

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

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de noviembre de 2017 (16.11.2017) **WIPO | PCT**

(10) Número de publicación internacional
WO 2017/194814 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2017/070307

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Fecha de presentación internacional:
12 de mayo de 2017 (12.05.2017)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201630628 13 de mayo de 2016 (13.05.2016) ES

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, 41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** [ES/ES]; Avda. Medina Azahara, 5, 14004 Córdoba (ES).

(72) Inventores: **RODRÍGUEZ ARIZA, Antonio**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, S/N, 14004 Córdoba (ES). **LÓPEZ PEDRERA, Rosario**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, S/N, 14004 Córdoba (ES). **BARBARROJA PUERTO, Nuria**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, S/N, 14004 Córdoba (ES). **PÉREZ SÁNCHEZ, Carlos**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Hospital Universitario Reina Sofía, Av. Menéndez Pidal, S/N, 14004 Córdoba (ES).

(74) Mandatario: **FUSTER, Gustavo**; Paseo de la Castellana 140, 3ª Planta, EDIFICIO LIMA, 28046 Madrid (ES).

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: MICRO-RNAS AS BIOMARKERS FOR THE DIAGNOSIS OF LUNG CANCER

(54) Título: MICROARNs COMO BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PULMÓN

(57) Abstract: The invention relates to the use of micro-RNAs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b and mi RNA-17, for the diagnosis, classification and/or monitoring of lung cancer, a method for obtaining data that can be used for the diagnosis, classification and/or monitoring of a person who may have lung cancer, as well as a kit or device, and a microarray and uses of same.

(57) Resumen: Uso de los microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y mi ARN-17 para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón, método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón, kit o dispositivo, microarray y usos.



WO 2017/194814 A1

MicroARNs como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de pulmón**CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biología Molecular y la Medicina Clínica, y específicamente se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte en los países industrializados, ocupando el segundo lugar solamente por detrás de las enfermedades cardiovasculares. El tabaco es el principal factor de riesgo, siendo el causante del 85-90% de todos los casos. A pesar de su alta incidencia y mortalidad, presenta una baja prevalencia debido a que la mayoría de los casos son detectados en estadios tardíos, por lo que sería muy importante disponer de pruebas de diagnóstico capaces de detectar la enfermedad lo antes posible, así como el tipo de tumor y la invasividad del mismo para orientar el tratamiento.

El análisis de condensación del aire exhalado en la respiración es una prueba no invasiva en la que el aire exhalado entra en un sistema de refrigeración para condensarse. Este aire condensado contiene proteínas y microARNs, que pueden constituir marcadores de patologías respiratorias, incluyendo el cáncer de pulmón (Conrad *et al.*, 2008. *Gen. Intern. Med.* 23 Suppl. 1, 78-84. doi: 10.1007/s11606-007-0411-1).

Hay muy pocos estudios proteómicos en el condensado del aire exhalado, y en los existentes se han conseguido identificar un número relativamente bajo de proteínas (Gianazza *et al.*, 2004. *Am. J. Med.* 117(1), 51-54; Fumagalli *et al.*, 2008. *Int. J. Mol. Sci.* 13(11), 13894-13910; Kurova *et al.*, 2009. *Clin. Chem. Lab. Med.* 47(6), 706-712; Bloemen *et al.*, 2009. *Proteomics Clin. Appl.* 3(4), 498-504; Chang *et al.*, 2010. *Eur. Respir. J.* 35(5), 1182-1215; Bloemen *et al.*, 2010. *Biomarkers* 15(7), 583-93). Solamente en dos estudios más recientes (Fumagalli *et al.*, 2012. *Int. J. Mol. Sci.* 13(11), 13894-13910.; Bredberg *et al.*, 2012. *Clin. Chem.* 58(2), 431-440) se han conseguido identificar 44 y 124 proteínas diferentes, respectivamente. Sin embargo, ambos estudios analizaron "pools" de muestras, y no pacientes individuales. La gran mayoría de los estudios realizados hasta la fecha están relacionados con asma o con

otras enfermedades pulmonares, como la enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPOC), y únicamente el estudio de Chang y cols., analizó muestras de pacientes de cáncer de pulmón consiguiendo identificar 20 proteínas alteradas en todas las muestras analizadas (Chang *et al.*, 2010. *Eur. Respir. J.* 35(5), 1182-1215).

- 5 Los microARNs (miARN ó miR) son moléculas pequeñas de ARN, 20-25 nucleótidos, no codificantes para proteínas que regulan el procesamiento postranscripcional del ARN, mediante el apareamiento de bases con su ARN mensajero (ARNm) complementario, conduciendo a la represión de la transcripción o a la degradación del ARNm (Filipowicz *et al.*, 2008. *Nature Reviews Genetics*, 9(2),102-114). En la especie
- 10 humana se han identificado aproximadamente 2500 microARNs, habiéndose demostrado su participación clave en la regulación de muchos procesos celulares y, su alteración está asociada con el desarrollo de diferentes patologías, especialmente cáncer.

- Recientemente, se ha detectado la presencia de determinados microARNs en el esputo
- 15 de pacientes con cáncer de pulmón y ha sido relacionada con el tipo de cáncer, destacando su papel en la diagnóstico de la enfermedad (Xie *et al.*, 2010. *Lung Cancer*, 67 (2), 170-176; Yu *et al.*, 2010. *International Journal of Cancer*, 127 (12), 2870-2878). Los microARNs también se han aislado en condensado de aire exhalado (Puneet y Faoud, 2013. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3, 17-29).
- 20 En concreto elevados niveles de microARN-21 y microARN-486 se han encontrado diferencialmente expresados en condensado de aire exhalado de pacientes con cáncer de pulmón microcitico (Mozonni *et al.*, 2013. *Biomarkers.*, 18 (8), 679-686).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

- 25 Un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de los biomarcadores de microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17 para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón. En

- Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos
- 30 útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y/o miR-17 en una muestra biológica aislada de dicho individuo. Preferiblemente la muestra biológica es condensado de aire exhalado.

- 5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención además comprende:

b) calcular el índice A según la ecuación:

$$A = -0,083 + 0,172*(\text{miR-122}/\text{miR-29b}) + 0,009*(\text{miR-29b}/\text{miR-146}) - 0,038*(\text{miR-214}/\text{miR-146}) - 0,041*(\text{miR-193}/\text{miR-146}) + 0,004*(\text{miR-30}/\text{miR-146}) + 0,056*(\text{miR-146}/\text{miR-372}),$$

10

c) calcular el índice B según la ecuación:

$$B = 3,793 - 0,501*(\text{miR-17}/\text{miR-148}) + 0,167*(\text{miR-29b}/\text{miR-Let7c}) + 0,278*(\text{miR-214}/\text{miR-Let7c}) - 0,045*(\text{miR-148}/\text{miR-let7c}),$$

d) calcular el índice C según la ecuación:

$$C = 1,417 - 0,139*(\text{miR-17}/\text{miR-214}) + 0,05*(\text{miR-122}/\text{miR-148}) + 0,106*(\text{miR-214}/\text{miR-148}),$$

15

e) calcular el índice D según la ecuación:

$$D = 4,372 - 0,026*(\text{miR-17}/\text{miR-214}) - 0,049*(\text{miR-122}/\text{miR-214}) - 0,129*(\text{miR-29b}/\text{miR-214}) + 0,022*(\text{miR-214}/\text{miR-30})$$

20 y/o

f) calcular el índice E según la ecuación:

$$E = 16,12 - 0,630*(\text{miR-29b}/\text{miR-214}) + 0,157*(\text{miR-214}/\text{miR-30}),$$

asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

- 25 Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) según el primer método de la invención, y además comprende:

g) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón cuando el valor del índice A del paso (b) sea preferiblemente menor que 0,88, más preferiblemente menor que 0,75, y aún más preferiblemente menor que 0,579.

- 5 Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

10 h) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón de células no pequeñas de tipo adenocarcinoma y no epidermoide cuando el valor del índice B del paso (c) sea preferiblemente menor que 0,91, más preferiblemente menor que 0,72, y aún más preferiblemente menor que 0,50.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante cuarto método
15 de la invención, que comprende los pasos (a) y (d) según el primer método de la invención, y además comprende:

i) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón de tumor invasivo cuando el valor del índice C del paso (d) sea preferiblemente mayor que 0,30, más preferiblemente mayor que 0,39, y aún más preferiblemente
20 mayor que 0,65.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante quinto método de la invención, que comprende los pasos (a) y (e) según el primer método de la invención, y además comprende:

25 j) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón con metástasis cuando el valor del índice D del paso (e) sea preferiblemente mayor que 0,28, más preferiblemente mayor que 0,34, y aún más preferiblemente mayor que 0,45.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante sexto método
30

de la invención, que comprende los pasos (a) y (f) según el primer método de la invención, y además comprende:

k) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón en estadio 4 cuando el valor del índice E del paso (f) sea preferiblemente mayor que 0,18, más preferiblemente mayor que 0,39, y aún más preferiblemente mayor que 0,64.

En una realización preferida de cualquiera de los aspectos de la invención, la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de condensado de aire exhalado.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de los microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17, tal y como se han definido estos en el primer aspecto de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión los microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17, y donde:

- los cebadores o *primers* son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un

95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

- los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

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

Así, las sondas de oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos.

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

es la muestra a analizar: miARN, ARN mensajero, ARN total, un fragmento de PCR, etc.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de la invención presenta oligonucleótidos modificados, como se han descrito en el anterior aspecto de la invención.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención o del microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Diagrama de caja (Tukey) de la media de expresión ($\text{Ln}2^{-\text{Ct}}$) de cada miARN diferencialmente expresados entre control y cáncer.

Figura 2. Diagrama de caja (Tukey) de los ratios de miARNs diferencialmente expresados entre control y cáncer.

Figura 3. Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discrimina cáncer de control y curva ROC.

Ecuación resultante= $-0,083+0,172*(\text{miR-122}/\text{miR-29b})+0,009*(\text{miR-29b}/\text{miR-146})-0,038*(\text{miR-214}/\text{miR-146})-0,041*(\text{miR-193}/\text{miR-146})+0,004*(\text{miR-30}/\text{miR-146})+0,056*(\text{miR-146}/\text{miR-372})$

Figura 4. Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discriminan entre los tipos de tumor de células no pequeñas, Adenocarcinoma y Epidermoide. Ecuación resultante= $3,793-0,501*(\text{miR-17}/\text{miR-148})+0,167*(\text{miR-29b}/\text{miR-Let7c})+0,278*(\text{miR-214}/\text{miR-Let7c})-0,045*(\text{miR-148}/\text{miR-Let7c})$

Figura 5. Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discriminan entre invasividad o no del tumor.

Ecuación resultante= $1,417-0,139*(\text{miR-17}/\text{miR-214})+0,05*(\text{miR-122}/\text{miR-148})+0,106*(\text{miR-214}/\text{miR-148})$

Figura 6. Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discriminan entre la presencia o ausencia de metástasis.

Ecuación resultante= $4,372-0,026*(\text{miR-17}/\text{miR-214})-0,049*(\text{miR-122}/\text{miR-214})-0,129*(\text{miR-29b}/\text{miR-214})+0,022*(\text{miR-214}/\text{miR-30})$

5 **Figura 7.** Modelo de combinación de los ratios de microARNs que discriminan entre el estadio 3 y 4 del tumor.

Ecuación resultante= $16,12-0,630*(\text{miR-29b}/\text{miR-214})+0,157*(\text{miR-214}/\text{miR-372})$

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han analizado los niveles de microARNs en
10 muestras de aire exhalado de pacientes con cáncer de pulmón en comparación con otros pacientes sanos y con diferentes factores de riesgo. Los resultados indican que los microARNs presentes en el aire exhalado pueden ser usados como marcadores de un sistema diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón.

BIOMARCADORES DE LA INVENCION

15 Por tanto, un **primer aspecto** de la invención se refiere al uso de los biomarcadores de microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17, o cualquiera de sus combinaciones, para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante biomarcadores de la invención. En una realización preferida, el uso de los microARNs
20 es simultáneo.

Los biomarcadores de la invención pueden usarse simultáneamente, por separado o en cualquier combinación de los mismos para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, se utilizan conjuntos de
25 ratios entre los biomarcadores de la invención para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón. Preferiblemente, los conjuntos de ratios formados entre biomarcadores de la invención para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón usados son:

- miR-122/miR-29b, miR-29b/miR-146, miR-193/miR-146, miR-146/miR-372, miR-214/miR-146 y/o miR-30/miR-146,
- 30

- miR-17/miR-148, miR-29b/miR-let7c, miR-214/miR-let7c y/o miR-148/ miR-let7c,
- miR-17/miR-214, miR-122/miR-148 y/o miR-214/miR-148,
- miR-17/miR-214, miR-122/miR-214, miR-29b/miR-214 y/o miR-214/miR-30,
- miR-29b/miR-214 y/o miR-214/miR-372

5 El término "microARN" se refiere a ARN monocatenario de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, no codificantes para proteínas y generados de transcritos endógenos que pueden formar estructuras en forma de horquilla (Lee *et al.*, 2004. *Embo. Journal*, 23 (20), 4051-4060). Los microARNs conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares y del
10 desarrollo en eucariotas, cumpliendo una gran cantidad de funciones. Se estima que el 30% de todos los genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de microARNs (Rajewsky N. 2006. *Nature Genetics*, 38, Suppl: S8-13) y que un solo microARN puede regular alrededor de 200 diferentes transcritos que pueden funcionar en diferentes vías en la célula (Krek *et al.*, 2005, *Nature Genetics*, 37 (5), 495-500), así
15 como que un mismo ARNm puede ser regulado por múltiples microARNs (Cai *et al.*, 2009. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 7 (4), 147-154).

El término "cáncer" pretende incluir cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizada por el crecimiento descontrolado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres y condiciones neoplásicas conocidos, caracterizados como
20 malignos, benignos, tejido blandos o sólidos, y cánceres de todos los estadios y grados, incluyendo cánceres premetastásicos y postmetastásicos. Entre los ejemplos de diferentes tipos de cáncer se incluye, el cáncer de pulmón. Tal como se utiliza en la presente memoria, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

Los principales tipos de cáncer de pulmón son el cáncer de pulmón de células no
25 pequeñas (de inglés *Non-small cell lung cancer* (NSCLC)) ($\approx$ 85% de todos los cánceres de pulmón) y el cáncer de pulmón de células pequeñas (del inglés *Small cell lung cancer* (SCLC)) ($\approx$ 15%). El cáncer de pulmón de células no pequeñas se puede dividir en tres grandes subtipos histológicos:

- Carcinoma de células escamosas, que supone del 25 al 30% de NSCLC.
30 Este tipo es generalmente encontrado cerca de los bronquios, hacia el centro de la cavidad torácica (del pecho). Es también conocido como carcinoma epidermoide y está usualmente asociado a la exposición al humo de tabaco.

- Adenocarcinoma: conforma el 40% de todos los NSCLC. Este tipo de cáncer se encuentra generalmente en las regiones más externas del pulmón. También existe una forma rara de adenocarcinoma, llamado carcinoma broncoalveolar (*Bronchioalveolar Carcinoma* (BAC)) que se está viendo con mayor frecuencia a nivel mundial. BAC se disemina a lo largo de todo el pulmón a diferencia de otros tipos de cáncer de pulmón más comunes que forman tumores únicos. Se desconoce la causa del BAC. A pesar de presentarse en persona que fuman, generalmente se da en aquellas que nunca han fumado.
- Carcinoma de Células Grandes: conforma del 10% al 15% de NSCLC. Es de crecimiento rápido y puede aparecer en cualquier parte del pulmón., el cáncer de pulmón.

El tratamiento para cáncer de pulmón se basa en el tipo y estadio del cáncer. Los tratamientos, aunque sin limitarnos, pueden incluir: cirugía para remover el tumor, quimioterapia (medicamentos que matan o reducen el tamaño del tumor) o radiación (rayos X que destruyen o dañan las células cancerosas).

MÉTODOS DE LA INVENCION

Un **segundo aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

- a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo,
- a') cuantificar el producto de expresión del miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y/o miR-17,
- o alternativamente,

- a) cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y/o miR-17 en una muestra biológica aislada de dicho individuo. Preferiblemente la muestra biológica es condensado de aire exhalado.

Aunque preferiblemente se cuantifica el producto de expresión de los 11 microARNs simultáneamente, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o

seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón, la detección de cualquiera de ellos y, preferiblemente de las ratios: miR-122/miR-29b, miR-29b/miR-146, miR-193/miR-146, miR-146/miR-372, miR-214/miR-146, miR-30/miR-146, miR-17/miR-148, miR-29b/miR-let7c, miR-214/miR-let7c, miR-148/ miR-let7c, miR-17/miR-214, miR-122/miR-148, miR-214/miR-148, miR-17/miR-214, miR-122/miR-214, miR-29b/miR-214, miR-214/miR-30, miR-29b/miR-214 y/o miR-214/miR-372 resulta informativo.

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

La cuantificación del producto de expresión de los microARNs, o la detección de la expresión de sus correspondientes genes, puede realizarse por cualquiera de los métodos conocidos en el estado de la técnica. Preferiblemente, la cuantificación se realiza mediante PCR a tiempo real (Q-RT-PCR).

La medida de los niveles de expresión de un gen, preferiblemente de manera cuantitativa, está basada en una señal que se obtiene directamente de los transcritos de dichos genes (ARNm, microRNA, etc.), y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de ARN producidas por los genes. Dicha señal – a la que también podemos referirnos como señal de intensidad – puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de dichos productos. Por otro lado, se podría realizar mediante medida indirecta que se refiere a la medida obtenida de un componente secundario o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

La técnica preferiblemente utilizada es la llamada reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Según esta técnica, utilizando oligonucleótidos, enzimas, cebadores y solución tampón, se amplifica de forma exponencial un fragmento de ADN original. Esta técnica es llevada a cabo en un aparato llamado termociclador que mantiene la temperatura necesaria en cada una de las etapas que conforman un ciclo. La detección en tiempo real se basa en la utilización de marcadores fluorescentes (sondas) que se unen a todas las secuencias de doble cadena de ADN formadas en los ciclos de la reacción de PCR. Una vez que el marcador se une al ácido nucleico de

doble cadena, éste emite una señal fluorescente que se procesa en tiempo real (Walter *et al.*, 2002, *Science*, 296, 557-559). El ciclo al cual la emisión de la intensidad del marcador fluorescente supera un umbral determinado es llamado Ct. Los niveles de expresión de un microARN son calculados como 2^{-Ct} .

- 5 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el primer método de la invención además comprende:

b) calcular el índice A según la ecuación:

$$A = -0,083 + 0,172*(\text{miR-122}/\text{miR-29b}) + 0,009*(\text{miR-29b}/\text{miR-146}) - 0,038*(\text{miR-214}/\text{miR-146}) - 0,041*(\text{miR-193}/\text{miR-146}) + 0,004*(\text{miR-30}/\text{miR-146}) + 0,056*(\text{miR-146}/\text{miR-372})$$

c) calcular el índice B según la ecuación:

$$B = 3,793 - 0,501*(\text{miR-17}/\text{miR-148}) + 0,167*(\text{miR-29b}/\text{miR-Let7c}) + 0,278*(\text{miR-214}/\text{miR-Let7c}) - 0,045*(\text{miR-148}/\text{miR-let7c})$$

d) calcular el índice C según la ecuación:

$$C = 1,417 - 0,139*(\text{miR-17}/\text{miR-214}) + 0,05*(\text{miR-122}/\text{miR-148}) + 0,106*(\text{miR-214}/\text{miR-148})$$

e) calcular el índice D según la ecuación:

$$D = 4,372 - 0,026*(\text{miR-17}/\text{miR-214}) - 0,049*(\text{miR-122}/\text{miR-214}) - 0,129*(\text{miR-29b}/\text{miR-214}) + 0,022*(\text{miR-214}/\text{miR-30})$$

20 y/o

f) calcular el índice E según la ecuación:

$$E = 16,12 - 0,630*(\text{miR-29b}/\text{miR-214}) + 0,157*(\text{miR-214}/\text{miR-30})$$

asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

- 25 De esta manera, para el cálculo de los índices de la invención A-E hay que considerar que el valor de los cocientes entre los biomarcadores de microARNs (miRX/miRY) se obtiene mediante el $\log_2(2^{-CtX}/2^{-CtY})$, donde miRX o X se refiere al microARN indicado en el numerador y miRY o Y indicado microARN en el denominador.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos (a) y (b) según el primer método de la invención, y además comprende:

- 5 g) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón cuando el valor del índice A del paso (b) sea preferiblemente menor que 0,88, más preferiblemente menor que 0,75, y aún más preferiblemente menor que 0,579.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante tercer método
10 de la invención, que comprende los pasos (a) y (c) según el primer método de la invención, y además comprende:

- h) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón de células no pequeñas de tipo adenocarcinoma y no epidermoide cuando el
valor del índice B del paso (c) sea preferiblemente menor que 0,91, más
15 preferiblemente menor que 0,72, y aún más preferiblemente menor que 0,50.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante cuarto método
de la invención, que comprende los pasos (a) y (d) según el primer método de la
invención, y además comprende:

- 20 i) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón de tumor invasivo cuando el valor del índice C del paso (d) sea preferiblemente mayor que 0,30, más preferiblemente mayor que 0,39, y aún más preferiblemente mayor que 0,65.

En esta memoria se entiende por “cáncer o tumor invasivo” o “infiltrante” al cáncer que
25 se disemina más allá de la capa de tejido en la que se inició y crece o progresa en tejidos sanos que la rodean. También se podría definir como la migración y la penetración directa de las células del cáncer en los tejidos vecinos.

Un **sexto aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante quinto método
30 de la invención, que comprende los pasos (a) y (e) según el primer método de la invención, y además comprende:

j) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón con metástasis cuando el valor del índice D del paso (e) sea preferiblemente mayor que 0,28, más preferiblemente mayor que 0,34, y aún más preferiblemente mayor que 0,45.

- 5 El término “metástasis” se refiere a la capacidad de las células del cáncer de penetrar en los vasos sanguíneos y linfáticos, circular a través de de los mismos, y establecerse o crecer en tejidos normales de otra parte del cuerpo.

Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, de ahora en adelante sexto método
10 de la invención, que comprende los pasos (a) y (f) según el primer método de la invención, y además comprende:

k) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón en estadio 4 cuando el valor del índice E del paso (f) sea preferiblemente mayor que 0,18, más preferiblemente mayor que 0,39, y aún más preferiblemente
15 mayor que 0,64.

La “etapa o estadio” de un cáncer describe el grado de propagación de la enfermedad. Así, en el estadio 1 o T1: el tumor no mide más de 3 centímetros (cm), no ha alcanzado las membranas que rodean los pulmones (pleura visceral), y no afecta las ramas principales de los bronquios. En el estadio 2 o T2, el tumor presenta una o más de las
20 siguientes características: a) Mide más de 3 cm, pero no mide más de 7 cm, b) Involucra a un bronquio principal, pero está a más de 2 cm de la carina (el punto donde la tráquea se divide en los bronquios principales izquierdo y derecho), c) ha crecido hacia el interior de las membranas que rodean a los pulmones (pleura visceral), d) el tumor obstruye parcialmente las vías respiratorias, pero esto no ha causado el colapso
25 de todo el pulmón ni la aparición de neumonía. En el estadio 3 o T3 el tumor presenta una o más de las siguientes características: a) su tamaño es mayor de 7 cm, b) ha crecido hacia el espesor de la pared del tórax, el músculo que separa el tórax del abdomen (diafragma), las membranas que rodean el espacio entre los dos pulmones (pleura mediastinal), o a las membranas del saco que rodea el corazón (pericardio
30 parietal), c) el cáncer crece en un bronquio principal y está a menos de 2 cm de la carina, pero no afecta la carina en sí, d) ha crecido hacia el interior de las vías respiratorias lo suficiente como para causar el colapso total de un pulmón o neumonía en la totalidad del pulmón o e) dos o más nódulos tumorales separados se encuentran

presentes en el mismo lóbulo de un pulmón. Un tumor de pulmón en estadio 4 o T4 presenta una o mas de las siguientes características: a) ha crecido hacia el espacio que existe entre los pulmones (mediastino), el corazón, los vasos sanguíneos grandes cercanos al corazón (tal como la aorta), la tráquea, el tubo que conecta la garganta con el estómago (esófago), la columna vertebral o la carina y/o b) dos o más nódulos tumorales separados se encuentran en lóbulos diferentes del mismo pulmón

En una realización preferida de cualquiera de los aspectos de la invención, la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de condensado de aire exhalado.

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarnos a, células, tejidos y/o fluidos biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. Preferiblemente, la muestra biológica aislada del paso (a) es condensado de aire exhalado.

Los métodos de la invención pueden desarrollarse independientemente o conjuntamente, en cualquier combinación de los mismos.

Los pasos (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g), (h), (i), (j) y/o (k) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la cuantificación del paso (a) o el cálculo computarizado de cualquiera de los índices de los pasos (b), (c), (d), (e) y/o (f) o la clasificación computarizada en los pasos (g), (h), (i), (j) y/o (k).

KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCION, MICROARRAY DE LA INVENCION Y USOS

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios para detectar los niveles de expresión de los microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17, tal y como se han definido estos en el primer aspecto de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión los microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17, y donde:

- los cebadores o *primers* son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente

- de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%,
- 5 con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.
- 10 - las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un
- 15 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.
- 20 - los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21,
- 25 SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, los anticuerpos están modificados. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el anticuerpo es humano, humanizado o sintético. En otra realización preferida, el anticuerpo es monoclonal y/o se encuentra marcado con un fluorocromo.

30 Preferiblemente, el fluorocromo se selecciona de la lista que comprende Fluoresceína (FITC), Tetrametilrodamina y derivados, Ficoeritrina (PE), PerCP, Cy5, Texas, alofococianina, o cualquiera de sus combinaciones.

Tabla 1. microARNs de la invención.

Nombre del gen	Gen ID	Nombre del miARN	Secuencia del gen	Secuencia del miARN
microARN 146 (<i>MIR146A</i>)	406938	hsa-miR-146a-5p	SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 13
microARN 122 (<i>MIR122</i>)	406906	hsa-miR122-5p	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 14
microARN 148a (<i>MIR148A</i>)	406940	hsa-miR148a-3p	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 15
microARN 214 (<i>MIR214</i>)	406996	hsa-miR214-3p	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 16
microRNA372 (<i>MIR372</i>)	442917	hsa-miR372	SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 17
microRNA let-7c (<i>MIRLET7C</i>)	406885	hsa-miRlet7c	SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 18
microRNA 30c (<i>MIR30C</i>)	407031 407032	hsa-miR30c-5p	SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 19
microRNA 19A (<i>MIR19A</i>)	406979	hsa-miR19a-3p	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 20
microRNA 193b (<i>MIR193B</i>)	574455	hsa-miR193b-3p	SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 21
microRNA	407024	hsa-miR29b-3p	SEQ ID NO: 11	SEQ ID NO: 22

29b-1 (<i>MIR29B1</i>)				
microRNA17 (<i>MIR17</i>)	406952	hsa-miR17-5p	SEQ ID NO: 12	SEQ ID NO: 23

En el contexto de la presente invención, los genes *MIR146A*, *MIR122*, *MIR148A*, *MIR214*, *MIR372*, *MIRLET7C*, *MIR30C*, *MIR19A*, *MIR193B*, *MIR29B1* y *MIR17* se definen también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la

5 secuencia codificante de los microARNs recogidas respectivamente en las SEQ ID recogidas en la tabla 1, y que comprendería a diversas variantes procedentes de:

a) moléculas de ácido nucleico que codifican un microARN que comprende la secuencia nucleotídica de la SEQ ID recogidas en la tabla 1,

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

10

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un microARN que comprende la secuencia nucleotídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un

15 98% o un 99% con las SEQ ID recogidas en la tabla 1, respectivamente, y en las que el microARN codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de los microARNs *MIR146A*, *MIR122*, *MIR148A*, *MIR214*, *MIR372*, *MIRLET7C*, *MIR30C*, *MIR19A*, *MIR193B*, *MIR29B1* y *MIR17*. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra las recogidas en las SEQ ID indicadas en la

20 tabla1.

Secuencias de la invención:

SEQ ID NO: 1:

CCGATGTGTATCCTCAGCTTTGAGAACTGAATTCCATGGGTTGTGTCAGTGTCAGA
CCTCTGAAATTCAGTTCTTCAGCTGGGATATCTCTGTTCATCGT

25 SEQ ID NO: 2:

CCTTAGCAGAGCTGTGGAGTGTGACAATGGTGTGTTGTGTCTAAACTATCAAACGCC
ATTATCACACTAAATAGCTACTGCTAGGC

SEQ ID NO: 3:

5 GAGGCAAAGTTCTGAGACACTCCGACTCTGAGTATGATAGAAGTCAGTGCACTACA
GAACTTTGTCTC

SEQ ID NO: 4:

GGCCTGGCTGGACAGAGTTGTCATGTGTCTGCCTGTCTACACTTGCTGTGCAGAA
CATCCGCTCACCTGTACAGCAGGCACAGACAGGCAGTCACATGACAACCCAGCCT

SEQ ID NO: 5:

10 GTGGGCCTCAAATGTGGAGCACTATTCTGATGTCCAAGTGGAAGTGCTGCGACA
TTTGAGCGTCAC

SEQ ID NO: 6:

15 GCATCCGGGTTGAGGTAGTAGGTTGTATGGTTTAGAGTTACACCCTGGGAGTTAAC
TGTACAACCTTCTAGCTTTCCTTGGAGC

SEQ ID NO: 7:

ACCATGCTGTAGTGTGTGTAAACATCCTACACTCTCAGCTGTGAGCTCAAGGTGGC
TGGGAGAGGGTTGT TTAATCCTTCTGCCATGGA

SEQ ID NO: 8:

20 AGATACTGTAAACATCCTACACTCTCAGCTGTGGAAGTAAGAAAGCTGGGAGAAG
GCTGTTTACTCTTTCT

SEQ ID NO: 9:

GCAGTCCTCTGTTAGTTTTGCATAGTTGCACTACAAGAAGAATGTAGTTGTGCAAAT
CTATGCAAACTGATGGTGGCCTGC

25 SEQ ID NO: 10:

GTGGTCTCAGAATCGGGGTTTTGAGGGCGAGATGAGTTTATGTTTTATCCAACTGG
CCCTCAAAGTCCCG CTTTTGGGGTCAT

SEQ ID NO: 11:

CTTCAGGAAGCTGGTTTCATATGGTGGTTTAGATTAAATAGTGATTGTCTAGCACC
ATT TGAAATCAGTGTTCTTGGGGG

SEQ ID NO: 12:

5 GTCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAGTGATATGTGCATCTACTGCA
GTGAAGGCACTTGTAGCATTATGGTGAC

SEQ ID NO: 13:

UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU

SEQ ID NO: 14:

10 UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG

SEQ ID NO: 15:

UCAGUGCACUACAGAACUUUGU

SEQ ID NO: 16:

ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU

15 SEQ ID NO: 17:

CCUCAAAUGUGGAGCACUAUUCU

SEQ ID NO: 18:

UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU

SEQ ID NO: 19:

20 UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC

SEQ ID NO: 20:

AGUUUUGCAUAGUUGCACUACA

SEQ ID NO: 21:

CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA

SEQ ID NO: 22:

UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU

SEQ ID NO: 23:

CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG

- 5 El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc.

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

El kit de la invención puede incluir controles positivos y/o negativos. El kit además puede contener, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las
15 proteínas, etc.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el kit o dispositivo de la invención es un kit de partes, que comprende un componente A, formado por un dispositivo para la recogida de la muestra del paso a), y un componente B, formado por los elementos necesarios para llevar a cabo el análisis cuantitativo en la muestra del
20 paso a) o cualquiera de los métodos de la invención.

En una realización preferida el kit o dispositivo de la invención comprende oligonucleótidos. En otra realización preferida, los oligonucleótidos presentan modificaciones en alguno de sus nucleótidos, como por ejemplo, pero sin limitarnos a, nucleótidos que tengan alguno de sus átomos con un isótopo radiactivo, normalmente
25 ³²P o tritio, nucleótidos marcados inmunológicamente, como por ejemplo con una molécula de digoxigenina, y/o inmovilizadas en una membrana. Varias posibilidades son conocidas en el estado de la técnica.

Un **noveno aspecto** de la invención se refiere a un microarray, de ahora en adelante
30 microarray de la invención, que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal

único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

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

Así, las sondas de oligonucleótidos pueden ser de entre 10 y 100 nucleótidos, más preferiblemente, de entre 20 y 70 nucleótidos, y aún más preferiblemente, de entre 24 y 30 nucleótidos.

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

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el microarray de la invención presenta oligonucleótidos modificados, como se han descrito en el anterior aspecto de la invención.

Un **décimo aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención o del microarray de la invención, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón.

La invención se extiende también a programas de ordenador adaptados para que cualquier medio de procesamiento pueda llevar a la práctica los métodos de la invención. Tales programas pueden tener la forma de código fuente, código objeto, una fuente intermedia de código y código objeto, por ejemplo, como en forma parcialmente

compilada, o en cualquier otra forma adecuada para uso en la puesta en práctica de los procesos según la invención. Los programas de ordenador también abarcan aplicaciones en la nube basadas en dicho procedimiento.

Un **décimo primer aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador que comprende instrucciones de programa para hacer que un ordenador lleve a la práctica el procedimiento de acuerdo con cualquiera de los métodos de la invención.

En particular, la invención abarca programas de ordenador dispuestos sobre o dentro de una portadora. La portadora puede ser cualquier entidad o dispositivo capaz de soportar el programa. Cuando el programa va incorporado en una señal que puede ser transportada directamente por un cable u otro dispositivo o medio, la portadora puede estar constituida por dicho cable u otro dispositivo o medio. Como variante, la portadora podría ser un circuito integrado en el que va incluido el programa, estando el circuito integrado adaptado para ejecutar, o para ser utilizado en la ejecución de, los procesos correspondientes.

Por ejemplo, los programas podrían estar incorporados en un medio de almacenamiento, como una memoria ROM, una memoria CD ROM o una memoria ROM de semiconductor, una memoria USB, o un soporte de grabación magnética, por ejemplo, un disco flexible o un disco duro. Alternativamente, los programas podrían estar soportados en una señal portadora transmisible. Por ejemplo, podría tratarse de una señal eléctrica u óptica que podría transportarse a través de cable eléctrico u óptico, por radio o por cualesquiera otros medios.

Un **décimo segundo aspecto** de la invención se refiere a un medio de almacenamiento legible por un ordenador que comprende instrucciones de programa capaces de hacer que un ordenador lleve a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

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

Una “secuencia de ácido nucleico o polinucleótido” puede comprender las cinco bases que aparecen biológicamente (adenina, guanina, timina, citosina y uracilo) y/o bases distintas de las cinco que aparecen biológicamente. Estas bases pueden servir para distintos propósitos, por ejemplo, para estabilizar o desestabilizar la hibridación; para

estimular o inhibir la degradación de la sonda; o como puntos de unión para restos detectables o restos de apantallamiento. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede contener uno o más restos de base modificados, no estándar, derivatizados, incluyendo, pero sin limitarse a, N⁶-metil-adenina, N⁶-terc-butil-bencil-adenina, imidazol, imidazoles sustituidos, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N⁶-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo (es decir, timina), éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w, 2,6-diaminopurina, y 5-propinil pirimidina. Otros ejemplos de restos de bases modificados, no estándar, o derivatizados pueden encontrarse en las Patentes de EEUU Nos. 6.001.611; 5.955.589; 5.844.106; 5.789.562; 5.750.343; 5.728.525; y 5.679.785. Además, una secuencia de ácido nucleico o polinucleótido puede comprender uno o más restos de azúcares modificados incluyendo, pero sin limitarse a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y una hexosa.

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

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

En la presente invención se entiende por variante o fragmento biológicamente activo, aquellas variantes o fragmentos de los péptidos indicados que tienen un efecto fisiológico, metabólico o inmunológico igual, o presentan la misma utilidad que los descritos. Esto es, son funcionalmente equivalentes. Dichos efectos se pueden determinar mediante métodos convencionales.

El término "identidad", tal y como se utiliza en esta memoria, hace referencia a la proporción de nucleótidos o aminoácidos idénticos entre dos secuencias nucleotídicas o aminoacídicas que se comparan. Los métodos de comparación de secuencias son conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el programa GAG, incluyendo GAP (Devereux *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12: 287 (1984) *Genetics Computer Group University of Wisconsin, Madison, (WI)*; BLAST, BLASTP o BLASTN, y FASTA (Altschul *et al.*, 1999. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410).

El término "individuo" o "sujeto", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a un animal, preferiblemente a un mamífero, y más preferiblemente a un ser humano. El término "individuo" en esta memoria, es sinónimo de "paciente", y no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física. El individuo puede ser cualquiera, un individuo predispuesto a una enfermedad (por ejemplo, cáncer de pulmón) o un individuo que padece dicha enfermedad.

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

EJEMPLO DE LA INVENCION

El objeto de esta patente es la utilización de los niveles de microARNs circulantes en condensado de aire exhalado como biomarcadores para la detección de cáncer de pulmón.

Para ello se aisló ARN mediante miRNAeasy serum/plasma kit (qiagen) de 200 µl de aire exhalado de vías inferiores de 127 sujetos, divididos en 4 grupos:

- Grupo I: 32 Pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón con distintos estadios de la enfermedad, procedentes del servicio de Oncología del Hospital Reina Sofía, Córdoba
- Grupo II: 31 Pacientes diagnosticados con EPOC procedentes del Servicio de Neumología del Hospital Reina Sofía, Córdoba.

- Grupo III: 32 Controles sanos con Factor de riesgo, siendo fumadores o ex fumadores procedentes del servicio de Medicina Interna del Hospital Reina Sofía, Córdoba.
- Grupo IV: 32 Sujetos sanos, procedentes del Servicio de Medicina Interna del Hospital Reina Sofía, Córdoba.

El ARN total de las muestras incluyendo la fracción de los microARNs se aisló a partir de 200 µl de aire exhalado condensado utilizando el kit QIAzol miRNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los 200 µl de aire exhalado se incubaron con 1 ml de QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) para inhibir la función de las enzimas ARNasas. El protocolo se realizó siguiendo exhaustivamente las recomendaciones del fabricante. Finalmente, el ARN aislado se diluyó en 14 µl de agua libre de ARNasas y se guardó a -80°C.

Se realizó un PCR array de microARNs (miScript miRNA PCR array cancer, Quiagen; siguiendo las instrucciones del fabricante) descritos en distintos tipos de tumores: cerebral, colon, gástrico, cabeza, cuello, hígado, riñón, linfoma, pancreático, próstata, piel, ovario, pecho y útero. Con esta técnica se evaluó la expresión de 84 microARNs en aire exhalado de vías inferiores de un pool de 17 controles sanos y 17 pacientes con cáncer (Grupo I y grupo IV).

Una vez realizado el array y obtenidas las Cts, los resultados de la PCR fueron normalizados con dos *housekeepings* diferentes:

- Tomando como referencia el valor del microARN sintético Cel-miRNA-39.
- Tomando de referencia el valor del gen SNORD68 que se expresaba de manera constitutiva en nuestras muestras.

Los niveles de expresión relativa se calcularon según el método de 2^{-Ct} . Utilizando un punto de corte de 2 veces de cambio (2-Fold change), observamos que 40 microARNs estaban incrementados y 9 reducidos en las muestras de cáncer comparadas con los sujetos sanos. Los resultados mostraron que 11 microARNs se expresaban solamente en los pacientes con tumor o se hallaban incrementados en cáncer; en todos ellos las veces de cambio de expresión respecto al control eran mayores de 10. Algunos de estos microARN se han descrito en orina y plasma de pacientes con cáncer de pulmón, otros se han descrito en otros tipos de tumores, pero ninguno en aire exhalado.

La expresión de estos 11 microARNs se validó mediante RT-PCR de forma independiente en cada sujeto de los cuatro grupos: casos, controles sin factor de

riesgo, controles con factor de riesgo y EPOC. Los 11 microARNs analizados fueron: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17.

Para realizar las PCRs, la metodología seguida es la que comprende TaqMan
5 MicroRNA Assay kit (Applied Biosystem), estandarizada en nuestro grupo y la que se encuentra en la mayoría de las publicaciones relacionadas con microARNs. El protocolo consiste en una primera retrotranscripción (RT) del 11 ng de ARN (cuantificado en el nanodrop) con *stem-loop primers* específicos de microARNs, seguida de una *real-time* PCR con sondas TaqMan específicas para cada microARN
10 que se pretenda amplificar.

Cada reacción de retrotranscripción se realizó en 15 µl conteniendo 1,5 µl de 10 X RT buffer 1, 0,2 µl de inhibidor de ARNasas (20 U/ml), 0,15 µl de 100 mmol/L de “deoxynucleoside triphosphates”, 1 µl de 50 U/µl MultiScribe transcriptasa inversa, 1,5 µl de cada RT primers (4 miARN RT primers/reacción de RT), 11 ng de ARN y agua
15 libre de ARNasas. La reacción se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied BioSystems) a 16°C durante 30 minutos, 42°C durante 30°C y 85°C 5 minutos. Cada preamplificación se hizo con una mezcla de 4 sondas de 4 microARNs. Así realizamos 3 preamplificaciones para realizar posteriormente las PCRs de los 11 microARNs seleccionados.

Después se procedió con la reacción de preamplificación. Para ello, 2,5 µl de producto de RT diluido (2.5 µl en 10 µl de agua libre de ARNasas) se combinó con 5 µl de PCR Master Mix Taqman 2x, No AmpErase UNG y 2,5 µl de un pool de 4 primers Taqman miRNA assay (0.2x). La reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied BioSystems) a 95°C durante 10 minutos, más 20 ciclos a 95°C
25 durante 15 segundos y 60°C durante 4 minutos.

Posteriormente el producto de preamplificación se diluyó en 60 µl de agua libre de ARNasas para proceder a la reacción de PCR. 4 µl de este producto de preamplificación y se combinó con 5 µl de Taqman 2x Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG, con 0,5 µl del primer específico 20X Taqman miRNA Assay y 0,5 µl de
30 agua destilada. La PCR se realizó en el termociclador de Roche LightCycler 480 a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min. Los niveles de expresión de los miARNs se calcularon utilizando el método 2^{-Ct}

Así se realizó las PCRs de estos 11 microARNs en las muestras de aire exhalado de vías inferiores de 127 sujetos, se procedió al análisis de estos resultados.

Teniendo en cuenta la ausencia de un método establecido de normalización de datos de expresión de microARNs circulantes, el análisis se llevó a cabo teniendo en cuenta los distintos modelos publicados hasta el momento (Mestdagh *et al.*, 2009. *Genome Biology*, Vol.10, Nº 6, PP R6; Boeri *et al.*, 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 108, Nº 9, PP 3713-3718).

Utilizando el método de normalización de la expresión utilizando como *housekeeping* la media de los miARNs expresados en todas las muestras (Mestdagh *et al.*, 2009. *Genome Biology*, Vol.10, Nº 6, PP R6) hallamos que los niveles del miR-29b y miR-146a estaban diferencialmente expresados de forma significativa en los pacientes con cáncer respecto al grupo control (Figura 1).

Utilizando un segundo análisis (Boeri *et al.*, 2011. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 108, Nº 9, PP 3713-3718), el nivel de expresión de cada miARN se calculó mediante el método de 2^{-Ct} . Después se calcularon los distintos ratios recíprocos, considerando un solo ratio para cada par de miARNs y expresado como log2. De esta forma, hallamos que una firma de 7 microARNs compuesta por los microARNs 122, 29b, 146, 193, 372, 214, 30 generaban una serie de ratios que estaban diferencialmente expresados entre Control y Cáncer (Tabla 2; Figura 2).

Tabla 2. Medias y SEM de los ratios de miARNs diferencialmente expresados entre Control y Cáncer

miR Ratios (Log2)	Control (Media ± SEM)	Cáncer (Media ± SEM)	P
miR-122/miR-29b	-1,1 ± 0,4	-4,3 ± 1,2	0,01
miR-29b/miR-146	7,9 ± 1,1	12,8 ± 1,3	0,00
miR-193/miR-146	-8,6 ± 1,5	-3,6 ± 1,4	0,02
miR-146/miR-372	12,5 ± 1,2	8,2 ± 1,7	0,04
miR-214/miR-146	-12,2 ± 1,5	-8,1 ± 1,4	0,03
miR-30/miR-146	2 ± 1,3	5,4 ± 1,2	0,05

Asimismo, generamos un modelo que integraba la combinación de los ratios diferencialmente expresados (regresión logística binaria), el cual era capaz de

discriminar pacientes con cáncer respecto a controles con un 80% de Especificidad, un 70% de Sensibilidad y un área bajo la curva de 0.76. Este modelo se ajusta a los datos de microARNs en nuestra cohorte de individuos. Sería necesaria su validación en otra cohorte de pacientes independiente (Figura 3).

- 5 Por otro lado encontramos que dentro del grupo de cáncer, existían distintas firmas de microARNs cuyos ratios se asociaron a determinadas características de la clínica de los pacientes con cáncer de pulmón como tipo de tumor, invasión, metástasis y estadio.

Tipos de Tumor

- 10 Una firma de 5 microARNs compuesta por el miR-17, -29b, -214, -148 y -let7c generaban ratios que estaban significativamente diferencialmente expresados entre los subtipos de cáncer adenocarcinoma y epidermoide (Tabla 3):

Tabla 3. Media y SEM de los ratios de miARNs diferencialmente expresados entre el subtipo de tumor Adenocarcinoma y Epidermoide

miR Ratios (Log2)	Adenocarcinoma (Media $\pm$ SEM)	Epidermoide (Media $\pm$ SEM)	P
miR-17/miR-148	16,4 $\pm$ 1,6	9,7 $\pm$ 3,05	0,05
miR-29b/miR-let7c	15,9 $\pm$ 2,1	22,7 $\pm$ 1,6	0,02
miR-214/miR-let7c	-7,1 $\pm$ 1,9	1,5 $\pm$ 2,8	0,01
miR-148/ miR-let7c	-6,4 $\pm$ 2,2	2,6 $\pm$ 2,6	0,01

- 15 El modelo de combinación de estos ratios permitía discriminar el tipo de tumor Adenocarcinoma del Epidermoide con una Especificidad del 91%, una Sensibilidad del 87% y un Área bajo la curva de 0.92. Este modelo se ajustó exclusivamente a los datos de miARNs y tipo de tumor de nuestra cohorte de 32 pacientes con cáncer (Figura 4).

Invasividad

- 20 Una firma de 4 microARNs compuesta por el miR-17, -214, -122 y -148 generaban ratios que estaban diferencialmente expresados de forma significativa entre la invasividad o no del tumor (Tabla 4):

Tabla 4. Media y SEM de los ratios microARN diferencialmente expresados entre la invasividad o no del tumor

miR Ratios (Log2)	No Invasión (Media $\pm$ SEM)	Invasión (Media $\pm$ SEM)	P
miR-17/miR-214	17,1 $\pm$ 2	12,1 $\pm$ 1,1	0,04
miR-122/miR-148	14,5 $\pm$ 2,8	19,4 $\pm$ 1,7	0,05
miR-214/miR-148	-3,1 $\pm$ 0,9	2,5 $\pm$ 2,1	0,02

El modelo de combinación de estos ratios permitía discriminar la invasividad o no del tumor con una Especificidad del 91 %, una Sensibilidad del 64 % y un Área bajo la curva de 0.85. Este modelo se ajustó exclusivamente a los datos de microARN e

5 invasividad del tumor de nuestra cohorte de 32 pacientes con cáncer (Figura 5).

Metástasis

Una firma de 5 microARNs compuesta por el miR-17, -214, -122, -29b y -30 generaban ratios que estaban diferencialmente expresados de forma significativa entre la

10 presencia o no de metástasis (Tabla 5):

Tabla 5. Medias y SEM de los ratios de microARNs diferencialmente expresados entre la presencia o ausencia de metástasis

miR Ratios (Log2)	No Metástasis (Media $\pm$ SEM)	Metástasis (Media $\pm$ SEM)	P
miR-17/miR-214	16,1 $\pm$ 1,6	10,3 $\pm$ 2,2	0,04
miR-122/miR-214	18,8 $\pm$ 1,6	13 $\pm$ 2,2	0,05
miR-29b/miR-214	23,6 $\pm$ 1,1	17,1 $\pm$ 2	0,02
miR-214/miR-30	-16 $\pm$ 1,6	-10,3 $\pm$ 2,3	0,02

El modelo de combinación de estos ratios permitía discriminar la presencia o no de

15 metástasis con una Especificidad del 75 %, una Sensibilidad del 71 % y un Área bajo la curva de 0.78. Este modelo se ajustó exclusivamente a los datos de microARN y metástasis de nuestra cohorte de 32 pacientes con cáncer.

Estadio

Una firma de 3 microARNs compuesta por el miR-29b, -214, y -372 generaban ratios que estaban diferencialmente expresados de forma significativa entre la presencia o no de metástasis (Tabla 6):

Tabla 6. Medias y SEM de los ratios de microARNs diferencialmente expresados entre el estadio 3 y 4 del tumor

miR Ratios (Log2)	Estadio 3 (Media ± SEM)	Estadio 4 (Media ± SEM)	P
miR-29b/miR-214	25,4 ± 0,89	19,2 ± 1,73	0,00
miR-214/miR-372	-3,9 ± 1,8	2,07 ± 2,3	0,03

El modelo de combinación de estos ratios permitía discriminar entre el estadio 3 y 4 del tumor con una Especificidad del 72 %, una Sensibilidad del 78 % y un Área bajo la curva de 0.84. Este modelo se ajustó exclusivamente a los datos de microARN y estadio del tumor de nuestra cohorte de 32 pacientes con cáncer.

REIVINDICACIONES

1.- Uso simultáneo de los biomarcadores de microARNs: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17 para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento del cáncer de pulmón.

5 2.- Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón, que comprende:

a) cuantificar el producto de expresión de los biomarcadores miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y/o
10 miR-17 en una muestra biológica aislada de dicho individuo.

3.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende:

b) calcular el índice A según la ecuación:

$$A = -0,083 + 0,172 \cdot (\text{miR-122}/\text{miR-29b}) + 0,009 \cdot (\text{miR-29b}/\text{miR-146}) - 0,038 \cdot (\text{miR-214}/\text{miR-146}) - 0,041 \cdot (\text{miR-193}/\text{miR-146}) + 0,004 \cdot (\text{miR-30}/\text{miR-146}) + 0,056 \cdot (\text{miR-146}/\text{miR-372}),$$

15

c) calcular el índice B según la ecuación:

$$B = 3,793 - 0,501 \cdot (\text{miR-17}/\text{miR-148}) + 0,167 \cdot (\text{miR-29b}/\text{miR-Let7c}) + 0,278 \cdot (\text{miR-214}/\text{miR-Let7c}) - 0,045 \cdot (\text{miR-148}/\text{miR-let7c}),$$

d) calcular el índice C según la ecuación:

$$C = 1,417 - 0,139 \cdot (\text{miR-17}/\text{miR-214}) + 0,05 \cdot (\text{miR-122}/\text{miR-148}) + 0,106 \cdot (\text{miR-214}/\text{miR-148}),$$

20

e) calcular el índice D según la ecuación:

$$D = 4,372 - 0,026 \cdot (\text{miR-17}/\text{miR-214}) - 0,049 \cdot (\text{miR-122}/\text{miR-214}) - 0,129 \cdot (\text{miR-29b}/\text{miR-214}) + 0,022 \cdot (\text{miR-214}/\text{miR-30})$$

25 y/o

f) calcular el índice E según la ecuación:

$$E = 16,12 - 0,630 \cdot (\text{miR-29b}/\text{miR-214}) + 0,157 \cdot (\text{miR-214}/\text{miR-30}),$$

asignando en cada ecuación los valores de los biomarcadores correspondientes obtenidos en el paso (a).

4.- Un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón que comprende los pasos (a) y (b) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

g) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón cuando el valor del índice A del paso (b) sea preferiblemente menor que 0,88, más preferiblemente menor que 0,75, y aún más preferiblemente menor que 0,579.

5.- Un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón que comprende los pasos (a) y (c) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

h) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón de células no pequeñas de tipo adenocarcinoma y no epidermoide cuando el valor del índice B del paso (c) sea preferiblemente menor que 0,91, más preferiblemente menor que 0,72, y aún más preferiblemente menor que 0,50.

6.- Un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón que comprende los pasos (a) y (d) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

i) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón de tumor invasivo cuando el valor del índice C del paso (d) sea preferiblemente mayor que 0,30, más preferiblemente mayor que 0,39, y aún más preferiblemente mayor que 0,65.

7.- Un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón que comprende los pasos (a) y (e) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

j) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón con metástasis cuando el valor del índice D del paso (e) sea preferiblemente mayor que 0,28, más preferiblemente mayor que 0,34, y aún más preferiblemente mayor que 0,45.

8.- Un método para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón que comprende los pasos (a) y (f) según cualquiera de las reivindicaciones 2-3, y además comprende:

k) clasificar al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón en estadio 4 cuando el valor del índice E del paso (f) sea preferiblemente mayor que 0,18, más preferiblemente mayor que 0,39, y aún más preferiblemente mayor que 0,64.

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 2-8, donde la muestra biológica aislada del paso (a) es una muestra de condensado de aire exhalado.

10.- Un kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que comprende cebadores, sondas y/o anticuerpos capaces de cuantificar el producto de expresión los microARN: miR-146a, miR-122, miR-148a, miR-214, miR-372, miR-let7c, miR-30c, miR-19a, miR-193b, miR-29b y miR-17, y donde:

- los cebadores o primers son secuencias de polinucleótidos de entre 10 y 30 pares de bases, más preferiblemente de entre 15 y 25 pares de bases, aún más preferiblemente de entre 18 y 22 pares de bases, y aún mucho más preferiblemente de alrededor de 20 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

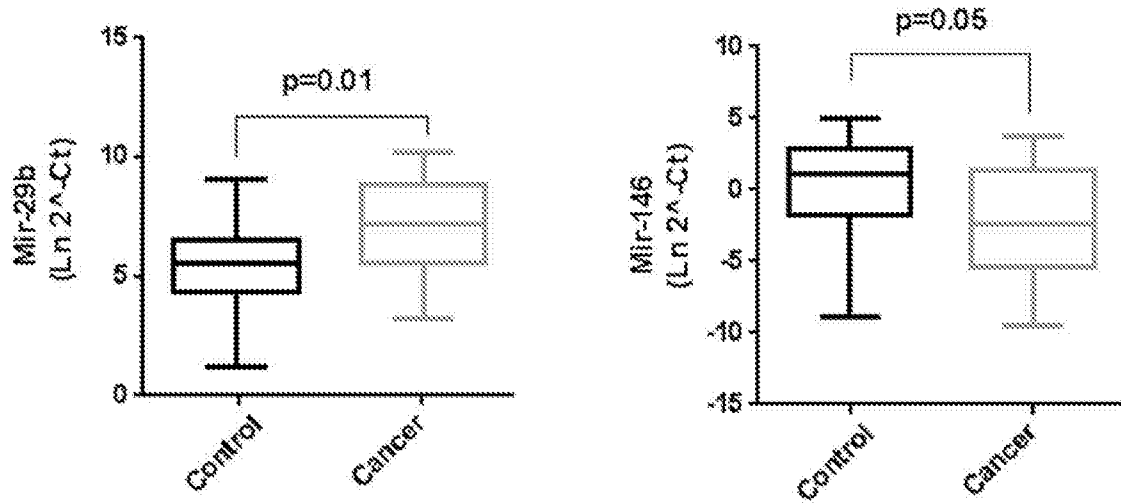
- las sondas son secuencias de polinucleótidos de entre 80 y 1100 pares de bases, más preferiblemente de entre 100 y 1000 pares de bases, y aún más preferiblemente de entre 200 y 500 pares de bases, que presentan una identidad de al menos un 80%, más preferiblemente de al menos un 90%, aún más preferiblemente de al menos un 95%, aún mucho más preferiblemente de al menos un 98%, y particularmente de un 100%, con un fragmento de las secuencias complementarias a la SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13,

SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

- los anticuerpos son capaces de unirse a una región formada por cualquiera de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

11.- Un microarray que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de las secuencias nucleotídicas SEQ ID N°: 1, SEQ ID N°: 2, SEQ ID N°: 3, SEQ ID N°: 4, SEQ ID N°: 5, SEQ ID N°: 6, SEQ ID N°: 7, SEQ ID N°: 8, SEQ ID N°: 9, SEQ ID N°: 10, SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 13, SEQ ID N°: 14, SEQ ID N°: 15, SEQ ID N°: 16, SEQ ID N°: 17, SEQ ID N°: 18, SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 21, SEQ ID N°: 22 y/o SEQ ID N°: 23.

12.- Uso del kit o dispositivo tal y como se define en la reivindicación 10 o de un microarray tal y como se define en la reivindicación 11, para la obtención de datos útiles para el diagnóstico, clasificación y/o seguimiento de un individuo o sujeto que potencialmente sufra cáncer de pulmón.



Mir 29b (Media $\pm$ SEM): Control= 5.3 $\pm$ 0.3; Cancer= 6.6 $\pm$ 0.4; p=0.01

Mir 146 (Media $\pm$ SEM): Control= -0.2 $\pm$ 0.6 ; Cancer= -2.07 $\pm$ 0.7; p=0.05

Fig.1

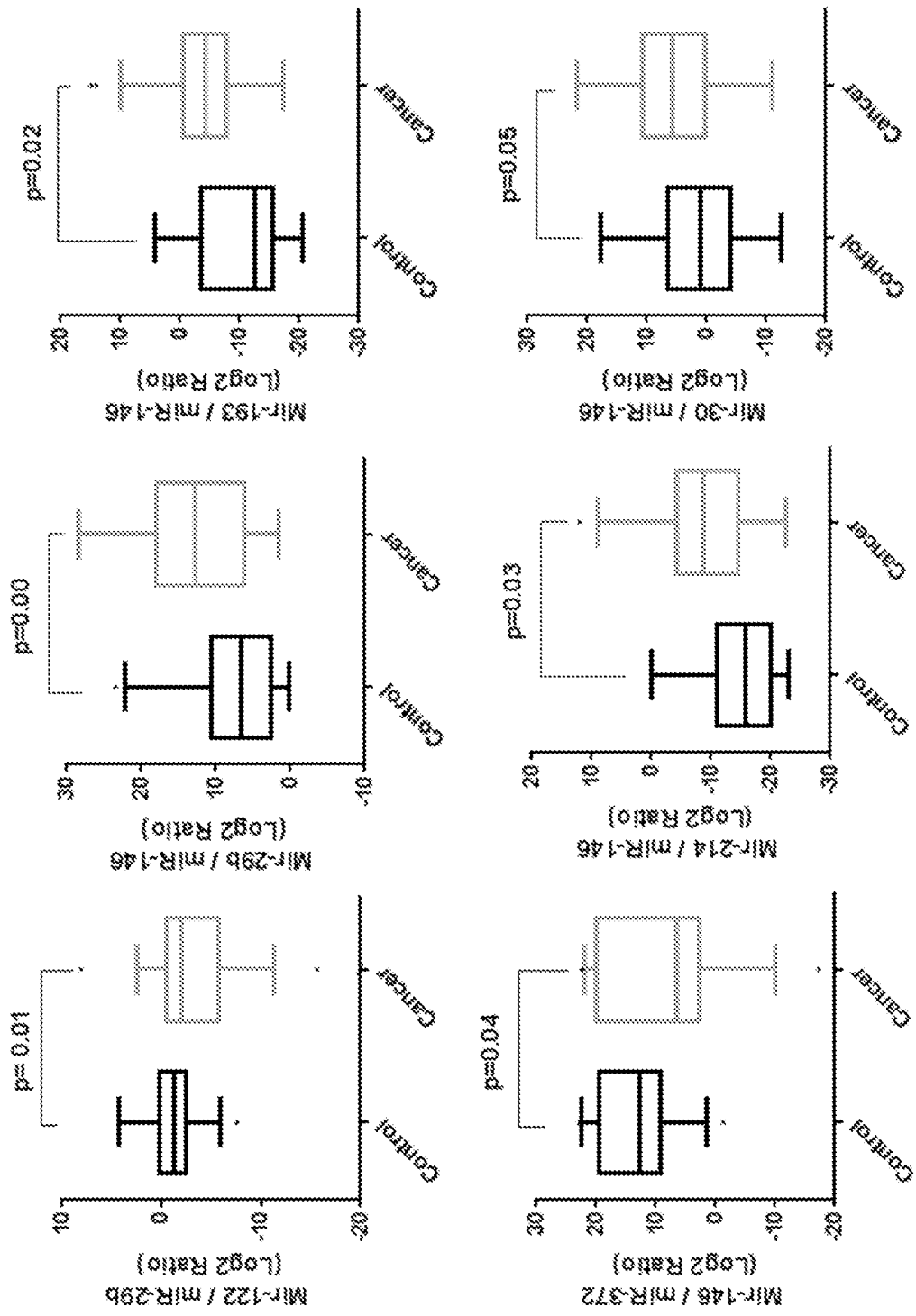


Fig.2

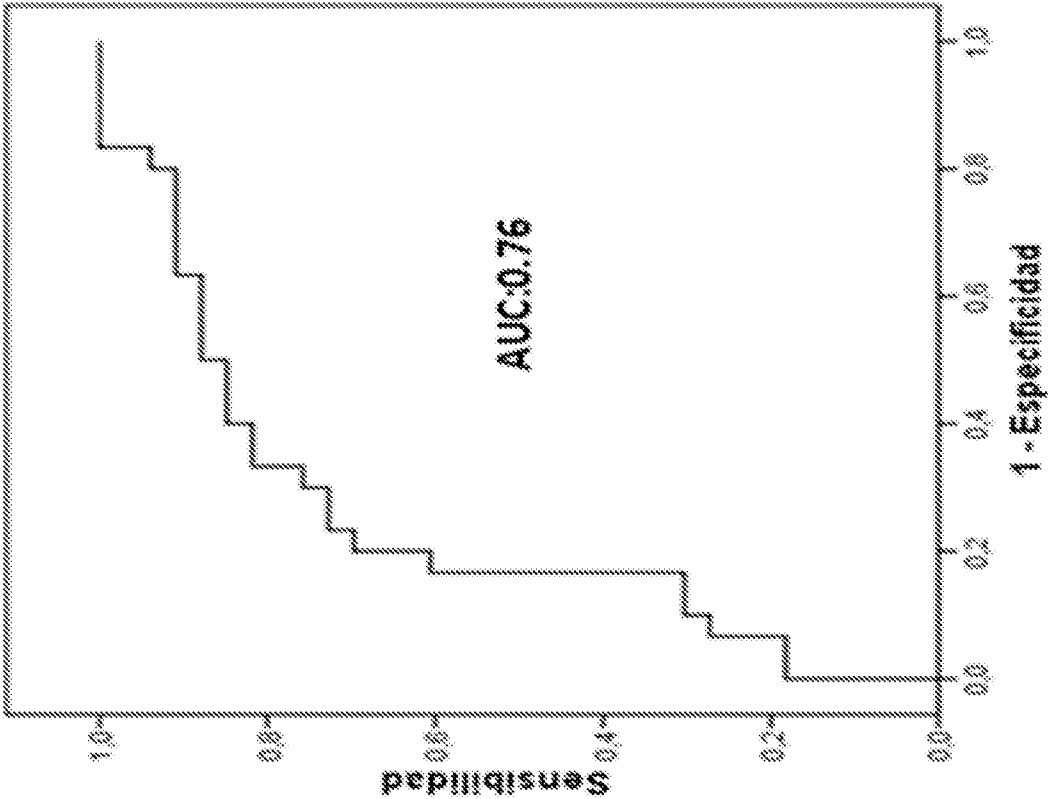


Fig.3

ROC Análisis	
Área bajo la curva (AUC)	0.76
Sensibilidad (%)	70
Especificidad (%)	80
Punto de corte	0.579

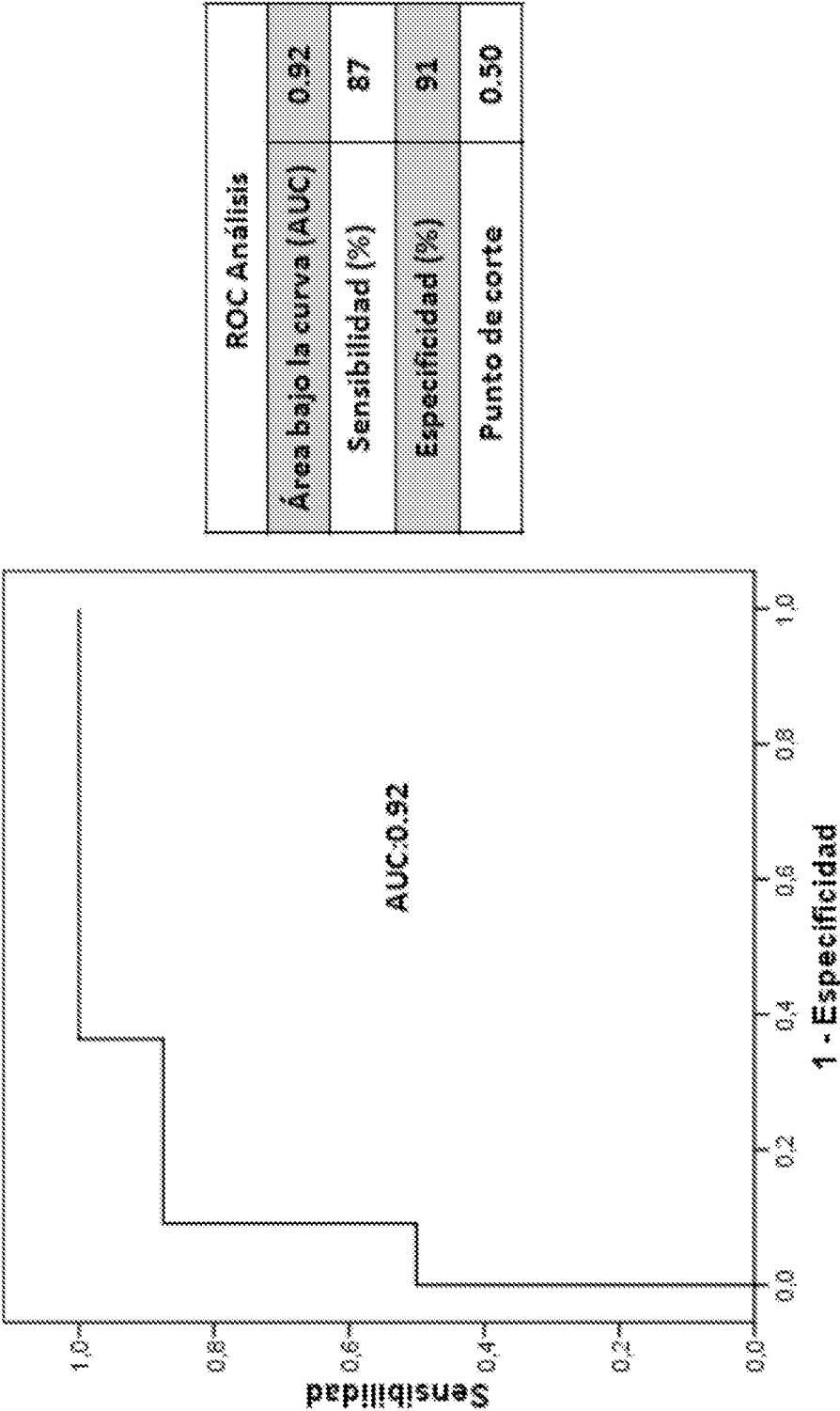


Fig.4

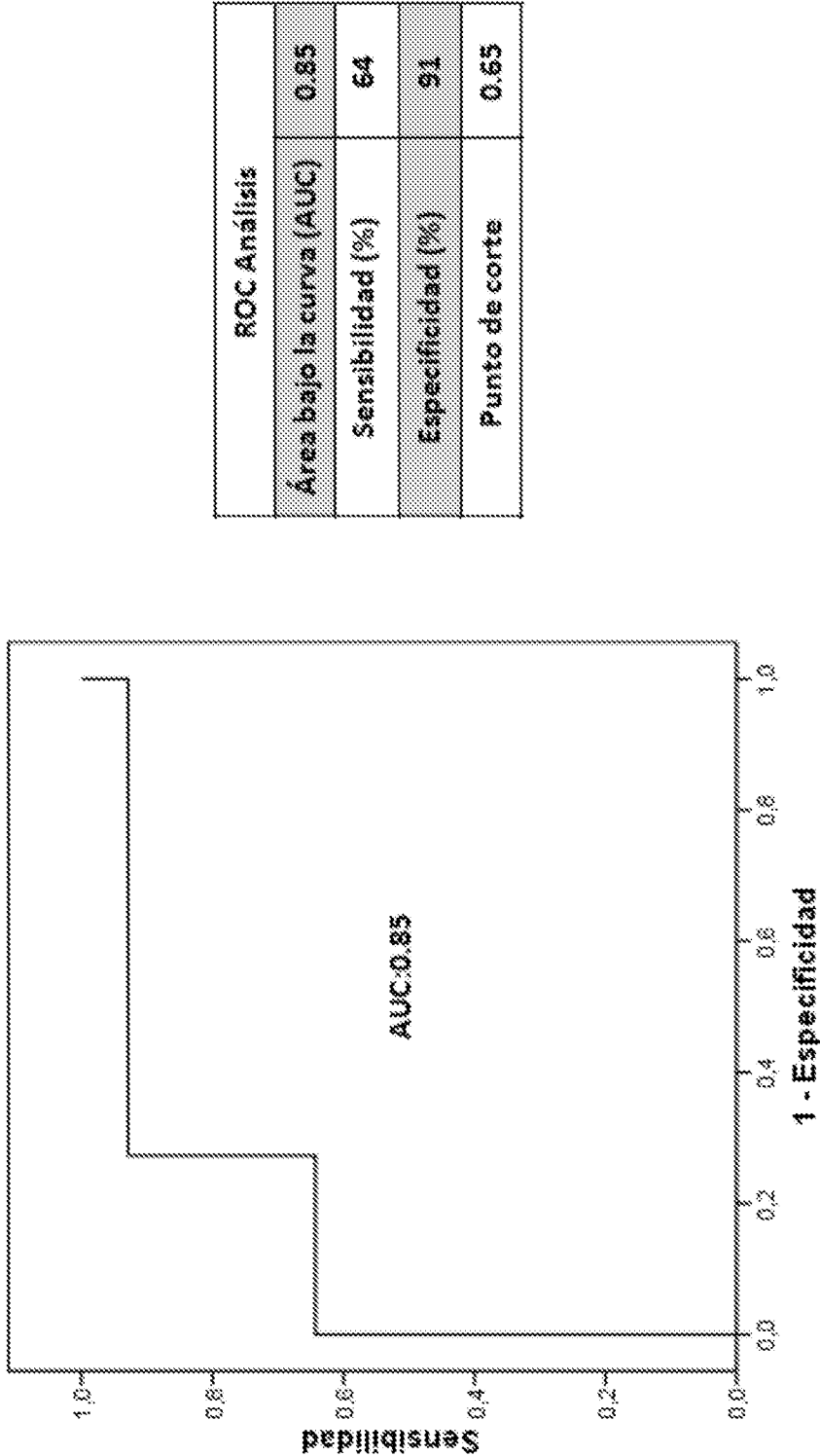


Fig.5

ROC Análisis	
Área bajo la curva (AUC)	0.78
Sensibilidad (%)	71
Especificidad (%)	75
Punto de corte	0.45

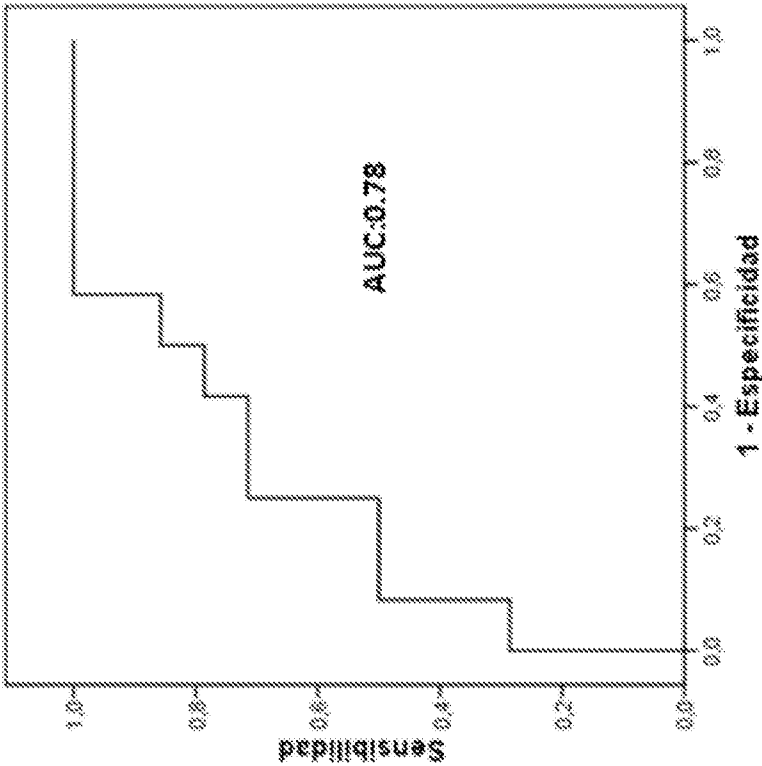
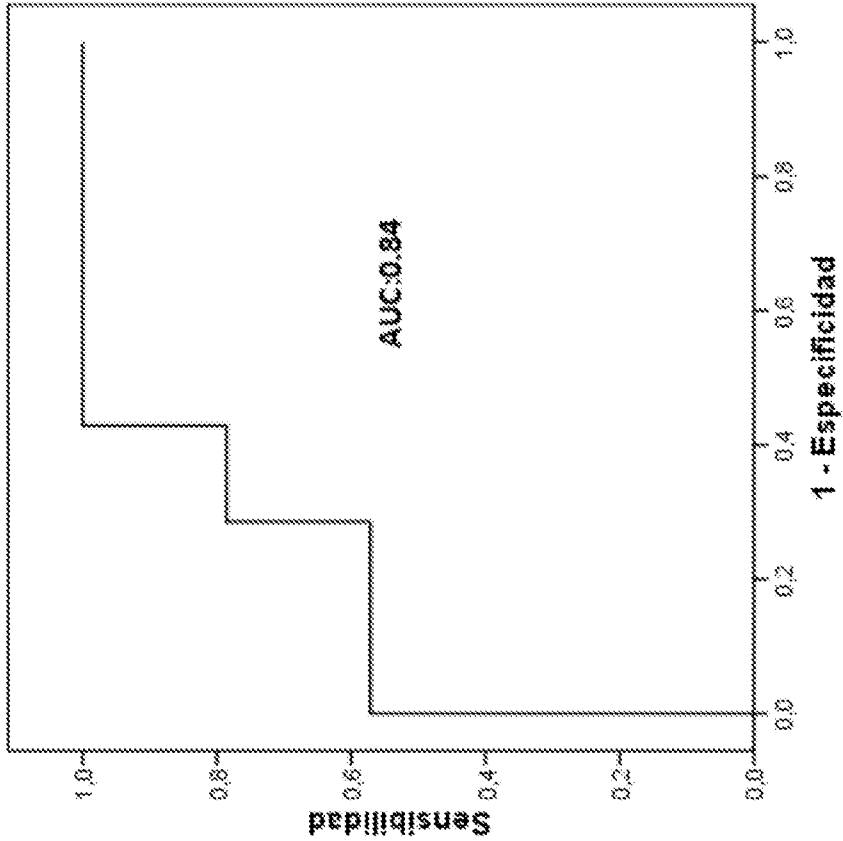


Fig.6



ROC Analysis	
Area bajo la curva (AUC)	0.84
Sensibilidad (%)	78
Especificidad (%)	72
Punto de corte	0.64

Fig.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070307

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**C12Q1/68** (2006.01)

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q

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

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007081720 A2 (THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION [US/US]) 19/07/2007, page 3, line 2 – page 10, line 23; claims 1-19.	1-8, 10-12
X	WO 2011025919 A1 (ASURAGEN, INC. [US/US]) 03/03/2011, page 6, paragraph [0021] – page 7, paragraph [0025]; claims 1-19.	1-8, 10-12
X	US 2014038194 A1 (WANG <i>et al.</i>) 06/02/2014, page 1, paragraph [0007] - page 2, paragraph [0018]; claims 1-6.	1-8, 10-12

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

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

Date of the actual completion of the international search
14/07/2017Date of mailing of the international search report
(18/07/2017)

Name and mailing address of the ISA/

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

Telephone No. 91 3493404

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070307

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013116503 A2 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY [US/US] AND ORDWAY RESEARCH INSTITUTE, INC. [US/US]) 08/08/2013, page 2, paragraphs [0008], [0010], [0011]; claims, 1,3, 24-27.	1, 2, 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2017/070307

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2007081720 A2	19.07.2007	ES2554531T T3 ES2553442T T3 ES2536438T T3 CN103993082 A CN103993082B B ES2429404T T3 CN102943108 A CN102943108B B EP2502630 A2 EP2502630 A3 EP2514434 A2 EP2514434 A3 EP2514433 A2 EP2514433 A3 US2011190160 A1 US8361710 B2 US2011177968 A1 US8377637 B2 JP2009531018 A JP5451077B B2 CN101400361 A CN101400361B B US2008306017 A1 US7943318 B2 CA2633674 A1 AU2007205234 A1 AU2007205234B B2 EP1978986 A2 EP1978986 A4	21.12.2015 09.12.2015 25.05.2015 20.08.2014 11.01.2017 14.11.2013 27.02.2013 21.05.2014 26.09.2012 13.02.2013 24.10.2012 13.02.2013 24.10.2012 13.02.2013 04.08.2011 29.01.2013 21.07.2011 19.02.2013 03.09.2009 26.03.2014 01.04.2009 17.10.2012 11.12.2008 17.05.2011 19.07.2007 19.07.2007 12.07.2012 15.10.2008 09.12.2009
----- WO2011025919 A1	----- 03.03.2011	US2014274791 A1 EP2775300 A2 EP2775300 A3 JP2013502931 A JP5995721B B2 CN102725632 A EP2470897 A1 EP2470897 A4 US2011053158 A1 US8735074 B2	----- 18.09.2014 10.09.2014 01.04.2015 31.01.2013 21.09.2016 10.10.2012 04.07.2012 29.05.2013 03.03.2011 27.05.2014
----- US2014038194 A1	----- 06.02.2014	NONE	-----
----- WO2013116503 A2	----- 08.08.2013	NONE	-----

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070307

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **C12Q1/68** (2006.01)

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12Q

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

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

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

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	WO 2007081720 A2 (THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION [US/US]) 19/07/2007, página 3, línea 2 – página 10, línea 23; reivindicaciones 1-19.	1-8, 10-12
X	WO 2011025919 A1 (ASURAGEN, INC. [US/US]) 03/03/2011, página 6, párrafo [0021] – página 7, párrafo [0025]; reivindicaciones 1-19.	1-8, 10-12
X	US 2014038194 A1 (WANG <i>et al.</i>) 06/02/2014, página 1, párrafo [0007] - página 2, párrafo [0018]; reivindicaciones 1-6.	1-8, 10-12

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

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

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
14/07/2017

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
18 de julio de 2017 (18/07/2017)

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

Funcionario autorizado
M. García Grávalos

Nº de teléfono 91 3493404

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2017/070307

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 2013116503 A2 (ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE OF YESHIVA UNIVERSITY [US/US] AND ORDWAY RESEARCH INSTITUTE, INC. [US/US]) 08/08/2013, página 2, párrafos [0008], [0010], [0011]; reivindicaciones, 1,3, 24-27.	1, 2, 9

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2017/070307

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2007081720 A2	19.07.2007	ES2554531T T3	21.12.2015
		ES2553442T T3	09.12.2015
		ES2536438T T3	25.05.2015
		CN103993082 A	20.08.2014
		CN103993082B B	11.01.2017
		ES2429404T T3	14.11.2013
		CN102943108 A	27.02.2013
		CN102943108B B	21.05.2014
		EP2502630 A2	26.09.2012
		EP2502630 A3	13.02.2013
		EP2514434 A2	24.10.2012
		EP2514434 A3	13.02.2013
		EP2514433 A2	24.10.2012
		EP2514433 A3	13.02.2013
		US2011190160 A1	04.08.2011
		US8361710 B2	29.01.2013
		US2011177968 A1	21.07.2011
		US8377637 B2	19.02.2013
		JP2009531018 A	03.09.2009
		JP5451077B B2	26.03.2014
		CN101400361 A	01.04.2009
		CN101400361B B	17.10.2012
		US2008306017 A1	11.12.2008
		US7943318 B2	17.05.2011
		CA2633674 A1	19.07.2007
		AU2007205234 A1	19.07.2007
		AU2007205234B B2	12.07.2012
		EP1978986 A2	15.10.2008
		EP1978986 A4	09.12.2009
WO2011025919 A1	03.03.2011	US2014274791 A1	18.09.2014
		EP2775300 A2	10.09.2014
		EP2775300 A3	01.04.2015
		JP2013502931 A	31.01.2013
		JP5995721B B2	21.09.2016
		CN102725632 A	10.10.2012
		EP2470897 A1	04.07.2012
		EP2470897 A4	29.05.2013
		US2011053158 A1	03.03.2011
		US8735074 B2	27.05.2014
US2014038194 A1	06.02.2014	NINGUNO	
WO2013116503 A2	08.08.2013	NINGUNO	