0.96) |
| IL10 + Periostina | 9 | 5 | 0.60 (0.23 - 0.97) | 0.93 (0.80 - 1.00) |
| IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.46 (0.15 - 0.77) | 0.77 (0.54 - 1.00) |
| IL8+Periostina | 9 | 7 | 0.57 (0.27 - 0.88) | 0.76 (0.51 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 30 | 14 | 0.65 (0.47 - 0.84) | 0.71 (0.56 - 0.86) |
| PI3+MSR1 superior | 9 | 9 | 0.64 (0.35 - 0.93) | 0.78 (0.56 - 1.00) |
| PI3 + MSR1 inferior | 9 | 9 | 0.95 (0.85 - 1.00) | 0.99 (0.96 - 1.00) |
| PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| Periostina + MSR1 superior | 9 | 10 | 0.66 (0.38 - 0.93) | 0.75 (0.59 - 0.91) |
| Periostina + MSR1 inferior | 9 | 10 | 0.93 (0.80 - 1.00) | 0.95 (0.85 - 1.00) |
| Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.97 (0.87 - 1.00) | 0.98 (0.94 - 1.00) |

Tabla 13. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | Variables |
|--|----|----|--------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 9 | 5 | 0.64 (0.29 - 1.00) | 0.80 (0.54 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 9 | 5 | 0.64 (0.33 - 0.96) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.79 (0.56 - 1.00) | 0.87 (0.69 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 9 | 7 | 0.67 (0.37 - 0.96) | 0.84 (0.63 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 14 | 0.62 (0.43 - 0.81) | 0.80 (0.65 - 0.94) |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior | 9 | 9 | 0.64 (0.34 - 0.94) | 0.94 (0.84 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior | 9 | 9 | 0.95 (0.86 - 1.00) | |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + MSR1 superior | 9 | 10 | 0.76 (0.50 - 1.00) | 0.84 (0.68 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + MSR1 inferior | 9 | 10 | 0.94 (0.84 - 1.00) | 0.99 (0.96 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 9 | 5 | 0.60 (0.22 - 0.98) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 9 | 7 | 0.62 (0.32 - 0.92) | 0.76 (0.51 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + MSR1 superior | 9 | 9 | 0.77 (0.54 - 0.99) | 0.87 (0.70 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + MSR1 inferior | 9 | 9 | 0.96 (0.88 - 1.00) | 0.99 (0.96 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 11 a 13, proponemos como quinto aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica con persistencia grave que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLDA1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido o con el nivel de concentración de un sujeto sano, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica con persistencia grave. Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al individuo sano o con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 11 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica con persistencia grave. Por otro lado, las tablas 12 y 13 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo

de padecer asma no alérgica con persistencia grave. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el quinto aspecto de la invención.

5 Una realización preferida del quinto aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma no alérgica con persistencia grave, que comprende las etapas a) y b) del quinto aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma no alérgica con persistencia grave por medio de un examen clínico.

10

Otra realización preferida del quinto aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma no alérgica con persistencia grave, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) del quinto aspecto de la invención.

15

Otra realización preferida del quinto aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma no alérgica con persistencia grave, que comprende las etapas a) y b) del quinto aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma no alérgica con persistencia grave. Se hace notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la descripción, en particular en el primer aspecto de la invención.

20

Otra realización preferida del quinto aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo de muestras biológicas proporcionadas en el primer aspecto de la invención.

25

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 11 a 13, proponemos como sexto aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el quinto aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de tener asma no alérgica con persistencia grave, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma no alérgica con persistencia grave.

30

Una realización preferida del sexto aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, donde dicho kit puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

5 **4. Comparaciones entre asmáticos no alérgicos (ANA) leves/moderados y graves**

- N0=Observaciones en grupo ANA leve/moderado
- N1=Observaciones en Grupo ANA Grave
- AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo denominado en las tablas como “Variables cuantitativas” y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como “Variables cualitativas”.

Tabla 14. Curvas ROC individual

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 15 | 15 | 0.62 (0.40 - 0.83) | 18500 |
| IL10 | 6 | 5 | 0.47 (0.07 - 0.86) | 105.2 |
| IL8 | 7 | 7 | 0.76 (0.49 - 1.00) | 841 |
| PI3 | 15 | 14 | 0.55 (0.33 - 0.78) | 4845 |
| Periostina | 15 | 15 | 0.65 (0.44 - 0.86) | 17419 |
| MSR1 superior | 8 | 10 | 0.46 (0.17 - 0.75) | 0.257 |
| MSR1 inferior | 8 | 10 | 0.55 (0.27 - 0.83) | 0.056 |
| PHLDA1 | 8 | 7 | 0.48 (0.15 - 0.81) | 0.014 |
| SERPINB2 | 6 | 5 | 0.70 (0.32 - 1.00) | 0.132 |

15

Tabla 15. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|-----------------------------|-----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 6 | 5 | 0.43 (0.05 - 0.81) | 0.65 (0.29 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 | 7 | 7 | 0.76 (0.49 - 1.00) | 0.85 (0.65 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 15 | 14 | 0.56 (0.33 - 0.79) | 0.68 (0.48 - 0.87) |
| CHI3L1 + Periostina | 15 | 15 | 0.77 (0.59 - 0.96) | 0.75 (0.57 - 0.94) |
| CHI3L1+MSR1 superior | 8 | 10 | 0.68 (0.41 - 0.94) | 0.73 (0.51 - 0.94) |
| CHI3L1+MSR1 inferior | 8 | 10 | 0.65 (0.37 - 0.93) | 0.73 (0.51 - 0.94) |
| CHI3L1+SERPINB2 | 6 | 5 | 0.63 (0.25 - 1.00) | 0.90 (0.75 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 6 | 5 | 0.63 (0.25 - 1.00) | 0.83 (0.60 - 1.00) |
| IL10 + Periostina | 6 | 5 | 0.77 (0.43 - 1.00) | 0.90 (0.73 - 1.00) |
| IL8 + PI3 | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 0.96 (0.87 - 1.00) |
| IL8 + Periostina | 7 | 7 | 0.78 (0.52 - 1.00) | 0.96 (0.87 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 15 | 14 | 0.57 (0.34 - 0.80) | 0.73 (0.55 - 0.92) |
| PI3+MSR1 superior | 8 | 9 | 0.60 (0.30 - 0.90) | 0.67 (0.42 - 0.93) |
| PI3+MSR1 inferior | 8 | 9 | 0.60 (0.30 - 0.90) | 0.74 (0.49 - 1.00) |
| PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.73 (0.39 - 1.00) | 0.93 (0.82 - 1.00) |
| Periostina+MSR1 superior | 8 | 10 | 0.64 (0.36 - 0.92) | 0.72 (0.50 - 0.95) |
| Periostina + MSR1 inferior | 8 | 10 | 0.62 (0.35 - 0.90) | 0.81 (0.60 - 1.00) |
| Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.90 (0.71 - 1.00) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| MSR1 superior+MSR1 inferior | 8 | 10 | 0.55 (0.26 - 0.84) | 0.66 (0.41 - 0.92) |

Tabla 16. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | Variables |
|--|----|----|---------------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 6 | 5 | 0.63 (0.25 - 1.00) | 0.83 (0.58 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 6 | 5 | 0.77 (0.46 - 1.00) | 0.92 (0.76 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 7 | 7 | 0.88 (0.69 - 1.00) | 0.99 (0.96 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 7 | 7 | 0.98 (0.92 - 1.00) | 0.99 (0.96 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 15 | 14 | 0.76 (0.57 - 0.95) | 0.76 (0.58 - 0.94) |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior | 8 | 9 | 0.78 (0.53 - 1.00) | 0.82 (0.63 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior | 8 | 9 | 0.68 (0.40 - 0.96) | 0.82 (0.62 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.73 (0.40 - 1.00) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + MSR1 superior | 8 | 10 | 0.80 (0.57 - 1.00) | 0.88 (0.72 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + MSR1 inferior | 8 | 10 | 0.80 (0.57 - 1.00) | 0.89 (0.73 - 1.00) |
| CHI3L1 + MSR1 superior + MSR1 inferior | 8 | 10 | 0.68 (0.41 - 0.94) | 0.76 (0.54 - 0.98) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 6 | 5 | 0.77 (0.43 - 1.00) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | |
| PI3 + Periostina + MSR1 superior | 8 | 9 | 0.60 (0.30 - 0.89) | 0.72 (0.48 - 0.97) |
| PI3 + Periostina + MSR1 inferior | 8 | 9 | 0.60 (0.30 - 0.89) | 0.82 (0.61 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | |
| PI3 + MSR1 superior + MSR1 inferior | 8 | 9 | 0.60 (0.30 - 0.89) | 0.78 (0.52 - 1.00) |
| Periostina + MSR1 superior + MSR1 inferior | 8 | 10 | 0.62 (0.35 - 0.90) | 0.81 (0.61 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 14 a 16, proponemos como séptimo aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica con persistencia leve/moderada o grave que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLD1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica con distintos niveles de gravedad dependiendo del tipo de biomarcador y de su nivel de expresión diferencial (en términos de niveles de concentración). Se hace notar que dichas diferencias de

concentración con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 14 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica con distintos niveles de persistencia. Por otro lado, las tablas 15 y 16 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo de padecer asma no alérgica con distintos niveles de persistencia. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el séptimo aspecto de la invención.

10

Una realización preferida del séptimo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma no alérgica con distintos niveles de persistencia, que comprende las etapas a) y b) del séptimo aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma no alérgica con distintos niveles de persistencia por medio de un examen clínico.

15

Otra realización preferida del séptimo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma no alérgica, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) del séptimo aspecto de la invención.

20

Otra realización preferida del séptimo aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma no alérgica, que comprende las etapas a) y b) del quinto aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma no alérgica, teniendo en cuenta el tipo de gravedad o persistencia que presente. Se hace notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la descripción, en particular en el primer aspecto de la invención.

25

Otra realización preferida del séptimo aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo de muestras proporcionado en el primer aspecto de la invención.

30

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 14 a 16, proponemos como octavo aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos

que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el séptimo aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de tener asma no alérgica con distintos niveles de persistencia, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma no alérgica con una persistencia determinada, sea esta leve/moderada o grave.

Una realización preferida del octavo aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, donde dicho *kit* puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

BIOMARCADORES PARA ASMA ALÉRGICA (AA)

1. Comparaciones entre Controles y Asmáticos Alérgicos (AA) (Población total)

- N0=Observaciones en grupo Control
- N1=Observaciones en Grupo Asmático Alérgico
- AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo denominado en las tablas como “Variables cuantitativas” y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como “Variables cualitativas”.

Tabla 17. Curvas ROC individual

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 30 | 30 | 0.78 (0.66 - 0.91) | 20065 |
| IL10 | 9 | 21 | 0.37 (0.14 - 0.60) | 101.4 |
| IL8 | 9 | 14 | 0.76 (0.56 - 0.97) | 64 |
| PI3 | 30 | 30 | 0.44 (0.29 - 0.59) | 8196 |
| Periostina | 30 | 30 | 0.51 (0.36 - 0.66) | 13544 |
| PHLDA1 | 8 | 6 | 0.50 (0.16 - 0.84) | 0.005 |
| SERPINB2 | 6 | 11 | 0.97 (0.90 - 1.00) | 0.375 |

Tabla 18. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|------------------------------|----------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 | 9 | 21 | 0.63 (0.38 - 0.89) | 0.76 (0.55 - 0.96) |
| CHI3L1 + IL8 | 9 | 14 | 0.92 (0.80 - 1.00) | 0.90 (0.78 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 | 30 | 30 | 0.78 (0.66 - 0.91) | 0.78 (0.66 - 0.89) |
| CHI3L1 + Periostina | 30 | 30 | 0.79 (0.66 - 0.91) | 0.80 (0.69 - 0.91) |
| CHI3L1 + PHLDA1 | 8 | 6 | 0.75 (0.47 - 1.00) | 0.80 (0.58 - 1.00) |
| CHI3L1 + SERPINB2 | 6 | 11 | | 0.98 (0.95 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 9 | 21 | 0.63 (0.43 - 0.84) | 0.62 (0.43 - 0.81) |
| IL10 + Periostina | 9 | 21 | 0.85 (0.69 - 1.00) | 0.85 (0.73 - 0.98) |
| IL8 + PI3 | 9 | 14 | 0.63 (0.34 - 0.91) | 0.86 (0.72 - 1.00) |
| IL8 + Periostina | 9 | 14 | 0.74 (0.52 - 0.95) | 0.77 (0.58 - 0.95) |
| PI3+Periostina | 30 | 30 | 0.56 (0.41 - 0.71) | 0.60 (0.46 - 0.73) |
| PI3 + PHLDA1 | 8 | 6 | 0.58 (0.25 - 0.92) | 0.76 (0.54 - 0.98) |
| PI3 + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.97 (0.90 - 1.00) | 0.97 (0.91 - 1.00) |
| Periostina + PHLDA1 | 8 | 6 | 0.79 (0.51 - 1.00) | 0.90 (0.76 - 1.00) |
| Periostina + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.95 (0.85 - 1.00) | 0.98 (0.93 - 1.00) |

Tabla 19. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | Variables |
|---------------------------------------|----------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 9 | 21 | 0.71 (0.49 - 0.94) | 0.80 (0.62 - 0.98) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 9 | 21 | 0.83 (0.64 - 1.00) | 0.90 (0.80 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 9 | 14 | 0.92 (0.80 - 1.00) | 0.96 (0.89 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 9 | 14 | 0.91 (0.79 - 1.00) | 0.92 (0.82 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 30 | 0.78 (0.66 - 0.91) | 0.81 (0.70 - 0.92) |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 8 | 6 | 0.75 (0.47 - 1.00) | 0.82 (0.60 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + PHLDA1 | 8 | 6 | 0.71 (0.40 - 1.00) | 0.93 (0.80 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 11 | | 0.99 (0.97 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 9 | 21 | 0.86 (0.72 - 1.00) | 0.86 (0.74 - 0.99) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 9 | 14 | 0.67 (0.40 - 0.93) | 0.87 (0.73 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + PHLDA1 | 8 | 6 | 0.79 (0.51 - 1.00) | 0.95 (0.84 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 11 | 0.97 (0.90 - 1.00) | 0.99 (0.97 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 17 a 19, proponemos como noveno aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma alérgica que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLDA1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido o con el nivel de concentración de un sujeto sano, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica. Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al individuo sano o con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 17 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica. Por otro lado, las tablas 18 y 19 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo de padecer asma alérgica. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el noveno aspecto de la invención.

Una realización preferida del noveno aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma alérgica, que comprende las etapas a) y b) del noveno aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma alérgica por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del noveno aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma alérgica, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) del noveno aspecto de la invención.

Otra realización preferida del noveno aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma alérgica, que comprende las etapas a) y b) del noveno aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma alérgica. Se hace notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la

descripción, en particular en las tablas 3 y 4, en el primer aspecto de la invención y dirigiendo la terapia hacia la alergia subyacente que es la causa del asma (por ejemplo con Inmunoterapia específica de alérgenos o vacunas con los alérgenos causantes de la alergia o de la sensibilización alérgica etc..).

5

Otra realización preferida del noveno aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo de muestras proporcionado en el primer aspecto de la invención.

10 Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 17 a 19, proponemos como décimo aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el noveno aspecto de la invención, donde la sobreexpresión o diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores
15 mencionados es indicativa de riesgo de tener asma alérgica, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma alérgica.

Una realización preferida del décimo aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, donde dicho *kit* puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el
20 segundo aspecto de la invención.

2.Comparaciones entre Controles y Asmáticos Alérgicos (AA) leves o moderados

- N0=Observaciones en grupo Control
- 25 - N1=Observaciones en Grupo AA leve/moderado
- AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo denominado en las tablas como "Variables cuantitativas" y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como "Variables cualitativas".

30

Tabla 20. Curvas ROC Individual

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|---------------------------|---------------|
| CHI3L1 | 30 | 15 | 0.78 (0.64 - 0.91) | 14426 |
| IL10 | 9 | 13 | 0.36 (0.11 - 0.61) | 101.4 |
| IL8 | 9 | 7 | 0.59 (0.24 - 0.93) | 121 |
| PI3 | 30 | 15 | 0.46 (0.28 - 0.64) | 6519 |
| Periostina | 30 | 15 | 0.52 (0.34 - 0.69) | 7067 |
| PHLDA1 | 8 | 3 | | |
| SERPINB2 | 6 | 6 | 1.00 (1.00 - 1.00) | 0.097 |

Tabla 21. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables cuantitativas | Variables cualitativas |
|---------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-------------------------------|
| CHI3L1 + IL10 | 9 | 13 | 0.68 (0.43 - 0.92) | 0.76 (0.55 - 0.97) |
| CHI3L1 + IL8 | 9 | 7 | 0.87 (0.68 - 1.00) | 0.90 (0.72 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 | 30 | 15 | 0.78 (0.64 - 0.91) | 0.78 (0.66 - 0.90) |
| CHI3L1 + Periostina | 30 | 15 | 0.78 (0.64 - 0.91) | 0.78 (0.69 - 0.87) |
| IL10+PI3 | 9 | 13 | 0.62 (0.37 - 0.86) | 0.67 (0.44 - 0.90) |
| IL10 + Periostina | 9 | 13 | 0.83 (0.66 - 1.00) | 0.82 (0.65 - 0.98) |
| IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.63 (0.34 - 0.93) | 0.80 (0.57 - 1.00) |
| IL8 + Periostina | 9 | 7 | 0.54 (0.17 - 0.91) | 0.75 (0.52 - 0.99) |
| PI3+Periostina | 30 | 15 | 0.53 (0.35 - 0.71) | 0.64 (0.50 - 0.79) |

Tabla 22. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables cuantitativas | Variables cualitativas |
|----------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-------------------------------|
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 9 | 13 | 0.68 (0.44 - 0.93) | 0.78 (0.56 - 0.99) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 9 | 13 | 0.82 (0.64 - 1.00) | 0.88 (0.75 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.89 (0.71 - 1.00) | 0.96 (0.88 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 9 | 7 | 0.86 (0.66 - 1.00) | 0.95 (0.86 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 15 | 0.78 (0.65 - 0.92) | 0.83 (0.72 - 0.94) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 9 | 13 | 0.85 (0.68 - 1.00) | 0.83 (0.67 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 9 | 7 | 0.65 (0.36 - 0.94) | 0.82 (0.59 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 20 a 22, proponemos como undécimo aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma alérgica con persistencia leve o moderada que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, 5 PHLDA1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido o con el nivel de concentración de un sujeto sano, donde diferencias de concentración de al menos uno de 10 dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica con persistencia leve o moderada. Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al individuo sano o con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 20 indica 15 claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica con persistencia leve o moderada. Por otro lado, las tablas 21 y 22 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo de padecer asma alérgica con persistencia leve o moderada. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede 20 implementar en el método propuesto en el undécimo aspecto de la invención.

Una realización preferida del undécimo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma alérgica con persistencia leve o moderada, que comprende las etapas a) y b) del undécimo 25 aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma alérgica con persistencia leve o moderada por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del undécimo aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma alérgica con persistencia leve o moderada, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, 30 que comprende las etapas a) y b) del undécimo aspecto de la invención.

Otra realización preferida del undécimo aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma alérgica con persistencia leve o moderada, que comprende

las etapas a) y b) del undécimo aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma alérgica con persistencia leve o moderada. Se hace notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la descripción, en particular en el noveno aspecto de la invención.

5

Otra realización preferida del undécimo aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo de muestras biológicas proporcionado en el primer aspecto de la invención.

10

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 20 a 22, proponemos como duodécimo aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el undécimo aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de tener asma alérgica con persistencia leve o moderada, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma alérgica con persistencia leve o moderada.

15

Una realización preferida del duodécimo aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, donde dicho *kit* puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

20

3. Comparaciones entre Controles y Asmáticos Alérgicos (AA) graves

25

- N0=Observaciones en grupo Control
- N1=Observaciones en Grupo AA grave
- AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo denominado en las tablas como "Variables cuantitativas" y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como "Variables cualitativas".

30

Tabla 23. Curvas ROC

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 30 | 15 | 0.72 (0.57 - 0.87) | 20202 |
| IL10 | 11 | 13 | 0.45 (0.20 - 0.69) | 457.4 |
| IL8 | 14 | 7 | 0.52 (0.22 - 0.82) | 122 |
| PI3 | 29 | 15 | 0.46 (0.28 - 0.64) | 3269 |
| Periostina | 30 | 15 | 0.62 (0.45 - 0.79) | 22785 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 8 | 3 | | |
| SERPINB2 | 11 | 6 | 0.77 (0.54 - 1.00) | 0.086 |

Tabla 24. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables cuantitativas | Variables cualitativas |
|------------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-------------------------------|
| CHI3L1 + IL10 | 9 | 8 | 0.60 (0.31 - 0.89) | 0.80 (0.61 - 0.99) |
| CHI3L1 + IL8 | 9 | 7 | 1.00 (1.00 - 1.00) | 0.99 (0.97 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 | 30 | 15 | 0.80 (0.67 - 0.93) | 0.83 (0.73 - 0.94) |
| CHI3L1 + Periostina | 30 | 15 | 0.80 (0.67 - 0.92) | 0.86 (0.75 - 0.96) |
| IL10 + PI3 | 9 | 8 | 0.62 (0.33 - 0.92) | 0.82 (0.60 - 1.00) |
| IL10 + Periostina | 9 | 8 | 0.86 (0.68 - 1.00) | 0.98 (0.93 - 1.00) |
| IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.95 (0.85 - 1.00) | 0.94 (0.85 - 1.00) |
| IL8 + Periostina | 9 | 7 | 0.95 (0.85 - 1.00) | 0.94 (0.85 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 30 | 15 | 0.58 (0.40 - 0.76) | 0.68 (0.54 - 0.81) |
| PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.97 (0.87 - 1.00) | 0.98 (0.94 - 1.00) |

Tabla 25. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | Variables |
|-----------------------------------|----|----|--------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 9 | 8 | 0.72 (0.44 - 1.00) | 0.90 (0.77 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 9 | 8 | 0.86 (0.68 - 1.00) | 0.99 (0.95 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 15 | 0.81 (0.68 - 0.94) | 0.88 (0.79 - 0.98) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 9 | 8 | 0.89 (0.73 - 1.00) | 0.99 (0.95 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 9 | 7 | 0.94 (0.82 - 1.00) | 0.99 (0.97 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 23 a 25, proponemos como 13º aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma alérgica con persistencia grave que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLDA1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido o con el nivel de concentración de un sujeto sano, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica con persistencia grave. Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al individuo sano o con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 23 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica con persistencia grave. Por otro lado, las tablas 24 y 25 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo de padecer asma alérgica con persistencia grave. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el 13º aspecto de la invención.

Una realización preferida del 13º aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma alérgica con persistencia grave, que comprende las etapas a) y b) del 13º aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma alérgico con persistencia grave por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 13º aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma alérgica con persistencia grave, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) del 13º aspecto de la invención.

5

Otra realización preferida del 13º aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma alérgica con persistencia grave, que comprende las etapas a) y b) del 13º aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma no alérgica con persistencia grave. Se hace notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la descripción, en particular en el noveno aspecto de la invención.

10

Otra realización preferida del 13º aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo de muestras biológicas proporcionadas en el primer aspecto de la invención.

15

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 23 a 25, proponemos como 14º aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 13º aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de tener asma alérgica con persistencia grave, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma alérgica con persistencia grave.

20

Una realización preferida del 14º aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, donde dicho *kit* puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

25

4. Comparaciones entre Asmáticos Alérgicos (AA) leves o moderados y graves

30

- N0=Observaciones en grupo AA Leve/mod
- N1=Observaciones en Grupo AA Grave
- AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo

denominado en las tablas como “Variables cuantitativas” y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como “Variables cualitativas”.

Tabla 26. Curvas ROC Individual

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC 95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|---------------------|---------------|
| CHI3L1 | 15 | 15 | 0.50 (0.27 - 0.72) | 24144 |
| IL10 | 13 | 8 | 0.46 (0.20 - 0.72) | 57.1 |
| IL8 | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 17 |
| PI3 | 15 | 15 | 0.56 (0.35 - 0.78) | 5524 |
| Periostina | 15 | 15 | 0.52 (0.30 - 0.74) | 19119 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 3 | 3 | | |
| SERPINB2 | 6 | 5 | 0.77 (0.44 - 1.00) | 0.095 |

Tabla 27. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|---------------------|-----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 13 | 8 | 0.47 (0.21 - 0.73) | 0.67 (0.46 - 0.89) |
| CHI3L1+IL8 | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 0.87 (0.68 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 15 | 15 | 0.58 (0.36 - 0.79) | 0.68 (0.49 - 0.87) |
| CHI3L1+Periostina | 15 | 15 | 0.50 (0.28 - 0.72) | 0.72 (0.55 - 0.89) |
| CHI3L1+SERPINB2 | 6 | 5 | 0.90 (0.69 - 1.00) | 0.83 (0.57 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 13 | 8 | 0.65 (0.39 - 0.92) | 0.75 (0.53 - 0.97) |
| IL10+Periostina | 13 | 8 | 0.62 (0.37 - 0.88) | 0.73 (0.55 - 0.90) |
| IL8+PI3 | 7 | 7 | 0.78 (0.48 - 1.00) | 0.94 (0.84 - 1.00) |
| IL8+Periostina | 7 | 7 | 0.84 (0.62 - 1.00) | 0.85 (0.69 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 15 | 15 | 0.54 (0.32 - 0.75) | 0.66 (0.48 - 0.84) |
| PI3+SERPINB2 | 6 | 5 | 0.87 (0.59 - 1.00) | 0.90 (0.70 - 1.00) |
| Periostina+SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.90 (0.75 - 1.00) |

Tabla 28. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|-----------------------------------|----|----|--------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 13 | 8 | 0.65 (0.39 - 0.92) | 0.79 (0.59 - 0.99) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 13 | 8 | 0.63 (0.38 - 0.88) | 0.83 (0.67 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 7 | 7 | 0.82 (0.55 - 1.00) | 0.98 (0.93 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 7 | 7 | 0.84 (0.62 - 1.00) | 0.92 (0.78 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 15 | 15 | 0.56 (0.35 - 0.78) | 0.76 (0.58 - 0.93) |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.90 (0.69 - 1.00) | 0.97 (0.89 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.92 (0.76 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 13 | 8 | 0.74 (0.51 - 0.97) | 0.82 (0.65 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 7 | 7 | 0.82 (0.55 - 1.00) | 0.97 (0.90 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.93 (0.78 - 1.00) | 0.95 (0.84 - 1.00) |

A raíz de la información expuesta en las tablas 26 a 28, proponemos como 15º aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma alérgica con persistencia leve/moderada o grave que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLDA1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica con distintos niveles de gravedad dependiendo del tipo de biomarcador y de su nivel de expresión diferencial (en términos de niveles de concentración). Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 26 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica con distintos niveles de persistencia. Por otro lado, las tablas 27 y 28 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de riesgo de padecer asma alérgica con distintos niveles de persistencia. Cada una de dichas combinaciones

forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el 15° aspecto de la invención.

5 Una realización preferida del 15° aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma alérgica con distintos niveles de persistencia, que comprende las etapas a) y b) del 15° aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de asma alérgica con distintos niveles de persistencia por medio de un examen clínico.

10 Otra realización preferida del 15° aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma alérgica, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) del 15° aspecto de la invención.

15 Otra realización preferida del 15° aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma alérgica, que comprende las etapas a) y b) del 15° aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma alérgica, teniendo en cuenta el tipo de gravedad o persistencia que presente. Se hace notar que posibles terapias se mencionan expresamente a lo largo de la descripción, en particular en el noveno aspecto
20 de la invención.

Otra realización preferida del 15° aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo de muestras biológicas proporcionadas en el primer aspecto de la invención.
25

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 26 a 28, proponemos como 16° aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 15° aspecto de la invención, donde diferencias
30 de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de tener asma alérgica con distintos niveles de persistencia, para diagnosticar *in vitro* el riesgo de tener asma alérgica con una persistencia determinada, ya sea esta leve/moderada o grave.

Una realización preferida del 16º aspecto de la invención se refiere al uso del *kit*, donde dicho kit puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

5 **BIOMARCADORES PARA ALERGIA (A) SIN ASMA**

1. **Comparaciones entre Controles y Alérgicos (Población total) (A)**

- N0=Observaciones en grupo Control
- N1=Observaciones en Grupo Alérgico
- 10 - AUC: Área Bajo la Curva ROC. Para los modelos con combinaciones de dos o mas variables, el valor AUC se ha desdoblado en dos valores: Valor AUC cuantitativo denominado en las tablas como “Variables cuantitativas” y valor AUC Cualitativo denominado en las tablas como “Variables cualitativas”.

15 **Tabla 29. Curvas ROC Individual**

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 30 | 14 | 0.63 (0.45 - 0.82) | 9953 |
| IL10 | 9 | 4 | | |
| IL8 | 9 | 7 | 0.78 (0.48 - 1.00) | 627 |
| PI3 | 30 | 14 | 0.68 (0.49 - 0.87) | 7232 |
| Periostina | 30 | 14 | 0.74 (0.60 - 0.89) | 14505 |
| PHLDA1 | 8 | 7 | 0.48 (0.15 - 0.81) | 0.014 |
| SERPINB2 | 6 | 5 | 0.70 (0.32 - 1.00) | 0.554 |

Tabla 30. Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|-----------------------|----------|----------|---------------------------|---------------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + PI3 | 30 | 14 | 0.68 (0.50 - 0.87) | 0.78 (0.65 - 0.92) |
| CHI3L1+IL8 | 9 | 7 | 1.00 (1.00 - 1.00) | 1.00 (1.00 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina | 30 | 14 | 0.75 (0.61 - 0.90) | 0.85 (0.76 - 0.94) |
| CHI3L1+PHLDA1 | 8 | 7 | 0.64 (0.33 - 0.96) | 0.73 (0.46 - 1.00) |
| CHI3L1 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.70 (0.34 - 1.00) | 0.87 (0.66 - 1.00) |
| IL8 + PI3 | 9 | 7 | 0.87 (0.68 - 1.00) | 0.95 (0.88 - 1.00) |
| IL8 + Periostina | 9 | 7 | 0.90 (0.75 - 1.00) | 0.95 (0.88 - 1.00) |
| PI3 + Periostina | 30 | 14 | 0.80 (0.65 - 0.94) | 0.90 (0.83 - 0.98) |
| PI3 + PHLDA1 | 8 | 7 | 0.73 (0.46 - 1.00) | 0.80 (0.59 - 1.00) |
| PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.83 (0.57 - 1.00) | 0.93 (0.80 - 1.00) |
| Periostina+PHLDA1 | 8 | 7 | 0.39 (0.08 - 0.70) | 0.70 (0.42 - 0.97) |
| Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.80 (0.50 - 1.00) | 0.95 (0.84 - 1.00) |

Tabla 31. Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | Variables |
|-----------------------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 14 | 0.80 (0.66 - 0.95) | 0.93 (0.87 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 8 | 7 | 0.75 (0.47 - 1.00) | 0.80 (0.57 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.83 (0.57 - 1.00) | 0.93 (0.82 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + PHLDA1 | 8 | 7 | 0.66 (0.35 - 0.97) | 0.85 (0.57 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.77 (0.46 - 1.00) | |
| PI3 + Periostina + PHLDA1 | 8 | 7 | 0.82 (0.57 - 1.00) | 0.93 (0.81 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 6 | 5 | 0.90 (0.69 - 1.00) | |

- 5 A raíz de la información expuesta en las tablas 29 a 31, proponemos como 17º aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos alérgicos sin asma que comprende: (a) medir el patrón o nivel de concentración de al menos una de las siguientes proteínas: SERPINB2, MSR1 inferior, PHLDA1, MSR1 superior, CHI3L1, IL10, IL8, PI3 y/o Periostina, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos alérgicos a seleccionar; y

(b) comparar dicho patrón o nivel de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de concentración ya establecido, donde diferencias de concentración de al menos uno de dichos biomarcadores proteicos es indicativa de que dicho sujeto presenta alergia pero no presenta asma. Se hace notar que dichas diferencias de concentración con respecto al individuo sano o con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la concentración dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 29 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta alergia pero no presenta asma. Por otro lado, las tablas 30 y 31 indican combinaciones concretas de biomarcadores útiles en la determinación de la ausencia de asma en el contexto de un individuo con alergia. Cada una de dichas combinaciones forma parte y se puede implementar en el método propuesto en el 17° aspecto de la invención.

Una realización preferida del 17° aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de un sujeto alérgico del que se sospecha que no padece asma, que comprende las etapas a) y b) del 17° aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de asma por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 17° aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos alérgicos que no padecen asma, que comprende las etapas a) y b) del 17° aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que no se le ha diagnosticado asma.

Otra realización preferida del 17° aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en las tablas 29 a 31, proponemos como 18° aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el primer aspecto de la invención, donde la sobreexpresión o diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de que el sujeto alérgico no padece de asma.

Una realización preferida del 18° aspecto de la invención se refiere al uso del kit, donde dicho kit puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

5 Además de comparar con el grupo control se realizaron comparativas entre los grupos clínicos, y en base a los análisis de curvas ROC individual y agrupados de los 8 biomarcadores proteicos estudiados (ver datos al final ejemplo 3), las mejores opciones de biomarcadores para discriminar cada condición clínica analizada se detallan a continuación.

10

BIOMARCADORES PARA DISCRIMINACIÓN ENTRE FENOTIPOS CLINICOS DE ASMA

1. Biomarcadores capaces de discriminar Asmáticos no alérgicos (ANA) de Asmáticos Alérgicos (AA). Población total

15

| | <u>AUC</u> |
|---------------------------------|-------------|
| CHI3L1 | 0.74 |
| IL10+Periostina | 0.87 |
| CHI3L1+SERPINB2 | 0.83 |
| 20 CHI3L1+IL8 | 0.82 |
| IL8+SERPINB2 | 0.82 |
| PHLDA1+SERPINB2 | 0.80 |
| IL8+Periostina | 0.76 |
| CHI3L1+IL10+Periostina | 0.92 |
| 25 CHI3L1+IL8+Periostina | 0.88 |
| PI3+PHLDA1+SERPINB2 | 0.84 |
| CHI3L1+PI3+Periostina | 0.80 |

30

A raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 19° aspecto de la invención, un método in vitro para discriminar entre sujetos con riesgo de padecer ANA (Asmáticos no alérgicos) de Asmáticos Alérgicos (AA), que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos uno de los biomarcadores recogidos arriba, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores, de los sujetos a seleccionar con un

patrón o nivel de expresión ya establecido, donde diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una
5 infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la información proporcionada a lo largo de la presente invención indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos.

Una realización preferida del 19° aspecto de la invención se refiere a un método in vitro para
10 el diagnóstico diferencial entre sujetos con riesgo de padecer uno de los fenotipos clínicos mencionados en el párrafo anterior, que comprende las etapas a) y b) del 19° aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de alergia por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 19° aspecto de la invención se refiere a un método para tratar
15 sujetos con un fenotipo clínico determinado de asma, que comprende las etapas a) y b) del 19° aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente según el tipo de asma diagnosticado. Posibles tratamientos se reflejan en el primer y noveno aspectos de la invención de acuerdo al fenotipo clínico de la enfermedad.

Otra realización preferida del 19° aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo
20 con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 20°
aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los
25 biomarcadores mencionados en el 19° aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es capaz de discriminar entre sujetos con riesgo de padecer ANA (Asmáticos no alérgicos) de Asmáticos Alérgicos (AA).

Una realización preferida del 20° aspecto de la invención se refiere al uso del kit, donde
30 dicho kit puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

2. Biomarcadores capaces de discriminar Asmáticos no alérgicos (ANA) grave de Asmáticos Alérgicos (AA) grave.

| | <u>AUC</u> | |
|----|------------------------------|-------------|
| 5 | CHI3L1 | 0.82 |
| | SERPINB2 | 0.78 |
| | IL10+Periostina | 0.94 |
| | PI3+SERPINB2 | 0.92 |
| | CHI3L1+IL8 | 0.86 |
| 10 | CHI3L1+Periostina | 0.86 |
| | IL8+Periostina | 0.86 |
| | CHI3L1+IL8+Periostina | 0.96 |

A raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 21° aspecto de la invención, un método in vitro para discriminar entre sujetos con riesgo de padecer ANA (Asmáticos no alérgicos) grave de Asmáticos Alérgicos (AA) grave, que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos uno de los biomarcadores recogidos arriba, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador.

En este sentido, la información proporcionada a lo largo de la presente invención indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos.

Una realización preferida del 21° aspecto de la invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico diferencial entre sujetos con riesgo de padecer uno de los fenotipos clínicos mencionados en el párrafo de arriba, que comprende las etapas a) y b) del 21° aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de alergia por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 21° aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos con un fenotipo clínico determinado de asma, que comprende las etapas a) y b) del 21° aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente según el tipo de asma diagnosticado. Posibles tratamientos se reflejan en el primer y noveno aspectos de la invención de acuerdo al fenotipo clínico de la enfermedad.

Otra realización preferida del 21° aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 22° aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 21° aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es capaz de discriminar entre sujetos con riesgo de padecer ANA (Asmáticos no alérgicos) grave de Asmáticos Alérgicos (AA) grave,

Una realización preferida del 20° aspecto de la invención se refiere al uso del kit, donde dicho kit puede implementarse por medio de cualquier técnica de las descritas en el segundo aspecto de la invención.

3. Biomarcadores capaces de discriminar Asmáticos no alérgicos (ANA) Mod/leve de Asmáticos Alérgicos (AA) Mod/leve.

| | <u>AUC</u> |
|-------------------------------|-------------|
| CHI3L1+IL8 | 0.86 |
| IL10+Periostina | 0.82 |
| IL8+PI3 | 0.82 |
| IL8+Periostina | 0.82 |
| CHI3L1+IL10+Periostina | 0.90 |
| CHI3L1+PI3+Periostina | 0.80 |

A raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 23° aspecto de la invención, un método in vitro para discriminar entre sujetos con riesgo de padecer ANA (Asmáticos no

alérgicos) Mod/leve de Asmáticos Alérgicos (AA) Mod/leve, que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos uno de los biomarcadores recogidos arriba, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde 5 diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la información proporcionada a lo largo de la presente 10 invención indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos.

15 Una realización preferida del 23º aspecto de la invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico diferencial entre sujetos con riesgo de padecer uno de los fenotipos clínicos mencionados en el párrafo anterior, que comprende las etapas a) y b) del 23º aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de alergia por medio de un examen clínico.

20 Otra realización preferida del 23º aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos con un fenotipo clínico determinado de asma, que comprende las etapas a) y b) del 23º aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente según el tipo de asma diagnosticado. Posibles tratamientos se reflejan en el primer y noveno aspectos de la invención de acuerdo 25 al fenotipo clínico de la enfermedad.

Otra realización preferida del 23º aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

30 Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 24º aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 23º aspecto de la invención, donde diferencias de

expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es capaz de discriminar entre sujetos con riesgo de padecer ANA (Asmáticos no alérgicos) Mod/leve de Asmáticos Alérgicos (AA) Mod/leve.

5 **4. Biomarcadores capaces de discriminar Asmáticos Alérgicos (AA) de Alérgicos (A). Población total.**

| | <u>AUC</u> |
|----|---------------------------|
| | IL8 |
| | 0.88 |
| 10 | Periostina |
| | 0.8 |
| | SERPINB2 |
| | 0.93 |
| | CHI3L1+SERPINB2 |
| | 1 |
| | PI3+SERPINB2 |
| | 0.96 |
| | CHI3L1+IL8 |
| | 0.91 |
| 15 | CHI3L1+Periostina |
| | 0.81 |
| | IL8+PI3+Periostina |
| | 0.93 |

A raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 25° aspecto de la invención, un método in vitro para discriminar entre sujetos con riesgo de padecer AA (Asmáticos Alérgicos) de Alérgicos (A), que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos uno de los biomarcadores recogidos arriba, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la información proporcionada a lo largo de la presente invención indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos.

Una realización preferida del 25° aspecto de la invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico diferencial entre sujetos con riesgo de padecer uno de los fenotipos clínicos

mencionados en el párrafo anterior, que comprende las etapas a) y b) del 25° aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de asma por medio de un examen clínico.

5 Otra realización preferida del 25° aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos con un fenotipo clínico determinado de alergia, con y sin asma, que comprende las etapas a) y b) del 25° aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma. Posibles tratamientos se reflejan en el primer y noveno aspectos de la invención de acuerdo al fenotipo clínico de la enfermedad.

10

Otra realización preferida del 25° aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

15 Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 26° aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 25° aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es capaz de discriminar
 20 entre sujetos con riesgo de padecer AA (Asmáticos Alérgicos) de Alérgicos (A).

5. Biomarcadores capaces de discriminar Asmáticos Alérgicos (AA) graves de Alérgicos (A).

| | |
|----|---------------------------------------|
| 25 | <u>AUC</u> |
| | IL8 0.80 |
| | Periostina 0.77 |
| | IL8+Periostina 0.90 |
| | IL8+PI3+Periostina 0.98 |

30

A raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 27° aspecto de la invención, un método in vitro para discriminar entre sujetos con riesgo de padecer AA (Asmáticos Alérgicos) graves de Alérgicos (A), que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión

de al menos uno de los biomarcadores recogidos arriba, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la información proporcionada a lo largo de la presente invención indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos.

Una realización preferida del 27° aspecto de la invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico diferencial entre sujetos con riesgo de padecer uno de los fenotipos clínicos mencionados en el párrafo anterior, que comprende las etapas a) y b) del 27° aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de asma por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 27° aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos con un fenotipo clínico determinado de alergia, que comprende las etapas a) y b) del 27° aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma. Posibles tratamientos se reflejan en el primer y noveno aspectos de la invención de acuerdo al fenotipo clínico de la enfermedad.

Otra realización preferida del 27° aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 28° aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 27° aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es capaz de discriminar entre sujetos con riesgo de padecer AA (Asmáticos Alérgicos) graves de Alérgicos (A).

6. Biomarcadores capaces de discriminar Asmáticos Alérgicos (AA)**Mod/leves de Alérgicos (A).**

| | <u>AUC</u> |
|---------------------|-------------------|
| IL8 | 0.96 |
| 5 Periostina | 0.83 |
| SERPINB2 | 0.84 |
| PI3+SERPINB2 | 0.92 |

A raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 29º aspecto de la invención, un método in vitro para discriminar entre sujetos con riesgo de padecer AA (Asmáticos Alérgicos) Moderado/leve de Alérgicos (A), que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos uno de los biomarcadores recogidos arriba, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la información proporcionada a lo largo de la presente invención indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos fenotipos clínicos.

Una realización preferida del 29º aspecto de la invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico diferencial entre sujetos con riesgo de padecer uno de los fenotipos clínicos mencionados en el párrafo anterior, que comprende las etapas a) y b) del 29º aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de asma por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 29º aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos con un fenotipo clínico determinado de alergia, que comprende las etapas a) y b) del 29º aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma. Posibles tratamientos se reflejan en el primer y noveno aspectos de la invención de acuerdo al fenotipo clínico de la enfermedad.

Otra realización preferida del 29° aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

- 5 Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta arriba, proponemos como 30° aspecto de la invención, el uso de un kit que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 29° aspecto de la invención, donde diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es capaz de discriminar
- 10 entre sujetos con riesgo de padecer AA (Asmáticos Alérgicos) Moderado/leve de Alérgicos (A).

Tabla 32. Biomarcadores Génicos. Ranking de los 33 biomarcadores génicos en Asmáticos Alérgicos (AA) comparado con Controles sanos teniendo en cuenta los datos de las curvas ROC

| Asma Alérgico (AA) total | ROC | Punto Mejor | AA GRAVE | ROC | Punto Mejor | AA MODERADO /LEVE | ROC | Punto Mejor |
|--------------------------|--------------------------|-------------|----------|-----------------------|-------------|-------------------|--------------------------|-------------|
| CHI3L1 | Área 0.99, IC: 0.96-1 | 12.6 | CHI3L1 | Área 1, IC: 1-1 | 13.1 | PI3 | Área 1, IC: 0.98-1 | 12.6 |
| PI3 | Área 0.99, IC: 0.98-1 | 11.3 | LYN | Área 1, IC: 0.98-1 | 7.6 | CHI3L1 | Área 0.97, IC: 0.93-1 | 11 |
| IL1R2 | Área 0.98, IC: 0.94-1 | 9.2 | TAGAP | Área 0.99, IC: 0.98-1 | 9.4 | IL1R2 | Área 0.96, IC: 0.91-1 | 9.3 |
| CPA3 | Área 0.97, IC: 0.93-1 | 13.1 | PI3 | Área 0.99, IC: 0.97-1 | 11.3 | CPA3 | Área 0.96, IC: 0.91-1 | 13.8 |
| TNF | Área 0.95, IC: 0.9-1 | 10.8 | IL1R2 | Área 0.99, IC: 0.96-1 | 11.6 | TNF | Área 0.93, IC: 0.85-1 | 11.9 |
| LYN | Área 0.95, IC: 0.89-1 | 7.6 | CPA3 | Área 0.98, IC: 0.94-1 | 14.2 | TNFAIP3 | Área 0.91, IC: 0.81-1 | 5.2 |
| NFKBIZ | Área 0.93, IC: 0.86-1 | 6.7 | TNF | Área 0.97, IC: 0.92-1 | 10.7 | IL8 | Área 0.91, IC: 0.81-1 | 2.9 |
| TAGAP | Área 0.93, IC: 0.86-1 | 9.2 | NFKBIZ | Área 0.96, IC: 0.91-1 | 7 | LYN | Área 0.91, IC: 0.8-1 | 7.5 |
| IL8 | Área 0.93, IC: 0.84-1 | 2.9 | TGFB1 | Área 0.96, IC: 0.89-1 | 7.1 | SVIL | Área 0.9, IC: 0.79-1 | 11.7 |
| SVIL | Área 0.92, IC: 0.85-1 | 11.7 | TLR4 | Área 0.95, IC: 0.89-1 | 11 | SELL | Área 0.9, IC: 0.78-1 | 8.7 |
| TNFAIP3 | Área 0.92, IC: 0.84-0.99 | 5.1 | STAT1 | Área 0.95, IC: 0.88-1 | 7.9 | NFKBIZ | Área 0.9, IC: 0.77-1 | 6.7 |
| SELL | Área 0.92, IC: 0.84-1 | 8.6 | SVIL | Área 0.95, IC: 0.86-1 | 11.8 | S100A9 | Área 0.89, IC: 0.79-0.99 | 4.2 |
| IL4R | Área 0.92, IC: 0.84-0.99 | 10.4 | IL4R | Área 0.94, IC: 0.88-1 | 9.8 | IL4R | Área 0.89, IC: 0.78-1 | 10.3 |
| S100A9 | Área 0.9, IC: 0.82-0.99 | 4.3 | NCF2 | Área 0.94, IC: 0.87-1 | 9.3 | PTPRC | Área 0.88, IC: 0.78-0.99 | 6.7 |

| | | | | | | | | |
|---------|--------------------------|------|---------|--------------------------|------|---------|--------------------------|------|
| STAT1 | Area 0.9, IC: 0.81-0.98 | 7.9 | SELL | Area 0.94, IC: 0.86-1 | 8.4 | GADD45B | Area 0.87, IC: 0.76-0.98 | 6.2 |
| TGFB1 | Area 0.9, IC: 0.81-0.99 | 6.9 | IL8 | Area 0.94, IC: 0.86-1 | 4.8 | TAGAP | Area 0.87, IC: 0.74-1 | 9.2 |
| GADD45B | Area 0.89, IC: 0.8-0.98 | 6.4 | TNFAIP3 | Area 0.92, IC: 0.84-1 | 5.1 | DUSP1 | Area 0.87, IC: 0.73-1 | 4.3 |
| DUSP1 | Area 0.89, IC: 0.79-0.98 | 4.1 | S100A9 | Area 0.92, IC: 0.83-1 | 4.3 | APAF1 | Area 0.86, IC: 0.72-1 | 12.1 |
| TLR4 | Area 0.88, IC: 0.78-0.97 | 11 | GADD45B | Area 0.91, IC: 0.82-1 | 6.4 | STAT1 | Area 0.85, IC: 0.71-0.99 | 8 |
| APAF1 | Area 0.87, IC: 0.78-0.97 | 11.8 | DUSP1 | Area 0.9, IC: 0.81-1 | 4.1 | CCL5 | Area 0.85, IC: 0.7-1 | 6.1 |
| CCL5 | Area 0.87, IC: 0.77-0.97 | 6.1 | APAF1 | Area 0.89, IC: 0.79-0.99 | 11.8 | IFNG | Area 0.84, IC: 0.71-0.98 | 11.9 |
| NCF2 | Area 0.86, IC: 0.76-0.97 | 9.5 | CCL5 | Area 0.88, IC: 0.77-1 | 6 | SPN | Area 0.83, IC: 0.69-0.97 | 10.8 |
| ALOX15 | Area 0.86, IC: 0.69-1 | 15.4 | PRKACA | Area 0.87, IC: 0.76-0.98 | 10.2 | TGFB1 | Area 0.83, IC: 0.68-0.99 | 9.8 |
| IFNG | Area 0.85, IC: 0.76-0.95 | 12.3 | IFNG | Area 0.87, IC: 0.75-0.98 | 12.4 | GZMH | Area 0.82, IC: 0.67-0.98 | 10.9 |
| PTPRC | Area 0.85, IC: 0.73-0.96 | 6.4 | ALOX15 | Area 0.87, IC: 0.72-1 | 15.4 | TLR4 | Area 0.8, IC: 0.66-0.94 | 11 |
| GZMH | Area 0.83, IC: 0.72-0.93 | 9.5 | GZMH | Area 0.83, IC: 0.71-0.95 | 9.5 | C3AR1 | Area 0.8, IC: 0.64-0.95 | 11.3 |
| SPN | Area 0.82, IC: 0.71-0.93 | 10.8 | CTSG | Area 0.83, IC: 0.62-1 | 15.5 | ALOX5 | Area 0.78, IC: 0.63-0.93 | 8 |
| C3AR1 | Area 0.8, IC: 0.68-0.92 | 11.6 | PTPRC | Area 0.81, IC: 0.66-0.95 | 5.9 | NCF2 | Area 0.78, IC: 0.62-0.94 | 9.5 |
| PRKACA | Area 0.79, IC: 0.67-0.91 | 10.2 | C3AR1 | Area 0.81, IC: 0.65-0.97 | 11.6 | ALOX15 | Area 0.76, IC: 0.28-1 | 14.6 |
| ALOX5 | Area 0.79, IC: 0.66-0.91 | 8.3 | SPN | Area 0.8, IC: 0.67-0.93 | 10.1 | PRKACA | Area 0.72, IC: 0.53-0.9 | 10.7 |
| CTSG | Area 0.76, IC: 0.55-0.96 | 16.4 | ALOX5 | Area 0.79, IC: 0.65-0.93 | 8.3 | SOS1 | Area 0.67, IC: 0.49-0.86 | 12 |
| SOS1 | Area 0.72, IC: 0.59-0.86 | 11.1 | SOS1 | Area 0.78, IC: 0.64-0.92 | 11.2 | CTSG | Area 0.61, IC: 0.18-1 | 16.4 |
| CRTAP | Area 0.66, IC: 0.52-0.81 | 12.1 | CRTAP | Area 0.75, IC: 0.59-0.91 | 11.8 | CRTAP | Area 0.57, IC: 0.36-0.78 | 12.1 |

A raíz de la información expuesta en la tabla 32, proponemos como 30º aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma alérgico así como para determinar la gravedad de dicho asma, como asma grave o asma moderada

o leve, que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos uno de los genes recogidos en la tabla 32, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores génicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgico, así como una indicación de la gravedad de asma alérgico. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 32 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgico.

Una realización preferida del 30º aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma alérgico, así como para el diagnóstico/pronóstico de la gravedad de dicho asma, que comprende las etapas a) y b) del 30º aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de asma por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 30º aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos alérgicos que padecen asma, que comprende las etapas a) y b) del 30º aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma. Posibles tratamientos se reflejan en el noveno aspecto de la invención.

Otra realización preferida del 30º aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en la tabla 32, proponemos como 31º aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los biomarcadores mencionados en el 30º aspecto de la invención, donde la sobreexpresión o diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa

de riesgo de que un sujeto padezca asma alérgico, para diagnosticar *in vitro* la presencia de riesgo de tener asma alérgico.

Tabla 33. Ranking de los 9 biomarcadores génicos en Asma no Alérgico con los datos de las curvas ROC comparando con controles.

5

| Asmático No alérgicos (ANA) | ROC | Punto Mejor | ANA GRAVE | ROC | Punto Mejor | ANA MODERADO/ LEVE | ROC | Punto Mejor |
|-----------------------------|--------------------------|-------------|-----------|--------------------------|-------------|--------------------|--------------------------|-------------|
| PI3 | Area 0.99, IC: 0.98-1 | 11.2 | CHI3L1 | Area 1, IC: 0.99-1 | 11.8 | PI3 | Area 1, IC: 1-1 | 13.3 |
| CHI3L1 | Area 0.95, IC: 0.84-1 | 11.8 | PI3 | Area 0.99, IC: 0.96-1 | 11.2 | MSR1 | Area 0.94, IC: 0.87-1 | 13.1 |
| IL8 | Area 0.9, IC: 0.79-1 | 2.8 | IL8 | Area 0.91, IC: 0.8-1 | 3.3 | IL10 | Area 0.94, IC: 0.86-1 | 14.8 |
| MSR1 | Area 0.89, IC: 0.79-0.99 | 13.2 | CPA3 | Area 0.89, IC: 0.78-1 | 13 | CD86 | Area 0.91, IC: 0.82-1 | 12.4 |
| CPA3 | Area 0.88, IC: 0.78-0.99 | 12.7 | SERPINB2 | Area 0.86, IC: 0.73-0.98 | 11.9 | IL8 | Area 0.89, IC: 0.78-1 | 2.8 |
| IL10 | Area 0.87, IC: 0.75-0.98 | 14.5 | MSR1 | Area 0.82, IC: 0.65-0.99 | 13.2 | PHLDA1 | Area 0.89, IC: 0.77-1 | 7.7 |
| SERPINB2 | Area 0.84, IC: 0.72-0.95 | 12.6 | IL10 | Area 0.79, IC: 0.59-1 | 14.3 | CHI3L1 | Area 0.89, IC: 0.67-1 | 12.9 |
| PHLDA1 | Area 0.83, IC: 0.71-0.96 | 7.7 | PHLDA1 | Area 0.77, IC: 0.57-0.97 | 8.1 | CPA3 | Area 0.88, IC: 0.74-1 | 12.7 |
| CD86 | Area 0.81, IC: 0.7-0.93 | 12.9 | CD86 | Area 0.71, IC: 0.54-0.88 | 12.9 | SERPINB2 | Area 0.82, IC: 0.65-0.98 | 12.7, 13.6 |

A raíz de la información expuesta en la tabla 33, proponemos como 32º aspecto de la invención, un método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgico así como para determinar la gravedad de dicho asma, como asma grave o asma moderada o leve, que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos uno de los genes recogidos en la tabla 33, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores génicos, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido, donde diferencias de expresión de al menos uno de dichos biomarcadores es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgico así como una indicación de la gravedad de asma no alérgico. Se hace notar que dichas diferencias de expresión con respecto al valor de referencia, se corresponderán con una sobreexpresión o una infraexpresión de la expresión dependiendo del tipo de biomarcador. En este sentido, la tabla 33 indica claramente cuando la sobreexpresión o infraexpresión de cada uno de los biomarcadores es indicativo de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgico.

Una realización preferida del 32º aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma no alérgico, así como para el diagnóstico/pronóstico de la gravedad de dicho asma, que comprende las etapas a) y b) del 32º aspecto de la invención, y opcionalmente (c) confirmar la ausencia de asma por medio de un examen clínico.

Otra realización preferida del 32º aspecto de la invención se refiere a un método para tratar sujetos que padecen asma no alérgico, que comprende las etapas a) y b) del 32º aspecto de la invención, y (c) tratar al paciente al que se le ha diagnosticado asma. Posibles tratamientos se reflejan en el primer aspecto de la invención.

Otra realización preferida del 32º aspecto de la invención se refiere al método de acuerdo con cualquiera de las realizaciones precedentes, donde la muestra biológica se selecciona del grupo que se detalla en el primer aspecto de la invención.

Adicionalmente y, de nuevo, a raíz de la información expuesta en la tabla 33, proponemos como 33º aspecto de la invención, el uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos uno de los

biomarcadores mencionados en el 32° aspecto de la invención, donde la sobreexpresión o diferencias de expresión de al menos uno de los biomarcadores mencionados es indicativa de riesgo de que un sujeto padezca asma no alérgico, para diagnosticar *in vitro* la presencia de riesgo de tener asma no alérgico.

5

Se hace notar que los biomarcadores citados a lo largo de los 33 aspectos de la invención permitirían mejorar la clasificación o diagnóstico de los distintos fenotipos estudiados, lo que repercutirá positivamente en acotar y mejorar la pautas de tratamiento específico a llevar a cabo. Adicionalmente, en los ejemplos de la presente invención y, en concreto, en las tablas de resultados de curvas ROC se detallan los valores individuales de cada marcador proteico, capaz de discernir una condición de otra, según la comparación analizada. El valor del umbral es el parámetro cuantitativo capaz de diferenciar una condición de otra. Globalmente, en esta invención proponemos distintas combinaciones de biomarcadores que permitirían ser capaces de discriminar con muy buena sensibilidad y especificidad los tres fenotipos clínicos, así como la gravedad en el caso de fenotipos asmáticos. Todas las combinaciones señaladas, son combinaciones que podrían permitir hacer test diagnósticos buenos, muy buenos o excelentes. La elección en cada caso, planteamos realizarla en función del mejor valor de AUC cuantitativo (que permite objetivar los datos), analizado en el mayor número de casos y preferiblemente, realizado por la técnica más sencilla, el ELISA (aunque no se descarta la combinación de ELISA y *Western*), que se realizaría con el suero de los pacientes como una prueba clínica de rutina. En el supuesto de que se analicen biomarcadores genéticos se utilizarían técnicas apropiadas para dicho uso, tales como medir la expresión génica a través de técnicas de qRT-PCR.

Adicionalmente, alguno de los biomarcadores citados tal y como el biomarcador proteico PHLDA1; o el biomarcador proteico SERPINB2 en muestras periféricas, son la primera vez que se describen para su uso como potenciales biomarcadores de asma. Por esta razón, un 34° aspecto de la invención se refiere al uso del biomarcador proteico PHLDA1, o el biomarcador proteico SERPINB2 en muestras periféricas para la detección o diagnóstico del asma en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano. Asimismo, un 35° aspecto de la invención se refiere al uso de un *kit* o dispositivo capaz de detectar cualquiera de los biomarcadores proteicos PHLDA1, o SERPINB2 para la detección o diagnóstico del asma en un sujeto, preferiblemente en un sujeto humano.

Se hace notar que cada uno de los aspectos descritos a lo largo de la presente descripción se han de interpretar en virtud de los resultados proporcionados en los ejemplos y en las figuras para poder así determinar de forma específica aquellos biomarcadores o combinaciones de biomarcadores, así como sus niveles con respecto a determinados patrones, capaces de discriminar entre sujetos con riesgo de padecer asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo entre distintos fenotipos de asma.

A continuación se describe la presente invención a través de una serie de ejemplos, cuya única pretensión consiste en ilustrar la presente invención y en ningún caso se ha de entender que limitan la misma.

Ejemplos

Materiales y métodos

POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población de estudio estuvo constituida por 104 sujetos de cuatro grupos clínicamente definidos:

1. Sujeto controles, definidos como sujetos no alérgicos, no asmáticos y sin enfermedades respiratorias (n=30).
2. Sujetos asmáticos alérgicos (n=30).
3. Sujetos alérgicos, no asmáticos (n=14).
4. Sujetos asmáticos, no alérgicos (n=30).

Los sujetos asmáticos (alérgicos y no alérgicos) procedieron del Banco de muestras de asma del CIBERES (CIBER de Enfermedades Respiratorias), compuesto por más de 300 sujetos, de los cuales se dispone de una base de datos clínicos asociados y se estima que aproximadamente un 40% tienen asma alérgico. El banco dispone de PBMC (células mononucleares de sangre periférica), suero y ADN.

Los sujetos controles y los sujetos alérgicos no asmáticos, se han seleccionado expresamente para este Proyecto, siguiendo los protocolos establecidos en el Proyecto

original. Específicamente, todos los sujetos fueron seleccionados y diagnosticados clínicamente por un Alergólogo Especializado (en concreto de Sevilla y Granada), mediante historia clínica y pruebas cutáneas frente a una batería de alérgenos entre los que se incluyó el polen de olivo. A todos los participantes del estudio (pacientes y controles), se les informó y propuso participar en el estudio, tras lo cual, firmaron un Consentimiento Informado, previamente aprobado por el Comité Ético para la Investigación (CEI) del IIS- Fundación Jiménez Díaz. Se extrajeron alícuotas de sangre completa, con anticoagulante y sin él, que fueron enviadas al Departamento de Inmunología del IIS-Fundación Jiménez Díaz, para ser procesadas.

10 Criterios de selección:

- Pacientes asmáticos no alérgicos con diagnóstico grave, moderado o leve según los criterios de la Guía Española del Manejo del Asma (GEMA), y sin ningún síntoma alérgico.
- Pacientes asmáticos alérgicos con diagnóstico grave, moderado o leve según los criterios de la GEMA.
- Pacientes alérgicos no asmáticos con alergia a alérgenos aéreos.
- No haber recibido tratamiento antes o durante la recogida de las muestras
- Máxima disponibilidad de muestras de suero y PBMC.

20 Criterio de exclusión: Estar en tratamiento en el momento de recogida de las muestras.

La Tabla 34 resume las características de la población estudiada. Como puede observarse, la edad media entre los grupos es diferente, siendo los sujetos asmáticos alérgicos significativamente mayores que el resto de grupos. Los sujetos alérgicos no asmáticos fueron los más jóvenes, siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto de los grupos de sujetos controles y pacientes con asma no alérgica. La distribución de fumadores fue similar entre los distintos grupos. Además, en la tabla se refleja la gravedad de los pacientes asmáticos, que en la mitad de los casos tienen un diagnóstico de asma grave, mientras que la otra de asma moderada-leve. En esta tabla también se incluye el valor de IgE total en suero medida por el método de *Immucap*. Esta valoración es importante, ya que un valor alto de IgE total es característico de los pacientes que sufren alergia. En efecto, en nuestra población observamos que la media de los niveles de IgE total está aumentada significativamente en los dos grupos con alergia comparada con el resto de grupos. Además

se incluyen como parámetros pulmonares funcionales, los porcentajes FVC (*percentage of forced vital capacity*) y FVE₁ (*percentage of forced expiratory volume in 1 second*) cuyos valores menores del 80% suponen un indicativo de la enfermedad del asma. Así pues, vemos cómo los valores de estos parámetros son similares entre los dos grupos de asma estudiados, aunque si se analizan considerando la gravedad de la enfermedad hay 5 diferencias significativas dentro del grupo con asma no alérgico entre los pacientes graves y los de diagnóstico moderado y leve (66.33±16.62 vs 85.38±21.03, $p=0.0127$ de %FEV₁; 69.93±19.94 vs 94±19.52, $p=0.0031$ de %FVC, respectivamente).

Tabla 34: Población de estudio

| | N | Edad | Sexo | Tabaquismo | Diagnóstico clínico | IgE Total | %FVC | %FEV ₁ |
|--------------------------------|----|----------------|----------------------------------|---|--|-------------------|---------------|-------------------|
| Sujetos control | 30 | 45.66 ± 12.39 | 67.86% mujeres 32.14% hombres | 92.86% no fumadores 7.14% fumadores 0% ex-fumadores | Sin síntomas asmáticos ni alérgicos | 75.02 ± 128.21 | - | - |
| Sujetos asmáticos no alérgicos | 30 | 58.03 ± 13.14* | 73.33% mujeres 26.67% hombres | 73.33% no fumadores 10% fumadores 16.67% ex-fumadores | 50% asma grave 30% asma moderado 20% asma leve | 82.04 ± 80.63 | 81.11 ± 22.69 | 75.18 ± 22.82 |
| Sujetos asmáticos alérgicos | 30 | 42.37 ± 15.44# | 80% mujeres 20% hombres | 68.97% no fumadores 6.90% fumadores 24.14% ex-fumadores | 50% asma grave 26.7% asma moderado 23.3% asma leve | 371.64 ± 437.69** | 75.53 ± 16.58 | 73.33 ± 16.28 |
| Sujetos alérgicos | 14 | 34 ± 8.86** | 38.46% mujeres | 85.71% no fumadores 14.29% fumadores | Sin síntomas asmáticos | 250.65 ± 249.07** | - | - |

% FVC: percentage of forced vital capacity; % FEV₁:percentage of forced expiratory volume in 1 second. *Comparaciones estadísticamente significativas(p<0.05) entre el grupo control y el grupo de pacientes. #Comparaciones estadísticamente significativas (p<0.05) entre el grupo asma no alérgica y el grupo seleccionado.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

El grupo de sujetos con asma se seleccionaron del biobanco de asma, que dispone de muestras de PBMC (almacenadas en nitrógeno líquido), suero y ADN (almacenadas a -80°C). A partir de las PBMC, se extrajeron el ARN y la proteína total, según protocolo que se detalla a continuación.

Las muestras de los 30 sujetos sanos y 30 sujetos alérgicos no asmáticos se obtuvieron de sangre completa, que se procesaron según el siguiente protocolo.

Se extrajeron 40ml de sangre periférica de cada sujeto de estudio: 10ml sin anticoagulante (para la obtención de suero) y 30ml con heparina (para obtener ADN, plasma y PBMC).

Las muestras se procesaron según el producto final requerido y trabajando siempre en cámaras de flujo laminar:

- **Obtención de suero** (por centrifugación en condiciones estándar): Se almacenaron cinco alícuotas a -80°C de cada sujeto de estudio, para posteriores determinaciones.

- **Extracción de PBMC y plasma:** Para ello se realizó una técnica de fraccionamiento a partir de sangre completa: la centrifugación diferencial en gradiente de Ficol (*Linfoprep*), utilizando el protocolo de la casa comercial (*Comercial Rafer*). Se recogieron cinco alícuotas de plasma por cada sujeto (conservación a -80°C) y aproximadamente diez de PBMC (6×10^6 células/vial) que fueron congeladas en medio de congelación (medio RPMI-1640 + 10% suero de ternera fetal inactivo (STFi) + 10% DMSO) a -80°C y posteriormente conservadas en nitrógeno líquido.

- **Extracción de ARN:** Para el estudio de expresión diferencial, se extrajo ARN de las muestras de PBMC de todos los sujetos del estudio ($n=104$), mediante el método de Trizol (*TriReagent RNA isolation*), a partir de 1×10^6 PBMC, siguiendo las especificaciones de la casa comercial (*Vitro*). La cuantificación y pureza del ARN se realizó midiendo su densidad óptica en un *Nanodrop*. Las muestras se almacenan a -80°C hasta su uso.

- **Extracción de proteína:** Mediante el método de Trizol se obtuvo también la fracción proteica a partir de 1×10^6 PBMC. La proteína se cuantificó por el método de BCA de *Thermo Fisher Scientific*.

ESTUDIO DE EXPRESIÓN GÉNICA

Para decidir los genes de interés en nuestro estudio, establecimos los siguientes criterios:

1. Genes relevantes por expresión diferencial en relación al asma y por estudios de variantes polimórficas (SNPs) en asma, obtenidos en más de un trabajo independiente tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica.
2. Genes previamente definidos por nuestro grupo como significativos mediante análisis de expresión génica (*Aguerri M. et al., J. Biol. Reg. Homeost. Ag. 2013 Vol.27(2): 329-341.*).
3. Genes candidatos de interés en plasticidad celular, inflamación y/o regulación que podrían haber quedado excluidos por criterios anteriores.

10 Basándonos en estos criterios, seleccionamos 94 genes para hacer un diseño de tarjetas microfluídicas.

El estudio preliminar de los datos de expresión por PCA (Principal Component Assay) muestra cómo la expresión de estos 94 genes separa perfectamente a los sujetos por grupos, confirmando la buena selección de los genes estudiados y nos alienta a buscar biomarcadores específicos dependiendo del fenotipo clínico en muestras como es la sangre (Figura 1)

Se estudiaron 94 genes y dos genes endógenos en tarjetas microfluídicas de 384 pocillos (*Applied Biosystem*) para el análisis de expresión génica en los ARN extraídos de los 104 sujetos del estudio, mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

En los análisis de expresión por qRT-PCR, la expresión de un determinado gen se evalúa de un modo relativo, es decir se compara su expresión con la de un gen que se expresa de manera estable o constitutiva (genes endógenos). Para nuestras placas microfluídicas elegimos dos genes endógenos usualmente utilizados con PBMC: 18S y GADPH. Los datos de qRT-PCR fueron analizados con el programa *StatMiner*, con la ayuda de Expertos de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Cantoblanco, Madrid.

30 Para el análisis de expresión se compara el valor de Ct o ciclo umbral obtenido en la qRT-PCR con el Ct del endógeno mediante la expresión:

$$\Delta Ct = Ct \text{ gen analizado} - Ct \text{ gen endógeno.}$$

Un valor mayor de ΔCt implica una menor expresión génica y un ΔCt menor determina mayor expresión del gen. Se analizaron los datos obtenidos de las tarjetas microfluídicas comparando el $\Delta\Delta Ct$ (media del ΔCt de cada grupo $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct_{(experimental)}] - [\Delta Ct_{(control)}]$) entre el grupo control y grupo de cada condición clínica. El nivel de significación de la expresión diferencial se estableció por una cuantificación relativa o RQ (relative quantification) <-2 o >2 y un valor de *p* ajustada menor de 0,05 por el método de *Benjamini-Hochberg FDR*.

Diez genes (*CLCA1*, *IL17A*, *IL25*, *IL33*, *IL5*, *IL9*, *MUC5AC*, *POSTN*, *SERPINB4*, and *TCF21*) resultaron indeterminados en todas las muestras, y 10 genes (*ADAM33*, *CCL17*, *IL13*, *MUC5B*, *MUC2*, *NOS2*, *TSLP*, *CCL11*, *DRB1*, and *IL4*) no se pudieron estudiar porque se detectaron solo en algunas condiciones o los datos fueron inconsistentes.

Para definir perfiles de genes específicos relacionados con las diferentes condiciones clínicas, se comparó la expresión génica de los 3 grupos clínicos respecto al grupo de sujetos controles sanos. Tras el análisis detallado de los resultados de la qRT-PCR se obtuvieron los resultados resumidos en la Tabla 35. Del total de los genes diferencialmente expresados en las condiciones clínicas comparadas con el grupo control sano, 22 genes fueron comunes en los tres grupos clínicos, 42 fueron comunes en los dos grupos de sujetos alérgicos y uno, *MSR1*, fue común en los 2 grupos de sujetos con asma (alérgica y no alérgica). Por otro lado, un gen, *SERPINB2* fue sólo significativamente sobreexpresado en el grupo de sujetos con asma no alérgica. Por el contrario, *ADRB1*, *ALOX15*, *CTSG* y *CX3CR1* fueron significativamente reprimidos sólo en el grupo de sujetos alérgicos con asma. Ninguno de los genes analizados fue exclusivamente modulado de una forma diferencial en el grupo de sujetos alérgicos sin asma.

Tabla 35: Resultados de la expresión génica diferencial entre los tres grupos de pacientes con respecto al grupo control.

| | Genes con expresión diferencial significativa | Genes con expresión mayor | Genes con expresión menor |
|----------------------------------|--|----------------------------------|----------------------------------|
| Grupo asma no alérgico | 26 | 16 | 10 |
| Grupo asma alérgico | 69 | 1 | 68 |
| Grupo alergia no asmática | 66 | 0 | 66 |

5 Con el propósito de encontrar genes específicamente relacionados con asma y/o alergia, analizamos las diferencias estadísticas en la expresión génica entre las tres condiciones clínicas estudiadas. La comparación entre sujetos asmáticos no alérgicos vs sujetos asmáticos alérgicos mostro que 74 genes estuvieron sobreexpresados en el grupo de asma no alérgica, siendo los 5 genes con mayores diferencias estadísticas *CCL5*, *CHI3L1*, *CTSG*,
 10 *GZMH* e *IL1-R2*. Se establecieron como genes más significativos los que tenían un cambio de expresión o RQ mayor que 10. Comparando los grupos con asma no alérgica vs sujetos con alergia sin asma encontramos 66 genes diferencialmente expresados, 64 sobreexpresados en el grupo de asma y solo 2 genes disminuidos *CHI3L1* y *PI3*.
 15 Seleccionando los genes con un criterio más estricto ($RQ > 10$), 10 genes fueron diferencialmente sobreexpresados en los sujetos con asma: *CCL5*, *CRTAP*, *GPX3*, *HLA-DQB1*, *IL-10*, *IL2RB*, *MSR1*, *NLRP3*, *PHLDA1* y *SERPINB2*. *PI3* fue el único gen reprimido con este criterio. Finalmente, la comparación entre los grupos de sujetos alérgicos con asma vs alérgicos sin asma, mostro que 14 genes estaban diferencialmente expresados, 4 genes sobre-expresados (*IL-10*, *MSR1*, *PHLDA1* y *SERPINB2*) y 10 genes reprimidos (*ALOX15*,
 20 *CHI3L1*, *CPA3*, *CTSG*, *IL1R2*, *IL8*, *NKKB1Z*, *PI3*, *SVIL* y *TNF*) en los sujetos alérgicos con asma. La selección con un criterio más estricto ($RQ > 10$), mostró que 4 genes estaban extremadamente disminuidos en los sujetos con asma alérgica: *CHI3L1*, *CPA3*, *CTSG* y *PI3*.

Con el fin de seleccionar los genes más diferenciales en el estudio de comparación de los
 25 grupos de pacientes enfermos y el control, establecimos como criterio un RQ mayor que 4 o menor que 0.25. Así redujimos los genes a 9 en el grupo con asma no alérgico, 33 en el grupo con asma alérgico y 37 en el grupo con alergia no asmática (Tabla 35). Al tener una

5 población de pacientes asmáticos con un 50% con diagnóstico de asma grave y el otro 50% de asma moderada y leve, se realizó una comparación de la expresión de los genes que destacamos como más significativos para averiguar si podría haber algún marcador de gravedad. Esto se refleja en la Tabla 36A y 36B en la que se observa que en la mayoría de los genes el peso de la expresión cae en el grupo de sujetos con asma grave. Por ejemplo en la Tabla 37A, *MSR1* tiene una expresión 4 veces mayor en los pacientes asmáticos no alérgicos de diagnóstico grave, o *PHLDA1* en el que la expresión se duplica. En cambio, en el caso de *CPA3* es en la patología moderada-leve en la que se da mayor cambio en la expresión diferencial. La comparación de gravedad de la enfermedad no se evidencia tanto en la expresión de estos genes en el grupo de asma alérgico (Tabla 36B), pero vemos como al menos *CHI3L1*, *CPA3*, *IL8* y *PI3* se comparten con el grupo con asma no alérgico (Tabla 36A).

15 **Tabla 36: Listado de los genes con expresión diferencial significativa (p aj.<0.05) por grupo de pacientes con respecto al grupo control según el criterio de RQ >4 o <0.25.**

| A) | | Asma no alérgico vs Control | | Asma grave vs Control | | Asma moderado-leve vs Control | |
|-----------------|------------|-----------------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| Gen | Expresión | RQ | <i>P</i> ajustada | RQ | <i>P</i> ajustada | RQ | <i>P</i> ajustada |
| <i>CD86</i> | Aumentada | 3,197 | 6.80E-05 | 4.853 | 4.12E-06 | 2.106 | 3.10E-02 |
| <i>IL10</i> | Aumentada | 6.142 | 1.62E-06 | 7.865 | 1.07E-06 | 4.796 | 1.74E-03 |
| <i>MSR1</i> | Aumentada | 12.891 | 1.44E-06 | 25.719 | 4.66E-07 | 6.461 | 3.41E-03 |
| <i>PHLDA1</i> | Aumentada | 6.899 | 1.86E-06 | 10.531 | 1.38E-07 | 4.520 | 1.72E-03 |
| <i>SERPINB2</i> | Aumentada | 8.948 | 7.61E-05 | 10.929 | 5.53E-04 | 7.326 | 3.46E-03 |
| <i>CHI3L1</i> | Disminuida | 0.027 | 3.20E-14 | 0.021 | 9.73E-12 | 0.034 | 2.39E-10 |
| <i>CPA3</i> | Disminuida | 0.222 | 1.07E-03 | 0.304 | 2.72E-02 | 0.162 | 2.61E-03 |
| <i>IL8</i> | Disminuida | 0.128 | 3.22E-08 | 0.151 | 7.90E-05 | 0.108 | 1.37E-06 |
| <i>PI3</i> | Disminuida | 0.006 | 4.61E-16 | 0.005 | 4.79E-12 | 0.007 | 9.47E-12 |

| B) | | Asma alérgico vs | | Asma grave vs | | Asma moderado-leve vs | |
|----------------------|-------------------|------------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------------|-----------------|
| | | Control | | Control | | Control | |
| Gen | Expresión | RQ | pajustada | RQ | pajustada | RQ | pajustada |
| <i>ALOX15</i> | Disminuida | 0.050 | 4.00E-09 | 0.040 | 4.57E-07 | 0.064 | 1.49E-05 |
| <i>ALOX5</i> | Disminuida | 0.235 | 6.14E-08 | 0.226 | 1.81E-05 | 0.244 | 7.63E-06 |
| <i>APAF1</i> | Disminuida | 0.141 | 6.31E-13 | 0.150 | 9.65E-09 | 0.132 | 2.22E-09 |
| <i>C3AR1</i> | Disminuida | 0.162 | 8.65E-09 | 0.149 | 4.31E-06 | 0.175 | 7.03E-08 |
| <i>CCL5</i> | Disminuida | 0.141 | 3.18E-12 | 0.139 | 1.62E-08 | 0.144 | 5.51E-11 |
| <i>CHI3L1</i> | Disminuida | 0,003 | 6,18E-22 | 0,003 | 3,39E-17 | 0,002 | 1,01E-17 |
| <i>CPA3</i> | Disminuida | 0,028 | 8,47E-13 | 0,033 | 4,28E-09 | 0,023 | 8,20E-10 |
| <i>CRTAP</i> | Disminuida | 0,193 | 1,16E-13 | 0,208 | 3,48E-09 | 0,180 | 8,00E-12 |
| <i>CTSG</i> | Disminuida | 0,043 | 1,53E-10 | 0,040 | 4,88E-08 | 0,046 | 8,30E-08 |
| <i>DUSP1</i> | Disminuida | 0,127 | 9,91E-16 | 0,126 | 1,22E-10 | 0,127 | 1,79E-10 |
| <i>GADD45B</i> | Disminuida | 0,116 | 9,55E-17 | 0,118 | 3,71E-11 | 0,113 | 1,15E-11 |
| <i>GZMH</i> | Disminuida | 0,151 | 1,46E-12 | 0,131 | 4,87E-09 | 0,174 | 2,04E-09 |
| <i>IFNG</i> | Disminuida | 0,089 | 1,37E-12 | 0,086 | 1,43E-10 | 0,093 | 6,06E-09 |
| <i>IL1R2</i> | Disminuida | 0,021 | 6,23E-18 | 0,030 | 4,28E-13 | 0,015 | 3,36E-14 |
| <i>IL4R</i> | Disminuida | 0,189 | 2,41E-13 | 0,189 | 1,34E-08 | 0,189 | 1,05E-10 |
| <i>IL8</i> | Disminuida | 0,026 | 3,38E-19 | 0,031 | 5,72E-12 | 0,022 | 1,33E-14 |
| <i>LYN</i> | Disminuida | 0,126 | 2,04E-18 | 0,135 | 4,51E-12 | 0,117 | 5,67E-13 |
| <i>NCF2</i> | Disminuida | 0,132 | 2,20E-11 | 0,135 | 2,45E-07 | 0,129 | 6,12E-10 |
| <i>NFKBIZ</i> | Disminuida | 0,106 | 6,98E-19 | 0,100 | 1,74E-13 | 0,112 | 4,05E-12 |
| <i>PI3</i> | Disminuida | 0,001 | 2,71E-24 | 0,001 | 7,17E-19 | 0,001 | 1,01E-17 |
| <i>PRKACA</i> | Disminuida | 0,202 | 4,23E-13 | 0,217 | 1,10E-08 | 0,188 | 2,49E-10 |
| <i>PTPRC</i> | Disminuida | 0,136 | 1,06E-09 | 0,104 | 2,37E-07 | 0,179 | 3,16E-07 |
| <i>S100A9</i> | Disminuida | 0,087 | 1,52E-15 | 0,085 | 1,22E-10 | 0,090 | 1,38E-11 |
| <i>SELL</i> | Disminuida | 0,110 | 3,24E-15 | 0,088 | 5,26E-11 | 0,137 | 8,72E-11 |
| <i>SOS1</i> | Disminuida | 0,166 | 9,76E-10 | 0,198 | 8,84E-06 | 0,139 | 1,67E-07 |
| <i>SPN</i> | Disminuida | 0,191 | 1,30E-13 | 0,170 | 1,09E-09 | 0,214 | 5,77E-10 |
| <i>STAT1</i> | Disminuida | 0,147 | 7,39E-16 | 0,154 | 1,43E-10 | 0,141 | 5,51E-11 |
| <i>SVIL</i> | Disminuida | 0,079 | 7,83E-19 | 0,089 | 4,43E-13 | 0,069 | 8,21E-13 |
| <i>TAGAP</i> | Disminuida | 0,092 | 3,38E-19 | 0,110 | 4,62E-12 | 0,077 | 1,18E-14 |
| <i>TGFB1</i> | Disminuida | 0,181 | 4,71E-20 | 0,199 | 4,28E-13 | 0,164 | 1,18E-14 |
| <i>TLR4</i> | Disminuida | 0,087 | 1,16E-13 | 0,113 | 2,30E-08 | 0,068 | 1,38E-11 |
| <i>TNF</i> | Disminuida | 0,067 | 3,47E-21 | 0,069 | 1,52E-15 | 0,065 | 3,97E-14 |
| <i>TNFAIP3</i> | Disminuida | 0,100 | 2,80E-19 | 0,103 | 1,39E-13 | 0,098 | 5,96E-13 |

| C) | | Alergia no asmática vs Control | | Alergia no asmática vs Control | | | |
|----------------------|-------------------|--------------------------------|-----------------|--------------------------------|-------------------|--------------|-----------------|
| Gen | Expresión | RQ | p ajustada | Gen | Expresión | RQ | p ajustada |
| <i>C3AR1</i> | Disminuida | 0,185 | 6,45E-07 | <i>NLRP3</i> | Disminuida | 0,235 | 2,96E-08 |
| <i>CCL5</i> | Disminuida | 0,135 | 2,80E-10 | <i>PHLDA1</i> | Disminuida | 0,234 | 8,75E-07 |
| <i>CD48</i> | Disminuida | 0,222 | 2,10E-09 | <i>PI3</i> | Disminuida | 0,101 | 2,05E-06 |
| <i>CHI3L1</i> | Disminuida | 0,141 | 4,27E-07 | <i>PRKACA</i> | Disminuida | 0,209 | 3,34E-09 |
| <i>CRTAP</i> | Disminuida | 0,125 | 2,92E-14 | <i>PTPRC</i> | Disminuida | 0,148 | 2,61E-06 |
| <i>DUSP1</i> | Disminuida | 0,207 | 2,05E-06 | <i>S100A9</i> | Disminuida | 0,153 | 8,89E-07 |
| <i>GADD45B</i> | Disminuida | 0,176 | 2,58E-07 | <i>SCD</i> | Disminuida | 0,217 | 1,05E-05 |
| <i>GPX3</i> | Disminuida | 0,205 | 1,29E-04 | <i>SELL</i> | Disminuida | 0,149 | 4,26E-08 |
| <i>GZMH</i> | Disminuida | 0,178 | 9,22E-08 | <i>SPN</i> | Disminuida | 0,206 | 7,63E-09 |
| <i>IFNG</i> | Disminuida | 0,171 | 2,38E-07 | <i>SPP1</i> | Disminuida | 0,228 | 1,39E-03 |
| <i>IL10</i> | Disminuida | 0,152 | 5,07E-06 | <i>SVIL</i> | Disminuida | 0,157 | 3,38E-07 |
| <i>IL1R1</i> | Disminuida | 0,218 | 5,07E-06 | <i>TAGAP</i> | Disminuida | 0,158 | 7,52E-10 |
| <i>IL1R2</i> | Disminuida | 0,128 | 8,37E-08 | <i>TGFB1</i> | Disminuida | 0,203 | 3,53E-13 |
| <i>IL2RB</i> | Disminuida | 0,217 | 3,80E-08 | <i>TLR4</i> | Disminuida | 0,091 | 7,37E-09 |
| <i>IL4R</i> | Disminuida | 0,224 | 3,34E-09 | <i>TNF</i> | Disminuida | 0,135 | 3,58E-10 |
| <i>IL8</i> | Disminuida | 0,176 | 7,81E-05 | <i>TNFAIP3</i> | Disminuida | 0,172 | 7,52E-10 |
| <i>IRAK3</i> | Disminuida | 0,246 | 2,27E-07 | <i>TRIM37</i> | Disminuida | 0,229 | 4,80E-09 |
| <i>LYN</i> | Disminuida | 0,215 | 1,40E-08 | <i>VCAN</i> | Disminuida | 0,207 | 3,34E-09 |
| <i>NFATC1</i> | Disminuida | 0,248 | 4,18E-08 | | | | |

5 A) Genes con expresión diferencial del grupo con asma no alérgico. B) Genes con expresión diferencial del grupo con asma alérgico. C) Genes con expresión diferencial del grupo con alergia no asmática. En los dos grupos con asma se añade la comparación de asma grave y asma moderada-leve. En negrita se resaltan en las Tablas 37B y 37C los genes comunes con el grupo con asma no alérgica.

10 En resumen, las comparaciones respecto a los sujetos controles de los grupos clínicos definieron un grupo de genes asociados a la gravedad. Específicamente, en el grupo de asma grave no alérgico, y utilizando criterios más estrictos de expresión génica, nos permitieron definir 9 genes. El análisis del grupo de asma alérgica mostró un grupo mayor

de genes diferenciales, incluso con criterios más estrictos, siendo 33 (todos reprimidos) los genes asociados con la gravedad.

Ejemplo 1. ESTUDIO DE EXPRESIÓN PROTEICA

5 Ante los resultados de expresión génica, decidimos estudiar a nivel proteico la expresión de los genes más relevantes, *MSR1* (que codifica al receptor *basura* de macrófagos de clase A), *SERPINB2* (cuya transcripción da lugar a un miembro de la familia de inhibidores de la serín-proteasa) y *PHLDA1* (que da lugar a una proteína nuclear rica en prolina e histidina) por la técnica de *western blot* y, los genes que dan lugar a proteínas solubles *IL8*, *IL10*,
 10 *CHI3L1* o *quitinasa3* (una glicoproteína miembro de la familia 18 de la glicosil-hidrolasa) y *PI3* (que codifica al inhibidor de peptidasa 3) mediante ELISA, ya que se secretan y se encuentran en el suero fácilmente. También cuantificamos POSTN o Periostina, una proteína de matriz extracelular inducida por las IL-4 e IL-13 en el epitelio de la vía aérea y fibroblastos y que tiene un papel en la fibrosis subepitelial y acelera la infiltración tisular de
 15 eosinófilos. Aunque fue uno de los genes que no pudimos valorar, ya que su expresión génica fue no valorable en nuestras muestras, la periostina sérica se ha propuesto como un biomarcador de asma Th2, motivo por el que decidimos medir su expresión proteica (por ELISA).

20 1. Expresión de MSR1, SERPINB2 y PHLDA1

El análisis de la expresión de estas tres proteínas se realizó por la técnica de *western blot*. Esta técnica separa una mezcla de proteínas en base a su peso molecular mediante un gel de acrilamida. Las proteínas separadas en el gel se transfieren a una membrana, dando lugar a un patrón de bandas proteicas. La membrana se incuba con anticuerpos marcados
 25 con una enzima y específicos de la proteína de interés. Los anticuerpos que se unen se detectan por exposición a luz ultravioleta, ya que la enzima unida al anticuerpo reacciona con un sustrato que le suministramos. El sistema de revelado utilizado en nuestros ensayos fue el de ECL. El grosor de la banda da una idea de la cantidad de proteína, por lo que se puede estandarizar para obtener la cantidad de proteína que hay en la muestra.

30 El extracto proteico obtenido de las PBMC de los sujetos de estudio se cuantificó mediante la técnica de BCA y realizamos la electroforesis en PAGE-SDS. Se prepararon geles al 12%

en cassettes *Novex (Life Technologies)* formados por una parte inferior separadora (tampón del gel separador 1M Tris-HCl pH 8,8, 50% acrilamida/bisacrilamida (29:1), 10% SDS, 10% APS y TEMED) y otra superior concentradora (tampón del gel concentrador 0,375M Tris-HCl pH 6,8, 50% acrilamida/bisacrilamida (29:1), 10% SDS, 10% APS y TEMED). El tampón de electroforesis también se realizó en el laboratorio con el siguiente protocolo: 25mM de Trizma base, 0,2M de glicina y SDS al 0,1%. La fracción proteica se carga en distintos pocillos (la cantidad depende del anticuerpo primario que se utilice), siendo anteriormente desnaturalizada a 70°C durante 10 minutos. La electroforesis se realizó a 125V durante 1 hora y media. Se utilizó el sistema *Blot Dry Blotting* de *Invitrogen (ThermoFisherScientific)* para la transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa. Para el bloqueo y lavado de la membrana, y la detección de las bandas se usó el kit *Western Breeze Chemiluminescent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific)*. Tras el bloqueo de la membrana (aproximadamente 1 hora) se incubó con el anticuerpo primario a 4°C toda la noche con distintas diluciones según el que se estudie y después de una serie de lavados, se incubó con el anticuerpo secundario (a temperatura ambiente durante 30 minutos). Tras el revelado en el *Amersham Imager 6000 (GE Healthcare Life Sciences)* se obtuvieron las bandas correspondientes a cada proteína. Tras la puesta a punto de estos anticuerpos, cada uno tuvo su dilución óptima y cantidad de proteína de carga adecuada.

Para el estudio de MSR1, estudiamos la expresión proteica diferencial entre el grupo con asma grave no alérgica y el grupo control, ya que es en éstos donde se observa un mayor cambio de expresión y una asociación mayor con la gravedad a nivel de expresión génica.

Para MSR1 se utilizó el anticuerpo IgG policlonal de conejo, específico de CD204 (o MSR1) humano (*Thermo Fisher Scientific*) a una dilución de 1:2500 y cargando 40µg de muestra. Su peso molecular (PM) es de 75kDa. Se observaron dos bandas principales en su perfil, una entre los pesos moleculares 113 y 72,7 (banda superior) y otra entre el marcador 72,7 y el 46,7 (banda inferior). Al analizar la cuantificación relativa de las bandas de 9 sujetos control y 18 pacientes asmáticos graves no alérgicos, vimos diferencias significativas sólo en la banda inferior que tenía mayor expresión en los sujetos sanos que en los asmáticos (Figura 2)

El gen de *MSR1* es uno de los que encontramos más diferenciales en la enfermedad asmática y además mostramos su importancia en la gravedad del asma no alérgico. La expresión de la proteína MSR1 en PBMC se manifiesta con un perfil proteico diferente en sujetos sanos y pacientes asmáticos no alérgicos. Estos datos confirman la expresión

proteica de MSR1 en PBMC y apunta a diferencias interesantes entre sujetos sanos y asmáticos.

El anticuerpo IgG policlonal de conejo específico de SERPINB2 humano (*R&D Systems*) se diluyó 1:1000 y en el gel se cargó 10µg de muestra. Su peso molecular es de 49kDa. La Figura 3 representa los resultados de *western blot* de SERPINB2. Se estudiaron 6 sujetos control, 11 sujetos asmáticos no alérgicos (6 con asma grave y 5 con asma moderada-leve), 11 sujetos asmáticos alérgicos (6 con asma grave y 5 con asma moderada-leve) y 5 sujetos con alergia no asmática. La cuantificación relativa de la banda de alrededor de 43kDa muestra diferencias significativas entre los distintos grupos. El grupo control (0.66 ± 0.31) y el grupo con alergia no asmática (0.41 ± 0.33) se diferencia estadísticamente de los dos grupos con asma (0.11 ± 0.05 sin alergia, y 0.08 ± 0.04 con alergia), con una $p < 0.0001$ y $p < 0.05$, respectivamente.

El anticuerpo IgG policlonal de conejo específico de PHLDA1 humano (*Invitrogen, Thermo Fisher Scientific*) fue diluido 1:500 y se cargaron 10µg de muestra (la altura de la banda debería de ser 48kDa). La Figura 4 muestra los resultados de *western blot* de PHLDA1 de 8 sujetos control, 5 sujetos asmáticos no alérgicos (3 con asma grave y 2 con asma moderada-leve), 6 sujetos asmáticos alérgicos (3 con asma grave y 3 con asma moderada-leve) y 7 sujetos con alergia no asmática. Aunque el grupo Asmático no alérgico muestra la mayor expresión media de esta proteína, la cuantificación relativa de la banda de alrededor de 43kDa no muestra diferencias significativas entre los distintos grupos.

2. Expresión proteica de IL8, IL10, CHI3L1, PI3 y POSTN

El estudio y cuantificación de estas proteínas solubles se realizó con la técnica ELISA. El método de detección por ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) es una técnica de inmunoensayo en la cual un anticuerpo primario inmovilizado en una placa detecta el antígeno, que es reconocido por un anticuerpo secundario biotinilado, que a su vez, se le une un anticuerpo con una enzima enlazada, que es capaz de generar un producto detectable por cambio de color al reaccionar con el sustrato cromógeno adecuado. La intensidad del color permite medir indirectamente el antígeno en la muestra mediante espectrofotometría. Con esta técnica medimos la cantidad de IL8, IL10, CHI3L1, PI3 y POSTN en el suero de nuestros pacientes utilizando los kits: *human IL8 ELISA kit* (rango de detección: 62,50-2000pg/ml) de *Diaclone*, *human Chitinase 3-like1 DuoSet ELISA* (rango de

detección: 31,20-2000pg/ml), *human Trappin-2/Elafin*(PI3) *DuoSet ELISA* (rango de detección: 31,20-2000pg/ml) y *human Periostin/OSF-2 Duoset ELISA* (rango de detección: 62,50-4000pg/ml) de *R&D systems*, y *human Interleukin-10 ELISA* (rango de detección: 16-1000pg/ml) de *ImmunoTools*, cuyo color se mide a 450nm. Los resultados medios por grupo y las comparaciones estadísticas están resumidos en la Figura 5.

Los datos indicaron diferencias significativas entre los niveles de IL8 del grupo de sujetos control y asmáticos alérgicos, comparado con el de pacientes alérgicos no asmáticos (283.69 ± 167.69pg/ml, 207.02 ± 328.90pg/ml, 912.84 ± 608.74pg/ml, respectivamente) (Figura 5A). Hubo un 68.97% de sujetos controles con valores negativos, 53.33% en pacientes asmáticos no alérgicos, 56.67% en pacientes asmáticos alérgicos y 46.15% en pacientes alérgicos no asmáticos. Al realizar el análisis más detallado de pacientes con diagnóstico grave y con diagnóstico moderado-leve dentro del grupo de asmáticos no alérgicos y asmáticos alérgicos, éste no mostró diferencias significativas entre las concentraciones de IL8 de cada grupo asmático (505.49 ± 387.80pg/ml sujetos asmáticos graves y 377.79 ± 338.27pg/ml pacientes asmáticos moderados-leves; 342.91± 406.96pg/ml sujetos asmáticos alérgicos graves y 48.47 ± 69.77pg/ml pacientes asmáticos alérgicos moderados-leves). Destacamos que hay una tendencia a que los pacientes asmáticos más graves de las dos condiciones patológicas tengan niveles más altos. En la expresión génica obtuvimos lo contrario. Esto posiblemente sea debido a que en sangre (suero) se libere IL8 producido por otros tipos celulares distintos a las PBMC.

Las concentraciones de CHI3L1 en suero también presentaron diferencias significativas entre el grupo control y el asma alérgica (15729.18 ± 8576.85pg/ml y 22812.55 ± 3573.46pg/ml, respectivamente) (Figura 5C). Ninguno de los grupos presentó valores negativos. Analizando los pacientes en función de la gravedad dentro de los grupos con asma, no se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de CHI3L1 de cada grupo asmático (17026.99 ± 4845.20pg/ml sujetos asmáticos graves y 21702.56 ± 11589.97pg/ml pacientes asmáticos moderados-leves; 22708.69 ± 4301.77pg/ml sujetos asmáticos alérgicos graves y 22916.40 ± 2814.77pg/ml pacientes asmáticos alérgicos moderados-leves).

Los niveles medios en suero de IL10 y PI3 no mostraron diferencias significativas entre ninguno de los grupos (Figura 5B y 5D). Sin embargo, el análisis de IL10 en función de la gravedad en los grupos de pacientes asmáticos, demostró que aunque no había una

diferencia estadísticamente significativa, los sujetos con asma grave en ambos casos, mostraron niveles incrementados de IL10 (200 ± 219 vs 105.27 ± 79 pg/ml en asmáticos no alérgicos graves vs moderados-leves; 211.40 ± 193 vs 168 ± 136 pg/ml en asmáticos alérgicos graves vs moderados-leves). Los resultados de expresión génica concuerdan con la tendencia del grupo asma no alérgico.

Los niveles medios de POSTN(o Periostina) sí que mostraron diferencias entre los distintos grupos (Figura 5E). El grupo de pacientes con alergia no asmática (11190.29 ± 2310.13 pg/ml) fue el único que mostró diferencias significativas con el grupo control (15487.71 ± 6532.85 pg/ml). También se observaron diferencias significativas con los dos grupos con asma (18679.59 ± 8086.07 pg/ml asma no alérgica, 15199.93 ± 4263.88 pg/ml asma alérgica), siendo el grupo de riniticos el que tuvo menos niveles de POSTN. Al comparar los grupos con asma, el asma sin alergia tenía mayores niveles de esta proteína que el asma con alergia, mostrando diferencias significativas. Al estudiar estos grupos según la gravedad del asma, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo con asma no alérgico grave (15487.71 ± 6532.85 pg/ml y 20198.91 ± 7859.24 pg/ml, respectivamente). Además, se observó, de forma significativa, que el asma no alérgica grave tenía mayores niveles de POSTN que el asma alérgica grave (15305.71 ± 4607.65 pg/ml).

20 **Ejemplo 2. ANÁLISIS BIOMARCADORES POR CURVAS ROC**

Para recalcar la buena selección de genes que hemos definido como posibles biomarcadores y para valorar la especificidad y sensibilidad de estos, realizamos curvas ROC de la expresión génica en los grupos con asma. Obtuvimos un gran número de genes con una significación moderada o alta, con un área bajo la curva (AUC) mayor de 0.80. Para interpretar las curvas ROC, se establecen los siguientes intervalos para los valores de AUC: 0.50-0.60 test malo, 0.61-0.75 test regular, 0.76-0.90 test bueno, 0.91-0.96 test muy bueno, y 0.97-1 test excelente. Este análisis se ha realizado en la expresión génica y proteica de los marcadores más diferenciales en los 3 grupos clínicos de estudio. Se estudiaron los marcadores de forma individual y combinada entre sí.

Las Tabla 37 (A, B y C) resume los datos obtenidos del análisis de curvas ROC de los dos grupos con asma estudiando los marcadores a nivel génico y proteico de forma individual.

La mayoría de los análisis caen dentro de la categoría de buena o muy buena. A nivel proteico, IL10 en el grupo total de asma sin alergia y el grupo moderado-leve no entran dentro de ninguna categoría según nuestros criterios. MSR1 no se valoró a nivel proteico en el grupo asmático no alérgico moderado-leve. PHLDA1 a nivel proteico no se pudieron clasificar en ningún criterio ya que no había suficientes datos en el asma sin alergia. En el grupo total de asma con alergia y en concreto el grupo moderado-leve, la expresión proteica de PI3 e IL10 tampoco entraron dentro de ninguna categoría según nuestros criterios. MSR1 no se valoró a nivel proteico en el grupo asmático alérgico. PHLDA1 a nivel proteico no se pudieron clasificar en los grupos asma sin alergia moderada-leve ni grave. La periostina sólo se pudo clasificar con el grupo total y el moderado-leve de asma con alergia. En el grupo con solo alergia, a nivel proteico MSR1 no se estudió y el resultado del análisis de PHLDA1 no entra en ninguna categoría de asma.

En la tabla 38, se resume los resultados de la combinación del análisis por curvas ROC de los biomarcadores según su expresión génica y proteica, respectivamente

Las tabla 39 resume los resultados de la combinación de tres marcadores del análisis por curvas ROC según su expresión génica y proteica.

Tabla 37: Clasificación por el análisis de curvas ROC de los biomarcadores según su expresión génica y proteica individual.

A) Grupo asmático no alérgico (ANA).

| Test Excelente | Test muy bueno | Test bueno | Test regular | Test malo |
|--|---|--|---|---|
| <p>CH13L1 C vs G, AUC: 1 PI3 C vs Total, AUC: 0.99 PI3 C vs ML, AUC: 1 PI3C vs G, AUC: 0.99</p> <p>NVEL GÉNICO</p> | <p>CH13L1 C vs Total, AUC: 0.95 CD86 C vs ML, AUC: 0.91 IL8 C vs G, AUC: 0.91 IL10 C vs ML, AUC: 0.94 MSR1 C vs ML, AUC: 0.94</p> | <p>CD86 C vs Total, AUC: 0.81 CH13L1 C vs ML, AUC: 0.89 CPA3 C vs Total, AUC: 0.88 CPA3 C vs ML, AUC: 0.88 CPA3 C vs G, AUC: 0.89 IL8 C vs Total, AUC: 0.90 IL8 C vs ML, AUC: 0.89 IL10 C vs Total, AUC: 0.87 IL10 C vs G, AUC: 0.79 SERPINB2 C vs ML, AUC: 0.89 IL8 MLvs G, AUC: 0.76</p> | <p>CD86 C vs G, AUC: 0.71</p> | <p>CH13L1 C vs Total, AUC: 0.60 CH13L1 C vs ML, AUC: 0.56 IL8 C vs Total, AUC: 0.50 IL10 C vs G, AUC: 0.56 PI3 CvsTotal, AUC: 0.50 PI3 C vs ML, AUC: 0.51 PI3 C vs G, AUC: 0.52 PI3 MLvs G, AUC: 0.55 POSTN C vs G, AUC: 0.55 MSR1 sup C vs Total, AUC: 0.60 MSR1 sup C vs ML, AUC: 0.60 MSR1 sup C vs G, AUC: 0.60 MSR1 inf MLvsG, AUC: 0.55</p> |
| <p>MSR1 inf C vs ML, AUC: 1</p> <p>NVEL PROTEICO</p> | <p>MSR1 inf C vs Total, AUC: 0.96 MSR1 inf C vs G, AUC: 0.93 SERPINB2 C vs Total, AUC: 0.91 SERPINB2 C vs G, AUC: 0.93</p> | <p>MSR1 C vs G, AUC: 0.63 CH13L1 MLvs G, AUC: 0.62 IL8 C vs ML, AUC: 0.62 IL8 C vs G, AUC: 0.62 POSTN C vs Total, AUC: 0.62 POSTN C vs ML, AUC: 0.69 POSTN ML vs G, AUC: 0.65 SERPINB2 MLvsG, AUC: 0.70</p> | <p>CH13L1 C vs G, AUC: 0.63 CH13L1 MLvs G, AUC: 0.62 IL8 C vs ML, AUC: 0.62 IL8 C vs G, AUC: 0.62 POSTN C vs Total, AUC: 0.62 POSTN C vs ML, AUC: 0.69 POSTN ML vs G, AUC: 0.65 SERPINB2 MLvsG, AUC: 0.70</p> | <p>CH13L1 C vs Total, AUC: 0.60 CH13L1 C vs ML, AUC: 0.56 IL8 C vs Total, AUC: 0.50 IL10 C vs G, AUC: 0.56 PI3 CvsTotal, AUC: 0.50 PI3 C vs ML, AUC: 0.51 PI3 C vs G, AUC: 0.52 PI3 MLvs G, AUC: 0.55 POSTN C vs G, AUC: 0.55 MSR1 sup C vs Total, AUC: 0.60 MSR1 sup C vs ML, AUC: 0.60 MSR1 sup C vs G, AUC: 0.60 MSR1 inf MLvsG, AUC: 0.55</p> |

5

Resumen del análisis por curvas ROC de los biomarcadores importantes del grupo con asma no alérgica, señalando los marcadores analizados en función del valor de la curva ROC, indicando en cada biomarcador la comparación a la que se refiere. C: Grupo de

sujetos Control. Total: grupo total de sujetos del grupo. ML: grupo de sujetos con asma moderado-leve. G: grupo de sujetos con asma grave.

B) Grupo asmático alérgico (AA).

| | Test Excelente | Test muy bueno | Test bueno | Test regular | Test malo | |
|-------------|---|--|---|--|--|--------------------------|
| NMEL GÉNICO | CH1L1 C vs Total, AUC: 0.99 CPA3 C vs Total, AUC: 0.97 CPA3 C vs G, AUC: 0.98 IL1R2 C vs Total, AUC: 0.98 IL1R2 C vs G, AUC: 0.99 LYNC vs G, AUC: 0.98 P13C vs Total, AUC: 0.99 P13C vs ML, AUC: 1 P13C vs G, AUC: 0.99 TAGAP C vs G, AUC: 0.99 TMFAC vs G, AUC: 0.97 | CPA3 C vs ML, AUC: 0.99 GADD45B C vs G, AUC: 0.91 IL1R2 C vs ML, AUC: 0.96 IL1R2 C vs Total, AUC: 0.92 IL4R C vs G, AUC: 0.94 IL8 C vs Total, AUC: 0.93 IL8 C vs ML, AUC: 0.91 IL8 C vs G, AUC: 0.94 LYNC vs Total, AUC: 0.95 LYNC vs ML, AUC: 0.91 WCF2C vs G, AUC: 0.94 WFKBIZC vs Total, AUC: 0.93 WFKBIZC vs ML, AUC: 0.90 WFKBIZC vs G, AUC: 0.96 S100A9 C vs G, AUC: 0.92 SELL C vs G, AUC: 0.94 STAT1 C vs G, AUC: 0.95 SVIL C vs Total, AUC: 0.87 SVIL C vs ML, AUC: 0.87 SVIL C vs G, AUC: 0.95 TAGAP C vs Total, AUC: 0.93 TGFB1C vs G, AUC: 0.96 TLR4C vs G, AUC: 0.89 TMFAC vs Total, AUC: 0.95 TMFA C vs ML, AUC: 0.93 TMFAIP3C vs Total, AUC: 0.92 TMFAIP3C vs ML, AUC: 0.91 TMFAIP3C vs G, AUC: 0.92 | ALOX15 C vs Total, AUC: 0.85 ALOX15 C vs ML, AUC: 0.76 ALOX15 C vs G, AUC: 0.87 ALOX5 C vs Total, AUC: 0.79 ALOX5 C vs ML, AUC: 0.78 ALOX5 C vs G, AUC: 0.79 APAF1 C vs Total, AUC: 0.87 APAF1 C vs ML, AUC: 0.86 APAF1 C vs G, AUC: 0.89 CSARI C vs Total, AUC: 0.80 CSARI C vs ML, AUC: 0.80 CSARI C vs G, AUC: 0.81 CCL5 C vs Total, AUC: 0.87 CCL5 C vs ML, AUC: 0.85 CCL5 C vs G, AUC: 0.88 CTSG C vs G, AUC: 0.83 CTSG C vs Total, AUC: 0.89 DUSP1 C vs Total, AUC: 0.87 DUSP1C vs G, AUC: 0.90 GADD45B C vs Total, AUC: 0.89 GADD45B C vs ML, AUC: 0.87 GZMH C vs Total, AUC: 0.83 GZMH C vs ML, AUC: 0.82 GZMH C vs G, AUC: 0.83 | FING C vs Total, AUC: 0.85 FING C vs ML, AUC: 0.84 FING C vs G, AUC: 0.87 IL4R C vs ML, AUC: 0.89 WCF2C vs Total, AUC: 0.86 WCF2C vs ML, AUC: 0.78 PRKACA C vs Total, AUC: 0.79 PRKACA C vs ML, AUC: 0.72 PRKACA C vs G, AUC: 0.87 PTPRC C vs Total, AUC: 0.85 PTPRC C vs ML, AUC: 0.88 PTPRC C vs G, AUC: 0.81 S100A9 C vs Total, AUC: 0.90 S100A9 C vs ML, AUC: 0.89 SELL C vs ML, AUC: 0.90 SOS1 C vs G, AUC: 0.78 SPN C vs Total, AUC: 0.82 SPN C vs ML, AUC: 0.83 SPN C vs G, AUC: 0.80 STAT1 C vs Total, AUC: 0.90 STAT1 C vs ML, AUC: 0.85 SVILC vs ML, AUC: 0.90 TAGAP C vs ML, AUC: 0.87 TGFB1 C vs Total, AUC: 0.90 TGFB1 C vs ML, AUC: 0.83 TLR4 C vs Total, AUC: 0.88 TLR4C vs ML, AUC: 0.80 | CRTAP C vs Total, AUC: 0.66 CRTAP C vs G, AUC: 0.75 CTSG C vs ML, AUC: 0.61 SOS1 C vs Total, AUC: 0.72 SOS1 C vs ML, AUC: 0.67 | CRTAP C vs ML, AUC: 0.57 |
| | NMEL PROTICO | SERPINB2 C vs Total, AUC: 0.97 SERPINB2 C vs ML, AUC: 1 | CH1L1C vs Total, AUC: 0.78 CH1L1C vs ML, AUC: 0.78 CH1L1C vs G, AUC: 0.72 IL8 C vs Total, AUC: 0.76 IL8 MLvsG, AUC: 0.82 SERPINB2 C vs G, AUC: 0.77 SERPINB2 MLvs G, AUC: 0.77 | CH1L1 MLvsG, AUC: 0.50 IL8 C vs ML, AUC: 0.59 IL8 C vs G, AUC: 0.52 PHLDA1 C vs Total, AUC: 0.50 P13 MLvs G, AUC: 0.56 POSTN C vs Total, AUC: 0.51 POSTN C vs ML, AUC: 0.52 POSTN MLvs G, AUC: 0.52 | POSTN C vs G, AUC: 0.62 | |

5

Resumen del análisis por curvas ROC de los biomarcadores importantes del grupo con asma alérgica, señalando los marcadores analizados en función del valor de la curva ROC,

indicando en cada biomarcador la comparación a la que se refiere. C: Grupo de sujetos Control. Total: grupo total de sujetos del grupo. ML: grupo de sujetos con asma moderado-leve. G: grupo de sujetos con asma grave.

5 **C) Grupo alergia no asmática (A).**

| | Test Excelente | Test muy bueno | Test bueno | Test regular | Test malo |
|-----------------------|----------------|----------------|---------------------------|--|-----------|
| NIVEL PROTEICO | | | IL8 C vs Total, AUC: 0.78 | CHI3L1 C vs Total, AUC: 0.63 PI3 C vs Total, AUC: 0.68 POSTN vs Total, AUC: 0.74 SERPINB2 C vs Total, AUC: 0.70 | |

Resumen del análisis por curvas ROC de los biomarcadores importantes del grupo con alergia sin asma, señalando los marcadores analizados en función del valor de la curva ROC, indicando en cada biomarcador la comparación a la que se refiere. C: Grupo de sujetos Control. Total: grupo total de sujetos del grupo.

Tabla 38: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de dos biomarcadores.

A) Grupo asmático no alérgico(ANA) total comparado con el grupo control

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|--------|------|------|------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| CHI3L1 | 0.6 | 0.48 | 0.67 | 0.59 | 0.63 | 0.78 | 0.97 | 0.70 | 0.92 |
| IL10 | | 0.42 | | 0.59 | 0.47 | | | | |
| IL8 | | | 0.5 | 0.61 | 0.74 | | | | |
| PI3 | | 0.59 | | 0.5 | 0.67 | 0.63 | 0.96 | 0.47 | 0.91 |
| POSTN | | | | | 0.62 | 0.73 | 0.96 | 0.82 | 0.95 |
| MSR1 sup | | | | | | 0.60 | 1 | | |
| MSR1 inf | | | | | | | 0.96 | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.42 | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.91 |

15 **Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75, bueno, muy bueno o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 y MSR1sup y mínimamente entre CHI3L1 y MSR1inf, CHI3L1 y SERPINB2; POSTN(Periostina) y PHLDA1; POSTN y SERPINB2.**

B) Grupo asmático no alérgico (ANA) moderado-leve comparado con el grupo control

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|--------|------|------|-------------|-------------|-------------|----------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.56 | 0.41 | 0.63 | 0.56 | 0.70 | 0.83 | | | 0.97 |
| IL10 | | 0.41 | | 0.67 | 0.63 | | | | |
| IL8 | | | 0.62 | 0.76 | 0.87 | | | | |
| PI3 | | | | 0.51 | 0.69 | 0.61 | | | 0.89 |
| POSTN | | | | | 0.69 | 0.81 | | | 0.97 |
| MSR1 sup | | | | | | 0.60 | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | 1 | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.48 | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.89 |

Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75 (bueno, muy bueno o excelente). De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 y MSR1sup; CHI3L1 y SERPINB2; IL8 y PI3; IL8 y POSTN (Periostina) y PHLDA1; POSTN y SERPINB2.

5

C) Grupo asmático no alérgico (ANA) grave comparado con el grupo control.

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|----------|--------|------|------|------|-------|-------------|-------------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.63 | 0.62 | 0.67 | 0.63 | 0.64 | 0.76 | 0.94 | | 0.93 |
| IL10 | | 0.56 | | 0.51 | 0.60 | | | | |
| IL8 | | | 0.62 | 0.46 | 0.57 | | | | |
| PI3 | | | | 0.52 | 0.65 | 0.64 | 0.95 | | 0.93 |
| POSTN | | | | | 0.55 | 0.66 | 0.93 | | 0.97 |
| MSR1 sup | | | | | | 0.60 | 1 | | |
| MSR1 inf | | | | | | | 0.93 | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.48 | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.93 |

Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75 (bueno, muy bueno o excelente). De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 y MSR1sup; mínimamente entre CHI3L1 y MSR1 inf; mínimamente entre PI3 y MSR1 inf; POSTN (Periostina) y SERPINB2.

5

D) Grupo asmático no alérgico (ANA) moderado-leve comparado con el grupo ANA grave

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|----------|--------|------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.62 | 0.43 | 0.76 | 0.56 | 0.77 | 0.68 | 0.65 | | 0.63 |
| IL10 | | 0.47 | | 0.63 | 0.77 | | | | |
| IL8 | | | 0.76 | 0.82 | 0.78 | | | | |
| PI3 | | | | 0.55 | 0.57 | 0.60 | 0.60 | | 0.73 |
| POSTN | | | | | 0.65 | 0.64 | 0.62 | | 0.90 |
| MSR1 sup | | | | | | 0.46 | 0.55 | | |
| MSR1 inf | | | | | | | 0.55 | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.48 | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.70 |

Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75 (bueno, muy bueno o excelente). De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 y POSTN (Periostina); IL10 y POSTN; IL8 y PI3; mínimamente entre IL8 POSTN; SERPINB2 y POSTN.

10

E) Grupo asmático alérgico (AA) total comparado con el grupo control

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|----------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| CHI3L1 | 0.78 | 0.63 | 0.92 | 0.78 | 0.79 | | | 0.75 | 1 |
| IL10 | | 0.37 | | 0.63 | 0.85 | | | | |
| IL8 | | | 0.76 | 0.63 | 0.74 | | | | |
| PI3 | | | | 0.44 | 0.56 | | | 0.58 | 0.97 |
| POSTN | | | | | 0.51 | | | 0.79 | 0.95 |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.50 | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.97 |

Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75 (bueno, muy bueno o excelente). De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; mínimamente entre CHI3L1 y POSTN (Periostina); CHI3L1 y SERPINB2; IL10 y POSTN; POSTN y PHLDA1.

5

F) Grupo asmático alérgico (AA) moderado-leve comparado con el grupo control

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|----------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|----------|
| CHI3L1 | 0.78 | 0.68 | 0.87 | 0.78 | 0.78 | | | | 1 |
| IL10 | | 0.36 | | 0.62 | 0.83 | | | | |
| IL8 | | | 0.59 | 0.63 | 0.54 | | | | |
| PI3 | | | | 0.46 | 0.53 | | | | |
| POSTN | | | | | 0.52 | | | | |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 1 |

Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75 (bueno, muy bueno o excelente). De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; IL10 y POSTN.

10

G) Grupo asmático alérgico (AA) grave comparado con el grupo control

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|----------|--------|------|----------|-------------|-------------|----------|----------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.72 | 0.60 | 1 | 0.80 | 0.80 | | | | |
| IL10 | | 0.45 | | 0.62 | 0.86 | | | | |
| IL8 | | | 0.52 | 0.95 | 0.95 | | | | |
| PI3 | | | | 0.56 | 0.58 | | | | 0.93 |
| POSTN | | | | | 0.62 | | | | 0.97 |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.77 |

Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75 (bueno, muy bueno o excelente). De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; CHI3L1 y PI3; CHI3L1 y POSTN (Periostina); CHI3L1 y SERPINB2; IL10 y POSTN; IL8 y PI3; IL8 y POSTN; PI3 y SERPINB2; POSTN y SERPINB2.

5

H) Grupo asmático alérgico (AA) moderado-leve comparado con el grupo AA grave

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|----------|--------|------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.50 | 0.47 | 0.82 | 0.58 | 0.50 | | | | 0.90 |
| IL10 | | 0.46 | | 0.65 | 0.62 | | | | |
| IL8 | | | 0.82 | 0.78 | 0.84 | | | | |
| PI3 | | | | 0.56 | 0.54 | | | | 0.87 |
| POSTN | | | | | 0.52 | | | | 0.93 |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.77 |

En negrita están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75 (bueno, muy bueno o excelente). De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 y SERPINB2; mínimamente entre IL8 y POSTN (Periostina); PI3 y SERPINB2; POSTN y SERPINB2.

10

I) Grupo alérgico (A) no asmático comparado con el grupo control

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|--------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.63 | | 1 | 0.68 | 0.75 | | | 0.64 | 0.70 |
| IL10 | | | | | | | | | |
| IL8 | | | 0.78 | 0.87 | 0.90 | | | | |
| PI3 | | | | 0.68 | 0.80 | | | 0.73 | 0.83 |
| POSTN | | | | | 0.74 | | | 0.39 | 0.80 |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.48 | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.70 |

En negrita se encuentran los valores $AUC > 0.75$, cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; mínimamente entre CHI3L1 y POSTN (Periostina); IL8 y PI3; IL8 y POSTN; mínimamente entre POSTN y SERPINB2.

5

Tabla 39: Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores.

A) Grupo asmático no alérgico (ANA) comparado con el grupo control.

| Combinación de marcadores | Valor AUC TOTAL | Valor AUC ML | Valor AUC G |
|--------------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 0.59 | 0.67 | 0.64 |
| CHI3L1 + IL10 + POSTN | 0.53 | 0.63 | 0.64 |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 0.67 | 0.79 | 0.79 |
| CHI3L1 + IL8 + POSTN | 0.72 | 0.87 | 0.67 |
| CHI3L1 + PI3 + POSTN | 0.66 | 0.68 | 0.62 |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior | 0.77 | 0.83 | 0.64 |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior | 0.97 | | 0.95 |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 0.70 | | |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 0.92 | | 0.93 |
| CHI3L1 + POSTN + MSR1 superior | 0.83 | 0.88 | 0.76 |
| CHI3L1 + POSTN + MSR1 inferior | 0.97 | | 0.94 |
| CHI3L1 + POSTN + PHLDA1 | 0.78 | | |
| CHI3L1 + POSTN + SERPINB2 | 0.94 | | |
| IL10 + PI3 + POSTN | 0.57 | 0.61 | 0.60 |
| IL8 + PI3 + POSTN | 0.75 | 0.84 | 0.62 |
| PI3 + POSTN + MSR1 superior | 0.77 | 0.81 | 0.77 |
| PI3 + POSTN + MSR1 inferior | 0.97 | | 0.96 |
| PI3 + POSTN + PHLDA1 | 0.78 | | |
| PI3 + POSTN + SERPINB2 | 0.94 | 0.97 | |

5

En negrita se encuentran los valores $AUC > 0.75$, cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia en: 1. Grupo ANA total comparado con controles entre: CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior; mínimamente entre CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior; mínimamente entre CHI3L1 + PI3 + SERPINB2; CHI3L1 + POSTN + MSR1 superior; mínimamente entre CHI3L1 + POSTN + MSR1 inferior; CHI3L1 + POSTN + PHLDA1; CHI3L1 + POSTN + SERPINB2; PI3 + POSTN + MSR1 superior; mínimamente PI3 + POSTN + MSR1 inferior; PI3 + POSTN + PHLDA1; PI3 + POSTN + SERPINB2. 2. En el grupo ANA moderado/leve comparado con controles entre: CHI3L1 + IL8 + PI3;

10

CHI3L1 + IL8 + POSTN; CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior; IL8 + PI3 + POSTN; PI3 + POSTN + MSR1 superior; PI3 + POSTN + SERPINB2. 3. En el grupo ANA grave comparado con controles entre: CHI3L1 + IL8 + PI3; mínimamente entre CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior; PI3 + POSTN + MSR1 superior; PI3 + POSTN + MSR1 inferior. Total: 5 grupo total de sujetos del grupo. ML: grupo de sujetos con asma moderado-leve. G: grupo de sujetos con asma grave.

C) Grupo asmático no alérgico (ANA) moderado-leve comparado con el grupo ANA grave

| Combinación de marcadores | Valor AUC |
|--|------------------|
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 0.63 |
| CHI3L1 + IL10 + POSTN | 0.77 |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 0.88 |
| CHI3L1 + IL8 + POSTN | 0.98 |
| CHI3L1 + PI3 + POSTN | 0.76 |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 superior | 0.78 |
| CHI3L1 + PI3 + MSR1 inferior | 0.68 |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 0.73 |
| CHI3L1 + POSTN + MSR1 superior | 0.80 |
| CHI3L1 + POSTN + MSR1 inferior | 0.80 |
| CHI3L1 + MSR1 superior + MSR1 inferior | 0.68 |
| IL10 + PI3 + POSTN | 0.77 |
| IL8 + PI3 + POSTN | 0.82 |
| PI3 + POSTN + MSR1 superior | 0.60 |
| PI3 + POSTN + MSR1 inferior | 0.60 |
| PI3 + POSTN + SERPINB2 | 0.93 |
| PI3 + MSR1 superior + MSR1 inferior | 0.60 |
| POSTN + MSR1 superior + MSR1 inferior | 0.62 |

5 En **negrita se encuentran los valores AUC>0.75, cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, en todos se observa una mejoría o sinergia.**

D) Grupo asmático alérgico (AA) comparado con el grupo control

| Combinación de marcadores | Valor AUC TOTAL | Valor AUC ML | Valor AUC G |
|----------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 0.71 | 0.68 | 0.72 |
| CHI3L1 + IL10 + POSTN | 0.83 | 0.82 | 0.86 |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 0.92 | 0.89 | |
| CHI3L1 + IL8 + POSTN | 0.91 | 0.86 | |
| CHI3L1 + PI3 + POSTN | 0.78 | 0.78 | 0.81 |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 0.75 | | |
| CHI3L1 + POSTN + PHLDA1 | 0.71 | | |
| IL10 + PI3 + POSTN | 0.86 | 0.85 | 0.89 |
| IL8 + PI3 + POSTN | 0.67 | 0.65 | 0.94 |
| PI3 + POSTN + PHLDA1 | 0.79 | | |
| PI3 + POSTN + SERPINB2 | 0.97 | | |

En negrita se encuentran los valores $AUC > 0.75$, cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia en: 1. Grupo AA total comparado con controles en todos, excepto la combinación CHI3L1+PI3+POSTN. 2. Grupo AA moderado/leve comparado con controles en todos, excepto la combinación CHI3L1+PI3+POSTN. 3. Grupo AA grave comparado con controles en todos. Total: grupo total de sujetos del grupo. ML: grupo de sujetos con asma moderado-leve. G: grupo de sujetos con asma grave.

E) Grupo asmático alérgico (AA) moderado-leve comparado con el grupo (AA) grave.

| Combinación de marcadores | Valor AUC |
|----------------------------------|------------------|
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 0.65 |
| CHI3L1 + IL10 + POSTN | 0.63 |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 0.82 |
| CHI3L1 + IL8 + POSTN | 0.84 |
| CHI3L1 + PI3 + POSTN | 0.56 |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 0.90 |
| CHI3L1 + POSTN+ SERPINB2 | 0.93 |
| IL10 + PI3 + POSTN | 0.74 |
| IL8 + PI3 + POSTN | 0.82 |
| PI3 + POSTN + SERPINB2 | 0.93 |

En negrita se encuentran los valores $AUC > 0.75$, cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia en todos excepto en: CHI3L1 + IL8 + PI3; IL8 + PI3 + POSTN.

F) Grupo alérgico (A) no asmático comparado con el grupo control.

| Combinación de marcadores | Valor AUC TOTAL |
|----------------------------------|----------------------------|
| CHI3L1 + PI3 + POSTN | 0.80 |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 0.75 |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 0.83 |
| CHI3L1 + POSTN + PHLDA1 | 0.66 |
| CHI3L1 + POSTN + SERPINB2 | 0.77 |
| PI3 + POSTN + PHLDA1 | 0.82 |
| PI3 + POSTN + SERPINB2 | 0.90 |

En negrita se encuentran los valores AUC cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, todos muestran una mejoría o sinergia. Total: grupo total de sujetos del grupo.

Ejemplo 3. Valoración Global de resultados de Biomarcadores proteicos

En base a los análisis de curvas ROC individual y agrupados de los 8 Biomarcadores proteicos estudiados, las mejores opciones de Biomarcadores para cada condición analizada serían:

a. Asma no alérgico (ANA)

1. Biomarcadores capaces de discriminar ANA (Población total) de sujetos controles

| | <u>AUC</u> |
|-------------------------|------------|
| MSR1 inferior | 0.96 |
| SERPINB2 | 0.91 |
| MSR1 inferior+ MSR1 sup | 1 |
| CHI3L1+MSR1inf | 0.97 |
| POSTN+SERPINB2 | 0.95 |
| CHI3L1+ SERPINB2 | 0.92 |
| POSTN+PHLDA1 | 0.82 |

| | |
|----------------------|------|
| CHI3L1+MSR1sup | 0.78 |
| PI3+POSTN+MSR1inf | 0.97 |
| CHI3L1+POSTN+MSR1sup | 0.83 |
| PI3+POSTN+MSR1sup | 0.77 |

5

2. Biomarcadores capaces de discriminar ANA M/L de sujetos controles

| | <u>AUC</u> |
|------------------|------------|
| MSR1 inferior | 1 |
| 10 SERPINB2 | 0.89 |
| CHI3L1+ SERPINB2 | 0.97 |
| POSTN+SERPINB2 | 0.97 |
| IL8+POSTN | 0.87 |
| CHI3L1+MSR1sup | 0.83 |
| 15 POSTN+MSR1sup | 0.81 |
| IL8+PI3 | 0.76 |
| CHI3L1+IL8+POSTN | 0.87 |
| CHI3L1+IL8+PI3 | 0.79 |

20 3. Biomarcadores capaces de discriminar ANA Grave de sujetos controles

| | <u>AUC</u> |
|----------------------------|------------|
| MSR1 inferior | 0.93 |
| SERPINB2 | 0.93 |
| 25 MSR1 inferior+ MSR1 sup | 1 |
| POSTN+SERPINB2 | 0.97 |
| PI3+MSR1inf | 0.95 |
| CHI3L1+MSR1inf | 0.94 |
| CHI3L1+MSR1sup | 0.76 |
| 30 PI3+POSTN+MSR1inf | 0.96 |
| CHI3L1+PI3+MSR1inf | 0.95 |
| CHI3L1+IL8+PI3 | 0.79 |
| PI3+POSTN+MSR1sup | 0.77 |

35

4. Biomarcadores capaces de discriminar ANA M/L de ANA Grave

| | <u>AUC</u> | |
|----|-----------------------|------|
| | IL8 | 0.76 |
| 5 | POSTN+SERPINB2 | 0.90 |
| | IL8+PI3 | 0.82 |
| | IL8+POSTN | 0.78 |
| | CHI3L1+POSTN | 0.77 |
| | POSTN+IL10 | 0.77 |
| 10 | CHI3L1+IL8+POSTN | 0.98 |
| | PI3+POSTN+SERPINB2 | 0.93 |
| | CHI3L1+IL8+PI3 | 0.88 |
| | CHI3L1+POSTN+ MSR1sup | 0.80 |
| | CHI3L1+POSTN+ MSR1inf | 0.80 |
| 15 | CHI3L1+PI3+ MSR1sup | 0.78 |

b. Asma alérgico (AA)20 1. Biomarcadores capaces de discriminar AA (Población total) de sujetos controles

| | <u>AUC</u> | |
|----|-----------------|------|
| | SERPINB2 | 0.97 |
| 25 | CHI3L1 | 0.78 |
| | IL8 | 0.76 |
| | CHI3L1+SERPINB2 | 1 |
| | CHI3L1+IL8 | 0.92 |
| | IL10+POSTN | 0.85 |
| 30 | CHI3L1+POSTN | 0.79 |
| | POSTN+PHLAD1 | 0.79 |
| | IL10+POSTN+PI3 | 0.86 |

2. Biomarcadores capaces de discriminar AA M/L de sujetos controles

| | <u>AUC</u> |
|----------------|------------|
| SERPINB2 | 1 |
| CHI3L1 | 0.78 |
| 5 CHI3L1+IL8 | 0.87 |
| IL10+POSTN | 0.83 |
| CHI3L1+IL8+PI3 | 0.89 |
| IL10+POSTN+PI3 | 0.85 |

10 3. Biomarcadores capaces de discriminar AA Graves de sujetos controles

| | <u>AUC</u> |
|-------------------|------------|
| SERPINB2 | 0.77 |
| CHI3L1+IL8 | 1 |
| 15 POSTN+SERPINB2 | 0.97 |
| IL8+PI3 | 0.95 |
| IL8+POSTN | 0.95 |
| PI3+SERPINB2 | 0.93 |
| IL10+POSTN | 0.86 |
| 20 CHI3L1+PI3 | 0.80 |
| CHI3L1+POSTN | 0.80 |
| IL10+PI3+POSTN | 0.89 |
| CHI3L1+PI3+POSTN | 0.81 |

25 4. Biomarcadores capaces de discriminar AA M/L de AA Grave

| | <u>AUC</u> |
|-------------------|------------|
| IL8 | 0.82 |
| SERPINB2 | 0.77 |
| 30 POSTN+SERPINB2 | 0.93 |
| CHI3L1+SERPINB2 | 0.90 |
| PI3+SERPINB2 | 0.87 |
| IL8+POSTN | 0.84 |

c. Alergia (A) sin asma

1. Biomarcadores capaces de discriminar A de sujetos controles

| | | <u>AUC</u> |
|----|--------------------|------------|
| 5 | IL8 | 0.82 |
| | CHI3L1+IL8 | 1 |
| | IL8+POSTN | 0.90 |
| | IL8+PI3 | 0.87 |
| | PI3+SERPINB2 | 0.83 |
| 10 | PI3+POSTN | 0.80 |
| | POSTN+SERPINB2 | 0.80 |
| | PI3+POSTN+SERPINB2 | 0.90 |
| | PI3+POSTN+PHLDA1 | 0.82 |

15 **d. Comparaciones de expresión proteica entre fenotipos clínicos**

1. Comparaciones entre asmáticos no alérgicos (ANA) total y asmáticos alérgicos (AA) total.

- NO: Asmáticos no alérgicos (ANA)

- N1: Asmáticos alérgicos (AA)

20 - AUC: Área Bajo la Curva ROC.

Curvas ROC

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 30 | 30 | 0.74 (0.61 - 0.88) | 20202 |
| IL10 | 11 | 21 | 0.45 (0.23 - 0.67) | 457.4 |
| IL8 | 14 | 14 | 0.68 (0.46 - 0.89) | 221 |
| PI3 | 29 | 30 | 0.57 (0.42 - 0.72) | 5126 |
| Periostina | 30 | 30 | 0.62 (0.48 - 0.77) | 22785 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 5 | 6 | 0.40 (0.00 - 0.80) | 0.012 |
| SERPINB2 | 11 | 11 | 0.64 (0.39 - 0.88) | 0.116 |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | Variables |
|---------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 11 | 21 | 0.73 (0.49 - 0.96) | 0.81 (0.65 - 0.96) |
| CHI3L1+IL8 | 14 | 14 | 0.82 (0.64 - 0.99) | 0.90 (0.79 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 29 | 30 | 0.75 (0.62 - 0.89) | 0.84 (0.75 - 0.94) |
| CHI3L1+Periostina | 30 | 30 | 0.76 (0.64 - 0.89) | 0.87 (0.79 - 0.95) |
| CHI3L1+PHLDA1 | 5 | 6 | 0.43 (0.02 - 0.85) | 0.85 (0.59 - 1.00) |
| CHI3L1+SERPINB2 | 11 | 11 | 0.83 (0.64 - 1.00) | 0.88 (0.74 - 1.00) |
| IL10+IL8 | 5 | 11 | 0.71 (0.42 - 0.99) | 0.85 (0.65 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 11 | 21 | 0.46 (0.24 - 0.68) | 0.60 (0.40 - 0.79) |
| IL10+Periostina | 11 | 21 | 0.87 (0.74 - 1.00) | 0.74 (0.59 - 0.89) |
| IL8+PI3 | 14 | 14 | 0.67 (0.45 - 0.89) | 0.74 (0.56 - 0.92) |
| IL8+Periostina | 14 | 14 | 0.76 (0.57 - 0.94) | 0.75 (0.57 - 0.93) |
| IL8+SERPINB2 | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 0.81 (0.56 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 29 | 30 | 0.67 (0.53 - 0.81) | 0.75 (0.63 - 0.86) |
| PI3+PHLDA1 | 5 | 6 | 0.60 (0.19 - 1.00) | 0.67 (0.32 - 1.00) |
| PI3+SERPINB2 | 11 | 11 | 0.69 (0.45 - 0.92) | 0.77 (0.57 - 0.96) |
| Periostina+PHLDA1 | 5 | 6 | 0.70 (0.34 - 1.00) | 0.83 (0.57 - 1.00) |
| Periostina+SERPINB2 | 11 | 11 | 0.75 (0.52 - 0.98) | 0.85 (0.70 - 1.00) |
| PHLDA1+SERPINB2 | 5 | 5 | 0.80 (0.50 - 1.00) | 0.82 (0.51 - 1.00) |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | Variables |
|--------------------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + IL8 | 5 | 11 | 0.76 (0.47 - 1.00) | 0.92 (0.79 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 11 | 21 | 0.71 (0.48 - 0.93) | 0.82 (0.65 - 0.99) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 11 | 21 | 0.92 (0.81 - 1.00) | 0.90 (0.80 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 14 | 14 | 0.82 (0.64 - 0.99) | 0.93 (0.84 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 14 | 14 | 0.88 (0.76 - 1.00) | 0.92 (0.82 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 29 | 30 | 0.80 (0.68 - 0.91) | 0.93 (0.87 - 0.99) |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 5 | 6 | 0.63 (0.25 - 1.00) | 0.87 (0.60 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 11 | 11 | 0.84 (0.65 - 1.00) | 0.92 (0.78 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + PHLDA1 | 5 | 6 | 0.77 (0.46 - 1.00) | 0.98 (0.94 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + SERPINB2 | 11 | 11 | 0.85 (0.69 - 1.00) | 0.96 (0.89 - 1.00) |
| CHI3L1 + PHLDA1 + SERPINB2 | 5 | 5 | 0.84 (0.52 - 1.00) | 0.90 (0.70 - 1.00) |
| IL10 + IL8 + PI3 | 5 | 11 | 0.82 (0.57 - 1.00) | 0.95 (0.85 - 1.00) |
| IL10 + IL8 + Periostina | 5 | 11 | 0.87 (0.69 - 1.00) | 0.86 (0.70 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 11 | 21 | 0.87 (0.74 - 0.99) | 0.77 (0.58 - 0.95) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 14 | 14 | 0.76 (0.58 - 0.94) | 0.78 (0.60 - 0.96) |
| IL8 + PI3 + SERPINB2 | 7 | 7 | 0.80 (0.54 - 1.00) | 0.88 (0.70 - 1.00) |
| IL8 + Periostina + SERPINB2 | 7 | 7 | 0.82 (0.56 - 1.00) | 0.87 (0.65 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + PHLDA1 | 5 | 6 | 0.67 (0.30 - 1.00) | 0.92 (0.76 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 11 | 11 | 0.77 (0.56 - 0.98) | 0.89 (0.75 - 1.00) |
| PI3 + PHLDA1 + SERPINB2 | 5 | 5 | 0.84 (0.57 - 1.00) | 0.92 (0.74 - 1.00) |

Tabla comparativa. Grupo asmático no alérgico (ANA) total comparado con el grupo asmático alérgico (AA) total

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|--------|------|-------------|------|-------------|----------|----------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.74 | 0.73 | 0.82 | 0.75 | 0.76 | | | 0.43 | 0.83 |
| IL10 | | 0.45 | 0.71 | 0.46 | 0.87 | | | | |
| IL8 | | | 0.68 | 0.67 | 0.76 | | | | 0.82 |
| PI3 | | | | 0.57 | 0.67 | | | 0.6 | 0.69 |
| POSTN | | | | | 0.62 | | | 0.7 | 0.75 |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.4 | 0.8 |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.64 |

Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75, bueno, muy bueno o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; CHI3L1 y SERPINB2; IL10 y POSTN (Periostina), IL8 y POSTN; IL8 y SERPINB2; SERPINB2 y PHLDA1 y mínimamente entre CHI3L1 y POSTN.

5

2. Comparaciones entre asmáticos no alérgicos (ANA) graves y asmáticos alérgicos (AA) graves

5

- **NO: Asmáticos no alérgicos graves (ANA)**
- **N1: Asmáticos alérgicos graves (AA)**
- **AUC: Área Bajo la Curva ROC**

Curvas ROC

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|---------------|----|----|--------------------|--------|
| CHI3L1 | 15 | 15 | 0.82 (0.67 - 0.98) | 20202 |
| IL10 | 6 | 13 | 0.49 (0.17 - 0.81) | 184.6 |
| IL8 | 7 | 7 | 0.63 (0.30 - 0.97) | 122 |
| PI3 | 15 | 15 | 0.48 (0.26 - 0.70) | 5758 |
| Periostina | 15 | 15 | 0.69 (0.50 - 0.89) | 22785 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 3 | 3 | | |
| SERPINB2 | 6 | 6 | 0.78 (0.47 - 1.00) | 0.11 |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | |
|-------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 6 | 13 | 0.69 (0.39 - 0.99) | 0.81 (0.54 - 1.00) |
| CHI3L1+IL8 | 7 | 7 | 0.86 (0.64 - 1.00) | 0.94 (0.83 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 15 | 15 | 0.83 (0.67 - 0.98) | 0.81 (0.65 - 0.97) |
| CHI3L1+Periostina | 15 | 15 | 0.86 (0.72 - 1.00) | 0.87 (0.76 - 0.99) |
| IL10+PI3 | 6 | 13 | 0.68 (0.40 - 0.96) | 0.72 (0.51 - 0.94) |
| IL10+Periostina | 6 | 13 | 0.94 (0.83 - 1.00) | 0.91 (0.79 - 1.00) |
| IL8+PI3 | 7 | 7 | 0.69 (0.40 - 0.99) | 0.71 (0.44 - 0.99) |
| IL8+Periostina | 7 | 7 | 0.86 (0.65 - 1.00) | 0.83 (0.62 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 15 | 15 | 0.69 (0.49 - 0.89) | 0.73 (0.55 - 0.90) |
| PI3+SERPINB2 | 6 | 6 | 0.92 (0.76 - 1.00) | 0.97 (0.91 - 1.00) |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | |
|---------------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 6 | 13 | 0.72 (0.48 - 0.96) | 0.86 (0.68 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 7 | 7 | 0.88 (0.69 - 1.00) | 0.95 (0.85 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + Periostina | 7 | 7 | 0.96 (0.86 - 1.00) | 0.95 (0.85 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 15 | 15 | 0.86 (0.72 - 1.00) | 0.87 (0.74 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 6 | 13 | 0.94 (0.83 - 1.00) | 0.92 (0.78 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 7 | 7 | 0.86 (0.65 - 1.00) | 0.85 (0.63 - 1.00) |

Tabla comparativa. Grupo asmático no alérgico (ANA) grave comparado con el grupo asmático alérgico (AA) grave

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|-------------|------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.82 | 0.69 | 0.86 | 0.83 | 0.86 | | | | |
| IL10 | | 0.49 | | 0.68 | 0.94 | | | | |
| IL8 | | | 0.63 | 0.69 | 0.86 | | | | |
| PI3 | | | | 0.48 | 0.69 | | | | 0.92 |
| POSTN | | | | | 0.69 | | | | |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.78 |

- 5 Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75, bueno, muy bueno o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; CHI3L1 y POSTN; IL10 y POSTN (Periostina), IL8 y POSTN; PI3 y SERPINB2 y mínimamente entre CHI3L1 y PI3.

Comparaciones entre asmáticos no alérgicos (ANA) leves y asmáticos alérgicos (AA) leves

a. **NO: Asmáticos no alérgicos leves**

b. **N1: Asmáticos alérgicos leves**

c. **AUC: Área Bajo la Curva ROC**

5

Curvas ROC

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 15 | 15 | 0.66 (0.43 - 0.89) | 20227 |
| IL10 | 5 | 8 | 0.60 (0.26 - 0.94) | 167.9 |
| IL8 | 7 | 7 | 0.73 (0.44 - 1.00) | 221 |
| PI3 | 14 | 15 | 0.62 (0.41 - 0.83) | 5028 |
| Periostina | 15 | 15 | 0.53 (0.32 - 0.75) | 24658 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 2 | 3 | | |
| SERPINB2 | 5 | 5 | 0.60 (0.19 - 1.00) | 0.134 |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | |
|---------------------|-----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+IL10 | 5 | 8 | 0.60 (0.26 - 0.94) | 0.75 (0.45 - 1.00) |
| CHI3L1+IL8 | 7 | 7 | 0.80 (0.51 - 1.00) | 0.93 (0.79 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 14 | 15 | 0.63 (0.41 - 0.86) | 0.86 (0.73 - 0.99) |
| CHI3L1+Periostina | 15 | 15 | 0.72 (0.52 - 0.91) | 0.87 (0.75 - 0.99) |
| CHI3L1+SERPINB2 | 5 | 5 | 0.72 (0.37 - 1.00) | 0.88 (0.71 - 1.00) |
| IL10+PI3 | 5 | 8 | 0.68 (0.36 - 0.99) | 0.70 (0.40 - 1.00) |
| IL10+Periostina | 5 | 8 | 0.82 (0.59 - 1.00) | 0.83 (0.62 - 1.00) |
| IL8+PI3 | 7 | 7 | 0.82 (0.53 - 1.00) | 0.85 (0.65 - 1.00) |
| IL8+Periostina | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 0.84 (0.68 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 14 | 15 | 0.67 (0.46 - 0.87) | 0.74 (0.57 - 0.91) |
| PI3+SERPINB2 | 5 | 5 | 0.68 (0.30 - 1.00) | 0.72 (0.40 - 1.00) |
| Periostina+SERPINB2 | 5 | 5 | 0.40 (0.00 - 0.81) | 0.84 (0.59 - 1.00) |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | |
|--------------------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cuantitativas |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 5 | 8 | 0.68 (0.36 - 0.99) | 0.81 (0.57 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL10 + Periostina | 5 | 8 | 0.90 (0.72 - 1.00) | 0.85 (0.64 - 1.00) |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 7 | 7 | 0.71 (0.38 - 1.00) | 0.98 (0.93 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 14 | 15 | 0.80 (0.64 - 0.97) | 0.94 (0.87 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 5 | 5 | 0.72 (0.37 - 1.00) | 0.90 (0.71 - 1.00) |
| CHI3L1 + Periostina + SERPINB2 | 5 | 5 | 0.68 (0.30 - 1.00) | 0.90 (0.71 - 1.00) |
| IL10 + PI3 + Periostina | 5 | 8 | 0.82 (0.59 - 1.00) | 0.85 (0.64 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 7 | 7 | 0.84 (0.62 - 1.00) | 0.88 (0.71 - 1.00) |
| PI3 + Periostina + SERPINB2 | 5 | 5 | 0.64 (0.25 - 1.00) | 0.86 (0.63 - 1.00) |

Tabla comparativa. Grupo asmático no alérgico (ANA) leve comparado con el grupo asmático alérgico (AA) leve

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|----------|--------|------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|--------|----------|
| CHI3L1 | 0.66 | 0.60 | 0.80 | 0.63 | 0.72 | | | | 0.72 |
| IL10 | | 0.60 | | 0.68 | 0.82 | | | | |
| IL8 | | | 0.73 | 0.82 | 0.82 | | | | |
| PI3 | | | | 0.62 | 0.67 | | | | 0.68 |
| POSTN | | | | | 0.53 | | | | 0.40 |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.60 |

- 5 Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75, bueno, muy bueno o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; IL10 y POSTN (Periostina), IL8 y PI3; IL8 y POSTN.

4. Comparaciones entre asmáticos alérgicos (AA) y alérgicos (A) no asmáticos

- a. NO: Asmáticos alérgicos
- b. N1: Alérgicos no asmáticos.
- c. AUC: Área Bajo la Curva ROC

5

Curvas ROC

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|---------------|----|----|--------------------|--------|
| CHI3L1 | 30 | 14 | 0.60 (0.36 - 0.84) | 15719 |
| IL10 | 21 | 4 | | |
| IL8 | 14 | 7 | 0.88 (0.72 - 1.00) | 67 |
| PI3 | 30 | 14 | 0.63 (0.43 - 0.84) | 7348 |
| Periostina | 30 | 14 | 0.80 (0.67 - 0.93) | 14418 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 6 | 7 | 0.48 (0.12 - 0.83) | 0.025 |
| SERPINB2 | 11 | 5 | 0.93 (0.80 - 1.00) | 0.116 |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | |
|-------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cuantitativas |
| CHI3L1+IL8 | 14 | 7 | 0.91 (0.78 - 1.00) | 0.95 (0.87 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 30 | 14 | 0.58 (0.35 - 0.80) | 0.83 (0.70 - 0.96) |
| CHI3L1+Periostina | 30 | 14 | 0.81 (0.68 - 0.94) | 0.91 (0.84 - 0.97) |
| CHI3L1+PHLDA1 | 6 | 7 | 0.43 (0.09 - 0.77) | 0.68 (0.40 - 0.96) |
| CHI3L1+SERPINB2 | 11 | 5 | 1.00 (1.00 - 1.00) | 0.96 (0.90 - 1.00) |
| IL8+PI3 | 14 | 7 | 0.89 (0.75 - 1.00) | 0.89 (0.76 - 1.00) |
| IL8+Periostina | 14 | 7 | 0.90 (0.75 - 1.00) | 0.94 (0.85 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 30 | 14 | 0.80 (0.66 - 0.93) | 0.90 (0.81 - 0.98) |
| PI3+PHLDA1 | 6 | 7 | 0.76 (0.48 - 1.00) | 0.77 (0.51 - 1.00) |
| PI3+SERPINB2 | 11 | 5 | 0.96 (0.88 - 1.00) | 0.98 (0.94 - 1.00) |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | |
|---------------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cuantitativas |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 14 | 7 | 0.91 (0.78 - 1.00) | 0.96 (0.90 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 30 | 14 | 0.80 (0.67 - 0.93) | 0.95 (0.89 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 6 | 7 | 0.71 (0.41 - 1.00) | 0.90 (0.75 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 14 | 7 | 0.93 (0.82 - 1.00) | 0.94 (0.83 - 1.00) |

Tabla comparativa. Grupo asmático asmáticos alérgicos (AA) y alérgicos (A) no asmáticos

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|--------|------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|-------------|-------------|
| CHI3L1 | 0.6 | | 0.91 | 0.58 | 0.81 | | | 0.43 | 1 |
| IL10 | | | | | | | | | |
| IL8 | | | 0.88 | 0.89 | 0.9 | | | | |
| PI3 | | | | 0.63 | 0.8 | | | 0.76 | 0.96 |
| POSTN | | | | | 0.8 | | | | |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | 0.48 | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.93 |

5 Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75, bueno, muy bueno o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: CHI3L1 e IL8; CHI3L1 y SERPINB2; PI3 y PHLDA1; PI3 y SERPINB2; mínimo entre CHI3L1 y POSTN; mínimo entre IL8 y PI3 e IL8 y POSTN.

5. Comparaciones entre asmáticos alérgicos (AA) graves y alérgicos (A) no asmáticos

5

a. NO: Asmáticos alérgicos graves

b. N1: Alérgicos no asmáticos

c. AUC: Área Bajo la Curva ROC

Curvas ROC

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|---------------|----|----|--------------------|--------|
| CHI3L1 | 15 | 14 | 0.60 (0.36 - 0.84) | 15719 |
| IL10 | 13 | 4 | | |
| IL8 | 7 | 7 | 0.80 (0.55 - 1.00) | 1023 |
| PI3 | 15 | 14 | 0.66 (0.44 - 0.88) | 7348 |
| Periostina | 15 | 14 | 0.77 (0.58 - 0.95) | 14732 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 3 | 7 | | |
| SERPINB2 | 6 | 5 | | |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | |
|-------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cuantitativas |
| CHI3L1+IL8 | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 0.90 (0.73 - 1.00) |
| CHI3L1+PI3 | 15 | 14 | 0.62 (0.40 - 0.84) | 0.83 (0.68 - 0.97) |
| CHI3L1+Periostina | 15 | 14 | 0.78 (0.61 - 0.96) | 0.90 (0.82 - 0.98) |
| IL8+PI3 | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 0.93 (0.79 - 1.00) |
| IL8+Periostina | 7 | 7 | 0.90 (0.73 - 1.00) | 0.91 (0.79 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 15 | 14 | 0.80 (0.62 - 0.97) | 0.91 (0.81 - 1.00) |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | |
|---------------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 7 | 7 | 0.82 (0.58 - 1.00) | 0.94 (0.82 - 1.00) |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 15 | 14 | 0.80 (0.63 - 0.98) | 0.95 (0.89 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 7 | 7 | 0.98 (0.92 - 1.00) | 0.97 (0.90 - 1.00) |

Tabla comparativa. Grupo asmático asmáticos alérgicos (AA) grave y alérgicos (A) no asmáticos

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|--------|------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|--------|----------|
| CHI3L1 | 0.6 | | 0.82 | 0.62 | 0.78 | | | | |
| IL10 | | | | | | | | | |
| IL8 | | | 0.8 | 0.82 | 0.90 | | | | |
| PI3 | | | | 0.66 | 0.8 | | | | |
| POSTN | | | | | 0.77 | | | | |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | |

- 5 Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75, bueno, muy bueno o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia entre: IL8 y POSTN; Mínima entre CHI3L1 e IL8; CHI3L1 y POSTN; IL8 y PI3; PI3 y POSTN.

6. Comparaciones entre asmáticos alérgicos (AA) leves y alérgicos (A) no asmáticos

a. **NO: Asmáticos alérgicos leves.**

b. **N1: Alérgicos no asmáticos.**

c. **AUC: Área Bajo la Curva ROC**

5

Curvas ROC

| Variable | N0 | N1 | AUC (IC95%) | Umbral |
|-----------------|-----------|-----------|--------------------|---------------|
| CHI3L1 | 15 | 14 | 0.60 (0.35 - 0.84) | 16093 |
| IL10 | 8 | 4 | | |
| IL8 | 7 | 7 | 0.96 (0.86 - 1.00) | 67 |
| PI3 | 15 | 14 | 0.60 (0.38 - 0.83) | 7256 |
| Periostina | 15 | 14 | 0.83 (0.67 - 1.00) | 14418 |
| MSR1 superior | | | | |
| MSR1 inferior | | | | |
| PHLDA1 | 3 | 7 | | |
| SERPINB2 | 5 | 5 | 0.84 (0.57 - 1.00) | 0.116 |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de dos variables

| Combinación | N0 | N1 | Variables | |
|--------------------|-----------|-----------|----------------------|---------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1+PI3 | 15 | 14 | 0.57 (0.33 - 0.81) | 0.83 (0.69 - 0.97) |
| CHI3L1+Periostina | 15 | 14 | 0.82 (0.66 - 0.99) | 0.92 (0.84 - 0.99) |
| IL8+PI3 | 7 | 7 | 0.96 (0.86 - 1.00) | 0.96 (0.87 - 1.00) |
| IL8+Periostina | 7 | 7 | 0.94 (0.82 - 1.00) | 0.94 (0.82 - 1.00) |
| PI3+Periostina | 15 | 14 | 0.80 (0.63 - 0.98) | 0.89 (0.77 - 1.00) |
| PI3+SERPINB2 | 5 | 5 | 0.92 (0.74 - 1.00) | 0.96 (0.87 - 1.00) |

Curvas ROC para modelos con combinaciones de tres variables

| Variable | N0 | N1 | Variables | |
|---------------------------|----|----|--------------------|--------------------|
| | | | cuantitativas | cualitativas |
| CHI3L1 + PI3 + Periostina | 15 | 14 | 0.81 (0.64 - 0.98) | 0.94 (0.87 - 1.00) |
| IL8 + PI3 + Periostina | 7 | 7 | 0.96 (0.86 - 1.00) | 0.97 (0.90 - 1.00) |

Tabla comparativa. Grupo asmático asmáticos alérgicos (AA) leve y alérgicos (A) no asmáticos

| | CHI3L1 | IL10 | IL8 | PI3 | POSTN | MSR1 sup | MSR1 inf | PHLDA1 | SERPINB2 |
|-----------------|--------|------|-------------|-------------|-------------|----------|----------|--------|-------------|
| CHI3L1 | 0.6 | | | 0.57 | 0.82 | | | | |
| IL10 | | | | | | | | | |
| IL8 | | | 0.96 | 0.96 | 0.94 | | | | |
| PI3 | | | | 0.6 | 0.8 | | | | 0.92 |
| POSTN | | | | | 0.83 | | | | |
| MSR1 sup | | | | | | | | | |
| MSR1 inf | | | | | | | | | |
| PHLDA1 | | | | | | | | | |
| SERPINB2 | | | | | | | | | 0.84 |

5 Están señalados todos los valores con criterios de AUC>0.75, bueno, muy bueno o excelente. De éstos, sólo se observa una mejoría o sinergia entre: PI3 y SERPINB2.

7. Comparaciones de expresión proteica entre fenotipos clínicos. Valores AUC del análisis de curvas ROC por combinación de la expresión proteica de tres biomarcadores.

5 **A) Grupo asmático no alérgico (ANA) comparado con el grupo alérgico asmático (AA).**

| Combinación de marcadores | Valor AUC TOTAL | Valor AUC ML | Valor AUC G |
|----------------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------|
| CHI3L1 + IL10 + IL8 | 0.76 | | |
| CHI3L1 + IL10 + PI3 | 0.71 | 0.68 | 0.72 |
| CHI3L1 + IL10 + POSTN | 0.92 | 0.9 | |
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 0.82 | 0.71 | 0.88 |
| CHI3L1 + IL8 + POSTN | 0.88 | | 0.96 |
| CHI3L1 + PI3 + POSTN | 0.8 | 0.8 | 0.86 |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 0.63 | | |
| CHI3L1 + PI3 + SERPINB2 | 0.84 | 0.72 | |
| CHI3L1 + POSTN + PHLDA1 | 0.77 | | |
| CHI3L1 + POSTN + SERPINB2 | 0.85 | 0.68 | |
| CHI3L1 + PHLDA1 + SERPINB2 | 0.84 | | |
| IL10 + IL8+PI3 | 0.82 | | |
| IL10 + IL8+POSTN | 0.87 | | |
| IL10 + PI3 + POSTN | 0.87 | 0.82 | 0.94 |
| IL8 + PI3 + POSTN | 0,76 | 0,84 | 0,86 |
| IL8 + PI3 + SERPINB2 | 0.8 | | |
| IL8 + POSTN+SERPINB2 | 0.82 | | |
| PI3 + POSTN + PHLDA1 | 0.67 | | |
| PI3 + POSTN + SERPINB2 | 0.77 | 0.64 | |
| PI3 + PHLDA1+ SERPINB2 | 0.84 | | |

En negrita se encuentran los valores AUC>0.75, cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia en: 1. Grupo ANA total comparado con AA entre: CHI3L1 + IL10 + POSTN; CHI3L1 + IL8 + PI3; CHI3L1 + IL8 + POSTN; CHI3L1 + PI3 + POSTN; CHI3L1 + PI3 + SERPINB2; CHI3L1 + POSTN +

10

SERPINB2; IL10 + IL8+PI3; IL10 + IL8+POSTN; IL10 + PI3 + POSTN; IL8 + PI3 + POSTN; IL8 + PI3 + SERPINB2; IL8 + POSTN+SERPINB2; PI3 + POSTN + SERPINB2; PI3 + PHLDA1+ SERPINB2; Mínimamente entre CHI3L1 + POSTN + PHLDA1, CHI3L1 + IL10 + IL8. 2. En el grupo ANA moderado/leve comparado con grupo AA M/L entre: CHI3L1 + IL10 + POSTN; CHI3L1 + PI3 + POSTN; IL10+PI3+POSTN; IL8+PI3+POSTN. 3. En el grupo ANA grave comparado con AA grave entre: CHI3L1 + IL8 + PI3; CHI3L1 + IL8 + POSTN; CHI3L1 + PI3 +POSTN;IL10+PI3+POSTN; IL8+ PI3 +POSTN. Total: grupo total de sujetos del grupo. ML: grupo de sujetos con asma moderado-leve. G: grupo de sujetos con asma grave

B) Grupo asmático alérgico (AA) comparado con el grupo alérgico no asmático (A).

| Combinación de marcadores | Valor AUC TOTAL | Valor AUC ML | Valor AUC G |
|---------------------------|--------------------|-----------------|----------------|
| CHI3L1 + IL8 + PI3 | 0.91 | | 0.82 |
| CHI3L1 + PI3 + POSTN | 0.8 | 0.81 | 0.8 |
| CHI3L1 + PI3 + PHLDA1 | 0.71 | | |
| IL8 + PI3 + POSTN | 0.93 | 0.96 | 0.98 |

En negrita se encuentran los valores AUC>0.75, cuyas combinaciones de biomarcadores da lugar a un test de categoría buena, muy buena o excelente. De éstos, se observa una mejoría o sinergia en: 1. Grupo AA total comparado con A entre: CHI3L1 + IL8 + PI3; IL8 + PI3 + POSTN. 2. En el grupo AA moderado/leve comparado con grupo A entre: CHI3L1 + PI3 + POSTN; IL8+PI3+POSTN. 3. En el grupo AA grave comparado con A: CHI3L1 + IL8 + PI3; CHI3L1 + PI3 +POSTN; IL8+ PI3 +POSTN. Total: grupo total de sujetos del grupo. ML: grupo de sujetos con asma moderado-leve. G: grupo de sujetos con asma grave.

Valoración Global de resultados de Biomarcadores proteicos para discriminar fenotipos clínicos entre sí.

En base a los análisis de curvas ROC individual y agrupados de los 8 Biomarcadores proteicos estudiados, las mejores opciones de Biomarcadores para cada condición clínica analizada serían los que se detallan a continuación.

1. Biomarcadores capaces de discriminar ANA (Asmáticos no alérgicos) de Asmáticos Alérgicos (AA)

| | <u>AUC</u> |
|----|-----------------------------|
| 10 | CHI3L1 0.74 |
| | IL10+Periostina 0.87 |
| | CHI3L1+SERPINB2 0.83 |
| | CHI3L1+IL8 0.82 |
| 15 | IL8+SERPINB2 0.82 |
| | PHLDA1+SERPINB2 0.80 |
| | IL8+Periostina 0.76 |
| | CHI3L1+IL10+Periostina 0.92 |
| | CHI3L1+IL8+Periostina 0.88 |
| 20 | PI3+PHLDA1+SERPINB2 0.84 |
| | CHI3L1+PI3+Periostina 0.80 |

2. Biomarcadores capaces de discriminar ANA (Asmáticos no alérgicos) grave de Asmáticos Alérgicos (AA) grave.

| | <u>AUC</u> |
|----|----------------------------|
| 25 | CHI3L1 0.82 |
| | SERPINB2 0.78 |
| | IL10+Periostina 0.94 |
| 30 | PI3+SERPINB2 0.92 |
| | CHI3L1+IL8 0.86 |
| | CHI3L1+Periostina 0.86 |
| | IL8+Periostina 0.86 |
| | CHI3L1+IL8+Periostina 0.96 |

3. Biomarcadores capaces de discriminar ANA (Asmáticos no alérgicos) Mod/leve de Asmáticos Alérgicos (AA) Mod/leve.

| | <u>AUC</u> | |
|----|------------------------|------|
| 5 | CHI3L1+IL8 | 0.86 |
| | IL10+Periostina | 0.82 |
| | IL8+PI3 | 0.82 |
| | IL8+Periostina | 0.82 |
| | CHI3L1+IL10+Periostina | 0.90 |
| 10 | CHI3L1+PI3+Periostina | 0.80 |

4. Biomarcadores capaces de discriminar AA (Asmáticos Alérgicos) de Alérgicos (A).

| | <u>AUC</u> | |
|----|--------------------|------|
| 15 | IL8 | 0.88 |
| | Periostina | 0.8 |
| | SERPINB2 | 0.93 |
| | CHI3L1+SERPINB2 | 1 |
| | PI3+SERPINB2 | 0.96 |
| 20 | CHI3L1+IL8 | 0.91 |
| | CHI3L1+Periostina | 0.81 |
| | IL8+PI3+Periostina | 0.93 |

5. Biomarcadores capaces de discriminar AA (Asmáticos Alérgicos) graves de Alérgicos (A).

| | <u>AUC</u> | |
|----|--------------------|------|
| | IL8 | 0.80 |
| | Periostina | 0.77 |
| 30 | IL8+Periostina | 0.90 |
| | IL8+PI3+Periostina | 0.98 |

6. Biomarcadores capaces de discriminar AA (Asmáticos Alérgicos) Mod/leves de Alérgicos (A).

| | <u>AUC</u> |
|--------------|------------|
| IL8 | 0.96 |
| 5 Perióstina | 0.83 |
| SERPINB2 | 0.84 |
| PI3+SERPINB2 | 0.92 |

Reivindicaciones

1. Uso *in vitro* de los niveles de concentración del biomarcador proteico SERPINB2 en una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma para determinar el riesgo de padecer asma en un sujeto humano.
5
2. Método *in vitro* para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo entre distintos fenotipos de asma, que comprende: (a) medir el patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2, de los sujetos a seleccionar con un patrón o concentración ya establecido, donde diferencias de concentración de al menos la proteína SERPINB2 es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo entre distintos fenotipos de asma.
10
15
3. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica, que comprende: (a) medir el patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos controles sanos, donde un nivel de concentración reducido de al menos la proteína SERPINB2, es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica.
20
25
4. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma alérgica, que comprende: (a) medir el patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos controles sanos, donde un nivel de concentración
30

reducido de al menos la proteína SERPINB2, es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
5. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica intermitente o persistente leve/moderada de sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica grave, que comprende: (a) medir el patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2 y POSTN y/o PI3, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos que padecen de asma no alérgica grave, donde diferencias de concentración de al menos la proteína SERPINB2 y POSTN y/o PI3, es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos subfenotipos clínicos de asma no alérgica.

 6. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma alérgica intermitente o persistente leve/moderada de sujetos con riesgo de padecer asma alérgica grave, que comprende: (a) medir el patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2 y POSTN y/o PI3 y/o CHI3L1, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2 y POSTN y/o PI3 y/o CHI3L1, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos que padecen de asma alérgica grave, donde diferencias de concentración de al menos la proteína SERPINB2 y POSTN y/o PI3 y/o CHI3L1, es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer uno de dichos subfenotipos clínicos de asma alérgica.

 7. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica de sujetos con riesgo de padecer asma alérgica, que comprende: (a) medir el patrón o concentración de al menos la proteína SERPINB2 y opcionalmente periostina y CHI3L1 o PI3, PHLDA1 e IL8, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o concentración de al

menos la proteína SERPINB2 y opcionalmente periostina y CHI3L1 o PI3, PHLDA1 e IL8, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos que padecen asma alérgica, donde un nivel de concentración aumentado de al menos la proteína SERPINB2 en combinación con un nivel disminuido de las proteínas CHI3L1 o PI3, o en combinación con un nivel aumentado de la proteína PHLDA1, o en combinación con un nivel aumentado de la proteína IL8; es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma no alérgica; y

donde:

- a. un nivel de concentración reducido de al menos la proteína SERPINB2 y aumentadas de las proteínas CHI3L1 o PI3, o un nivel de concentración reducido de al menos la proteína SERPINB2 y de la proteína PHLDA1; o
- b. un nivel de concentración reducido de la proteína SERPINB2 y disminuido de periostina y aumentadas de las proteínas CHI3L1 o PI3, o un nivel de concentración reducido de la proteína SERPINB2 y disminuido de periostina y disminuido de la proteína PHLDA1;

es indicativa de que dicho sujeto presenta un riesgo de padecer asma alérgica.

8. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con riesgo de padecer asma no alérgica grave de Asmáticos Alérgicos (AA) graves, que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y PI3, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y PI3, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en asmáticos Alérgicos (AA) graves, donde un nivel de concentración aumentado de la proteína SERPINB2 y disminuido de PI3 con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo padezca de asma no alérgica grave; y donde un nivel de concentración disminuido de la proteína SERPINB2 y aumentado de PI3 con dicho patrón o nivel de expresión ya establecido es indicativa de riesgo de que el individuo padezca de asma alérgica grave.

9. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con asma alérgica de sujetos alérgicos sin asma que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y PI3 y/o CHI3L1, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y PI3 o CHI3L1, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos alérgicos sin asma, donde un nivel de concentración reducido de la proteína SERPINB2 y disminuido de PI3 o aumentado de CHI3L1 con dicho patrón o nivel de expresión es indicativa de que el individuo padece de asma alérgica.
10. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con asma alérgica intermitente o persisten leve/moderada de sujetos alérgicos sin asma que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y PI3, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y opcionalmente PI3, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos alérgicos sin asma, donde un nivel de concentración reducido de la proteína SERPINB2 y opcionalmente disminuido de PI3 con dicho patrón o nivel de expresión es indicativa de que el individuo padece de asma alérgica intermitente o persisten leve/moderada.
11. Método *in vitro* de acuerdo a la reivindicación 2, donde dicho método es para seleccionar sujetos con asma alérgica grave de sujetos alérgicos sin asma que comprende: (a) medir el patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y CHI3L1 y/o PI3 y/o Periostina y/o IL8, obtenidos a partir de una muestra biológica aislada de sangre, suero o plasma, de los sujetos a seleccionar; y (b) comparar dicho patrón o nivel de expresión de al menos la proteína SERPINB2 y y CHI3L1 y/o PI3 y/o Periostina y/o IL8, de los sujetos a seleccionar con un patrón o nivel de expresión ya establecido basado en sujetos alérgicos sin asma, donde un nivel de concentración reducido de la proteína SERPINB2 y disminuido de PI3 y/o aumentado de CHI3L1 y/o aumentado de periostina y/o disminuida de IL8 con dicho

patrón o nivel de expresión es indicativa de que el individuo padece de asma alérgica grave.

- 5 12. Método *in vitro* para el diagnóstico/pronóstico de un sujeto del que se sospecha que padece de asma, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 2 a 11, y opcionalmente (c) confirmar la presencia de un fenotipo determinado de asma y/o la gravedad de la enfermedad por medio de un examen clínico.
- 10 13. Método para obtener datos útiles para el diagnóstico/pronóstico *in vitro* de asma, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 2 a 11.
- 15 14. Método *in vitro* para clasificar sujetos como sujetos sanos o como sujetos que padecen asma o entre distintos fenotipos de la enfermedad, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 2 a 11.
- 20 15. Método *in vitro* para supervisar la respuesta a una terapia o para supervisar la progresión del asma, en un sujeto que padece de dicha enfermedad, que comprende las etapas a) y b) de cualquiera de los métodos de las reivindicaciones 2 a 11.
- 25 16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 14, donde el sujeto es un sujeto humano.
- 30 17. Uso de un *kit* que comprende reactivos que detectan biomarcadores para determinar un nivel de expresión diferencial de al menos la proteína SERPINB2 en una muestra biológica de sangre, suero o plasma, donde diferencias de expresión de la proteína SERPINB2 es indicativa de riesgo de tener asma, en particular distinguiendo la gravedad del asma, más particularmente distinguiendo entre distintos fenotipos de asma.

Figura 1: Análisis de Componentes Principales (PCA).

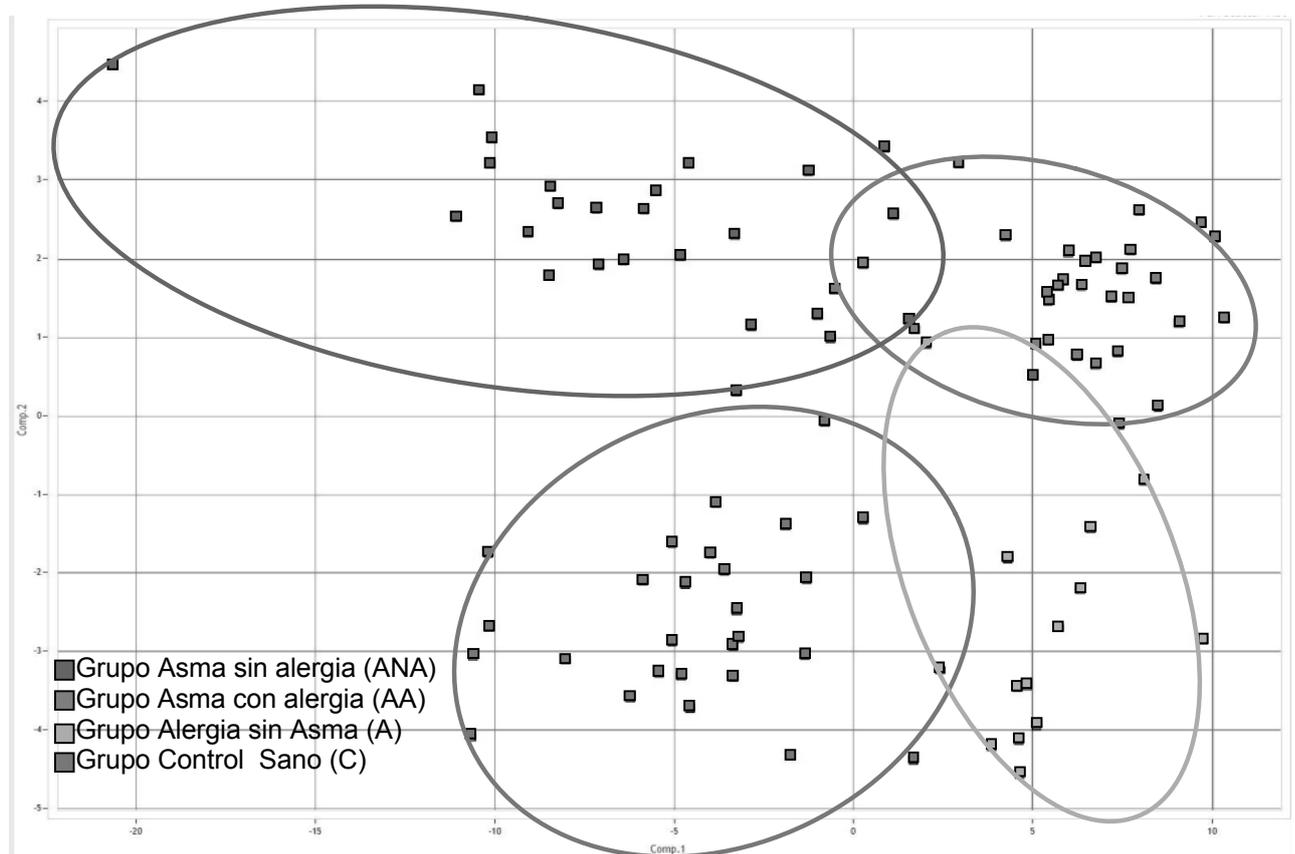


Fig. 2

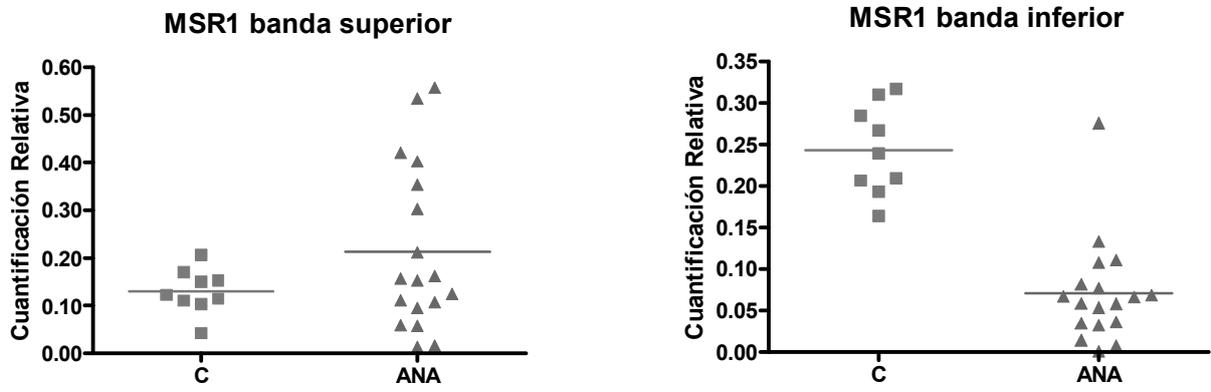


Fig. 3

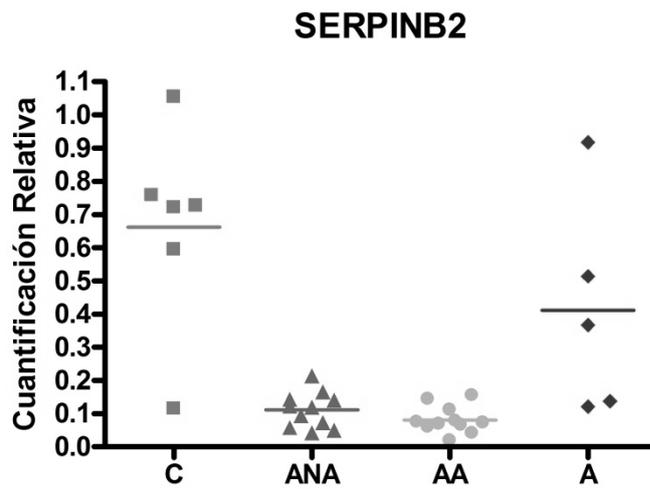


Fig. 4

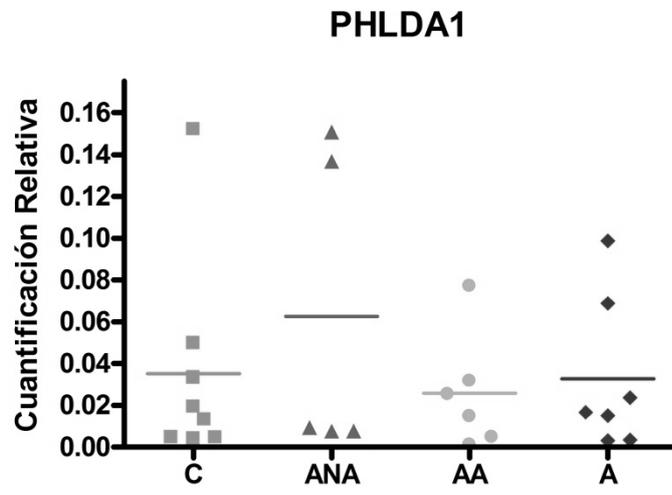
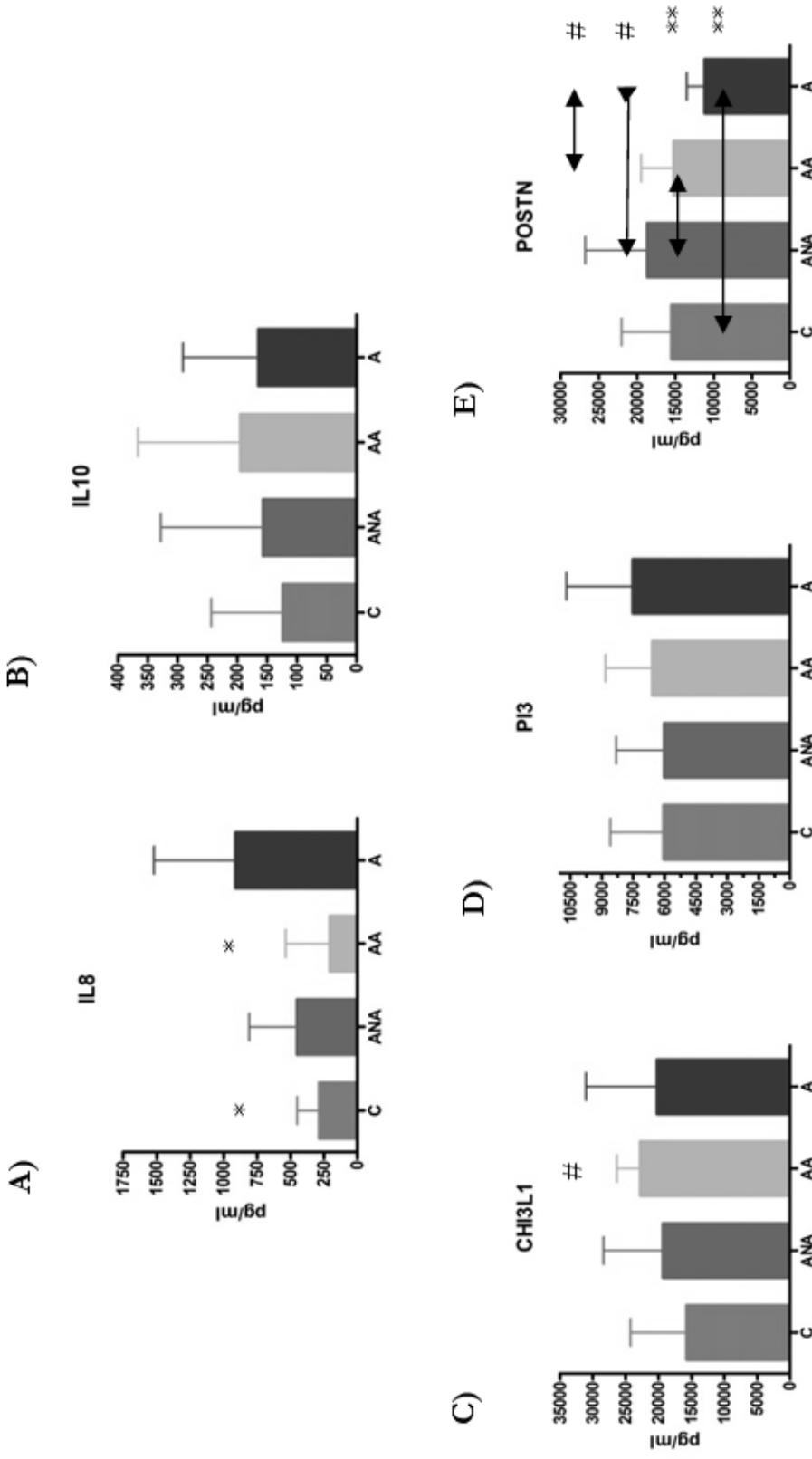


Fig. 5





②① N.º solicitud: 201730947

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.07.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|---|----------------------------|
| X | WOODRUFF PG <i>et al.</i> Genome-wide profiling identifies epithelial cell genes associated with asthma and with treatment response to corticosteroids. PNAS, 2007, Vol. 104(40), páginas 15858-15893, todo el documento. | 1, 2 |
| X | WO 2009124090 A1 (GENENTECH, INC. [US/US]; THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA [US/US]) 08/10/2009, página 3, párrafos [0010], [0011]; reivindicaciones 1-6. | 1, 2 |
| A | JIA G <i>et al.</i> Periostin is a systemic biomarker of eosinophilic airway inflammation in asthmatic patients. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012, Vol. 130(3), páginas 647- 654, página 647, abstract. | 1-16 |

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:

Fecha de realización del informe
18.01.2018

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/2

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, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EBI, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE PATENTS.