(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 junio de 2016 (16.06.2016)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2016/092136 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/070887

(22) Fecha de presentación internacional:
9 de diciembre de 2015 (09.12.2015)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201431814
10 de diciembre de 2014 (10.12.2014) ES

(71) Solicitantes: **SERVICIO ANDALUZ DE SALUD** [ES/ES]; Avda de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** [ES/ES]; Avenida Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES).

(72) Inventores: **JURADO GÁMEZ, Bernabé**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Avenida Menéndez Pidal, s/n, E-14004 Córdoba (ES). **RODRÍGUEZ ARIZA, Antonio**; Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Avenida Menéndez Pidal, s/n, E-14004 Córdoba (ES). **LÓPEZ SÁNCHEZ, Laura María**; Universidad de Córdoba, Avenida Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES).

(74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avda. de Burgos, 16D , Edificio EUROMOR, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados *(a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, 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.

(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).

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))*

— *con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))*

WO 2016/092136 A1

(54) **Title**: METHOD FOR PRODUCING DATA THAT CAN BE USED TO SCREEN PATIENTS WITH LUNG CANCER

(54) **Título** : MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL CRIBADO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN

(57) **Abstract**: The invention relates to a method for producing data that can be used for the classification, diagnosis and monitoring of lung cancer, to a kit or a device and to the uses thereof.

(57) **Resumen**: Método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, kit o dispositivo y sus usos.

MÉTODO DE OBTENCIÓN DE DATOS ÚTILES PARA EL CRIBADO DE PACIENTES CON CÁNCER DE PULMÓN.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biología Molecular y la Medicina. Específicamente, se refiere a un procedimiento de detección e identificación de proteínas en el aire exhalado como herramienta de cribado del cáncer de pulmón.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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. 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 cribado capaces de detectar la enfermedad lo antes posible. El tabaco es el principal factor de riesgo, siendo el causante del 85-90% de todos los casos.

Se define cribado a la aplicación de procedimientos de selección (cuestionario, examen físico, test) a poblaciones de individuos aparentemente «sanos» con objeto de identificar, en la fase de latencia, a aquellos que pueden estar enfermos o que presentan un riesgo incrementado de padecer una determinada enfermedad porque presentan un determinado factor de riesgo. Es decir, se trata de diferenciar a las personas aparentemente sanas que probablemente padecen una enfermedad o presentan un factor de riesgo de las aparentemente sanas que probablemente no padecen la enfermedad o no presentan el factor de riesgo. El cribado no es una prueba diagnóstica definitiva.

Se han propuesto diversas pruebas para el cribado de cáncer de pulmón. En función de su frecuencia de uso, las pruebas más usadas en el cribado de cáncer de pulmón son la radiografía de tórax, la tomografía computarizada y la citología de esputo (Detterbeck *et al.*, 2013. *American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines* 143(5 Suppl.):e78S-92S). Las dos primeras pruebas están basadas en imagen, dependen de la presencia de una lesión neoplásica ya detectable y además suponen la exposición a una fuente de radiación, con el potencial efecto

nocivo asociado. Por otro lado, la citología de esputo es un método de diagnóstico sencillo y no invasivo, pero de resultados muy variables (D´Urso *et al.*, 2013. *J. Cell Physiol.* 228(5), 945-951).

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, 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 analizó muestras de pacientes de cáncer de pulmón consiguiendo identificar sólo 20 proteínas distintas en todas las muestras analizadas (Chang *et al.*, 2010. *Eur. Respir. J.* 35(5), 1182-1215).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un **primer aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,

b) determinar la cantidad total y/o concentración de proteínas en la muestra (a).

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

c) incluir al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta un número de proteínas distintas mayor de 6, preferiblemente mayor de 9, y más preferiblemente mayor de 12 proteínas distintas.

En otra realización preferida, el método además comprende:

d) determinar adicionalmente la concentración de hemoglobina (subunidad beta), citoqueratina 6A, citoqueratina 6B, citoqueratina 6C, citoqueratina 10 y/o histona 2A, en la muestra biológica del paso (a).

Más preferiblemente, las concentraciones de hemoglobina (subunidad beta), citoqueratina 6A, citoqueratina 6B, citoqueratina 6C, citoqueratina 10 e histona 2A se determinan simultáneamente.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de hemoglobina mayor o igual a 0,07 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,08 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,09 μg/ml, y aún más preferiblemente mayor o igual a 0,1μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de citoqueratina 6A mayor o igual a 0,35 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,37 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,4 μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de citoqueratina 6B mayor o igual a 0,25 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,27 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,3 μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de citoqueratina 6C mayor o igual a 0,15 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,17 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,2 μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una

concentración de histona 2A mayor o igual a 0,15 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,17 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,2 μg/ml.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

En un **segundo aspecto** la invención se refiere a un método de clasificación de pacientes con cáncer de pulmón, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos los pasos (a)-(b) según el primer método de la invención, y además comprende determinar la concentración de citoqueratina 10. En una realización preferida además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con adenocarcinoma si presenta una concentración de citoqueratina 10 menor a 1,5 μg/ml, preferiblemente menor a 1,2 μg/ml, y más preferiblemente menor a 1 μg/ml.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere método para el seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a)-(b) según el primer método de la invención, y además comprende determinar las variaciones de las isoformas de la citoqueratina 6 en dos tiempos, un tiempo t1 y un tiempo t2. En una realización preferida de este aspecto de la invención, t1 es 0 (momento inicial), y t2 va desde 1 día en adelante. En otra realización preferida t2 es 365 días.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, el tercer método de la invención además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con un mayor tamaño tumoral si la cantidad de citoqueratina 6 en t1 es menor que en t2.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios llevara a cabo el método según cualquiera de los métodos de la invención.

En otra realización preferida, el kit o dispositivo de la invención comprende los cebadores y sondas obtenidos de las secuencias de los genes de la invención, tal y como también se encuentran en la tabla 1. El kit puede contener la/s sonda/s y cebadores útiles para cuantificar la expresión de los genes *HBB, KRT6A*, *KRT6B,* KRT6C, KRT10, y *HIST2H2AC*, de sus correspondientes proteínas, o cualquiera de sus combinaciones.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención, para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer, y más preferiblemente del cáncer de pulmón.

Un **sexto 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.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible comprende al menos una secuencia comprendida en cualquiera de las sondas de la invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una secuencia conocida o un ARNm comprendida cualquiera de las sondas de la invención.

Un **séptimo 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.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador

almacenado en el medio legible por un ordenador de la invención, que comprende código de software adaptado para llevar a cabo los pasos de cualquiera de los métodos de la invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. En el análisis proteómico se identificaron un total de 384 proteínas en los cuatro grupos experimentales. De rojo (menor) a verde (mayor) se muestra el número de péptidos identificados en cada una de ellas.

Figura 2. El número medio de proteínas identificado por paciente es significativamente más alto en pacientes con cáncer de pulmón y la mayoría de proteínas se identificó en el grupo de cáncer de pulmón.

Figura 3. El número total de proteínas identificadas por paciente posee valor diagnóstico

Figura 4. Algunas proteínas, como la hemoglobina (subunidadβ) o la histona 2A, se identifican mucho más a menudo en pacientes con cáncer de pulmón en comparación con los demás grupos control.

Figura 5. La cantidad detectada de varias isoformas de citoqueratina 6 fue significativamente mayor en las muestras procedentes de pacientes con cáncer de pulmón.

Figura 6. Existe una correlación significativa entre el número de péptidos identificados correspondientes a algunas isoformas de citoqueratinas, y el tamaño de la lesión tumoral

Figura 7. Se detecta un número significativamente mayor de péptidos de la citoqueratina 10 en el caso de tumores del tipo epidermoide, en comparación con adenocarcinomas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Los autores de la presente invención han analizado las proteínas en 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 las proteínas presentes en el aire exhalado pueden ser usadas como marcadores de un sistema de cribado de cáncer de pulmón.

La presente invención se refiere, por tanto, a un método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer-

Así pues, un **primer aspecto** de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer, de ahora en adelante primer método de la invención, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,

b) determinar la cantidad total y/o concentración de proteínas en la muestra (a).

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

c) incluir al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta un número de proteínas distintas mayor de 6, preferiblemente mayor de 9, y más preferiblemente mayor de 12 proteínas distintas.

En otra realización preferida, el método además comprende:

d) determinar adicionalmente la concentración de hemoglobina (subunidad beta), citoqueratina 6A, citoqueratina 6B, citoqueratina 6C, citoqueratina 10 y/o histona 2A, en la muestra biológica del paso (a).

Más preferiblemente, las concentraciones de hemoglobina (subunidad beta), citoqueratina 6A, citoqueratina 6B, citoqueratina 6C, citoqueratina 10 e histona 2A se determinan simultáneamente.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de hemoglobina mayor o igual a 0,07 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,08 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,09 μg/ml, y aún más preferiblemente mayor o igual a 0,1μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una

concentración de citoqueratina 6A mayor o igual a 0,35 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,37 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,4 μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de citoqueratina 6B mayor o igual a 0,25 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,27 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,3 μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de citoqueratina 6C mayor o igual a 0,15 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,17 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,2 μg/ml.

En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer si presenta una concentración de histona 2A mayor o igual a 0,15 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,17 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,2 μg/ml.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Los niveles de expresión de los genes van a dar un determinado perfil de expresión génica. El término "nivel de expresión", también denominado "cantidad producto génico" o "cantidad de producto de expresión" se refiere al material bioquímico, ya sea ARN o proteína, resultado de la expresión de un gen. Algunas veces se usa una medida de la cantidad de producto génico para inferir qué tan activo es un gen. Se entiende por "perfil de expresión génica" el perfil génico obtenido tras la cuantificación del ARNm y/o de proteína producida por los genes de interés o biomarcadores, es decir, por los genes *HBB, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT10 y HIST2H2AC*, en una muestra biológica aislada. El perfil de expresión de los genes, por ejemplo, puede realizarse determinando el nivel de ARNm derivado de su transcripción, previa extracción del ARN total presente en la muestra biológica aislada, lo cual puede realizarse mediante protocolos conocidos en el estado de la técnica.

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

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

En el contexto de la presente invención el término “hemoglobina” o “Hb” se refiere tanto a la HbA o Hb normal, la cual es una heteroproteína de la sangre, de peso molecular 64.000 Daltons (64 kD), de color rojo, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, en vertebrados y algunos invertebrados, y que está formada por cuatro cadenas polipeptídicas (globinas) a cada una de las cuales se une un grupo hemo, cuyo átomo de hierro es capaz de unirse de forma reversible al oxígeno; como a cualquier variante estructural de la Hb o derivados de la misma modificados químicamente. Ejemplos de variantes estructurales de la hemoglobina o derivados de la misma modificados químicamente son, aunque sin limitarse, la Hb glicosilada o HbA1, incluyéndose dentro de ella todas sus variantes, como por ejemplo, aunque sin limitarnos, la HbA1a, HbA1b o HbA1c; la HbF o Hb fetal, HbLA1c, Hb P3, Hb P4, Hb A0, Hb X, la carboxihemoglobina, carbaminohemoglobina, metahemoglobina, oxihemoglobina, Hb La Roche-sur-Yon, Hb Baylor, HbS, HbE, HbC,

HbD, Hb D-Punjab, Hb O-Arab, Hb G-Philadelphia, Hb Hasharon, Hb Korle-Bu, Hb Lepore, Hb M o HbA2. En una realización preferida de este aspecto de la invención, se detecta la subunidad beta de la hemoglobina.

Los genes de la subunidad alfa (HBA) y beta (HBB) determinan la estructura de los 2 tipos de cadenas de polipéptidos en la hemoglobina adulta, Hb A. El tetrámero de hemoglobina normal del adulto se compone de dos cadenas alfa y dos cadenas beta. La Globina beta mutante produce anemia de células falciformes. La ausencia de la cadena beta provoca beta-cero-talasemia. Las cantidades reducidas de globina beta detectable causan beta-plus-talasemia. El orden de los genes en el grupo beta-globina es 5'-epsilon-gamma-G-gamma-A-delta-beta-3'.

El término “citoqueratina” se refiere a las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular en particular de células epiteliales (incluyendo mucosas y glándulas), así como en las uñas, pelo y en las plumas de los animales. Los monómeros de citoqueratina están ligados una a la otra por moléculas de filagrina. Su función principal es la organización de la estructura tridimensional interna de la célula, forman una barrera rígida la cual evita la entrada de microorganismos. Esa misma barrera cumple la vital función de retener agua dentro de las células. También participan en algunas uniones intercelulares (desmosomas). Se han descrito irregularidades en la expresión de las proteínas de citoqueratina forman la raíz de condiciones atípicas, tales como eccema, ictiosis, soriasis y ciertos tipos de cáncer metastático.

Concretamente, las citoqueratinas 6A, 6B y 6C están codificadas por los genes *KRT6A*, *KRT6B y KRT6C,* respectivamente, que forman parte de la familia de genes de queratinas. Las citoqueratinas 6A, 6B y 6C son citoqueratinas de tipo II, proteínas básicas o neutras dispuestas en pares de cadenas de queratina heterotípicas coexpresadas durante la diferenciación de los tejidos epiteliales simples y estratificados. Se han identificado seis citoqueratina de tipo II (KRT6); la multiplicidad de los genes se atribuye eventos sucesivos de duplicación de genes. Los genes se expresan junto a miembros de la familia KRT16 y/o KRT17 en las papilas filiformes de la lengua, el revestimiento epitelial estratificado de la mucosa oral y el esófago, la vaina externa de la raíz de los folículos pilosos, y el epitelio glandular. Las mutaciones en estos genes se han asociado con paquioniquia congénita. Además, los péptidos de la región C-terminal de la proteína tienen actividad antimicrobiana contra patógenos

bacterianos. Las citoqueratinas tipo II se agrupan en una región del cromosoma 12q12-q13.

Por otro lado, el gen de la citoqueratina 10 codifica un miembro tipo I (ácido) de la familia de las citoqueratina, que pertenecen a la superfamilia de proteínas de los filamentos intermedios (IF). Las queratinas son proteínas estructurales heteropoliméricas que forman los filamentos intermedios. Estos filamentos, junto con los microfilamentos de actina y los microtúbulos, componen el citoesqueleto de las células epiteliales. Las mutaciones en este gen están asociadas con hiperqueratosis epidermolítica. Este gen se encuentra dentro de un grupo de miembros de la familia de queratina en el cromosoma 17q21.

El término “histona” se refiere a proteínas básicas, de baja masa molecular, muy conservadas evolutivamente entre los eucariotas y en algunos procariotas. Forman la cromatina junto con el ADN, sobre la base de unas unidades conocidas como nucleosomas. La cromatina resuelve el problema de restricción de crecimiento de ADN y núcleo, la cromatina está formada por ADN y proteínas, la principal proteína formadora son las histonas. Son las proteínas celulares más frecuentes y exhiben un alto contenido, cerca de 20%, de lisina y arginina (aminoácidos básicos). Con las cargas positivas de las cadenas laterales de estos restos, las histonas (que son extremadamente básicas) se unen a los grupos fosfato del ADN (cargados negativamente); para ello no es relevante la secuencia de bases dentro del ADN. A menudo, las histonas son modificadas por metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones o ADP-ribosilaciones. En los seres humanos hay cinco tipos principales: la histona H1 y las histonas H2A, H2B, H3 y H4. Estas últimas se denominan también histonas nucleosomales y forman un octámero con dos histonas de cada; alrededor de este núcleo se enrolla dos veces un hilo de ADN. Este complejo ADN-histona recibe el nombre de nucleosoma y constituye el componente primario del cromosoma. Las histonas también pueden modificarse por metilación, ribosilación o fosforilación; aún no se conoce en detalles cuáles son los mecanismos precisos con los que están modificaciones influyen en la regulación genética.

Tabla 1. Hemoglobina (subunidad beta), citoqueratinas 6A, 6B, 6C, 10 e histona 2A.

Nombre del Gen	Descripción	Gene ID	Secuencias nucleotídicas	Secuencias aminoacídicas

HBB	*hemoglobin, beta*	3043	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2
KRT6A	*keratin 6A*	3853	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
KRT6B	*keratin 6B*	3854	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
KRT6C	*keratin 6C*	286887	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8
KRT10	*keratin 10*	3858	SEQ ID NO:9 y SEQ ID NO:10	SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12
HIST2H2AC	*histone 2, H2ac*	8338	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14

En el contexto de la presente invención, los genes *HBB, KRT6A*, *KRT6B,* KRT6C, KRT10, y *HIST2H2AC* se definen también por una secuencia de nucleótidos o polinucleótido, que constituye la secuencia codificante de las proteínas 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 polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica de la SEQ ID recogidas en la tabla 1,

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

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

d) moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido que comprende la secuencia aminoacídica con una identidad de al menos un 80%, un 90%, un 95%, un 98% o un 99% con las SEQ ID recogidas en la tabla 1, respectivamente, y en las que el polipéptido codificado por dichos ácidos nucleicos posee la actividad y las características estructurales de las proteínas HBB, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT10 y HIST2H2AC. Entre dichas moléculas de ácido nucleico se encuentra la recogida en las SEQ ID indicada en la tabla1.

Los métodos para cuantificar la cantidad total y/o concentración de proteínas en la muestra (a) son los conocidos en el estado de la técnica incluyendo, por ejemplo, aunque sin limitarnos, ES-MS (de sus siglas en inglés *Electrospray mass spectrometry*), IEF (de sus siglas en inglés *Isoelectric focusing*), electroforesis o HPLC

(de sus siglas en inglés *High-Performance Liquid Chromatography*), la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), electroforesis en dos dimensiones, fluorescencia, técnica de ionización MALDI-TOF-MS, etiquetado de isotopos estables, ELISA (de sus siglas en inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).* En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la cuantificación de los pasos (b) y (d) del método de la invención se realiza por LC-MS/MS.

La detección y cuantificación de las proteínas en la muestra (a) se puede realizar por cualquier procedimiento de los conocidos en el estado del arte. Por ejemplo, aunque sin limitarnos, usando una electroforesis convencional, SDS-PAGE, electroforesis en dos dimensiones, fluorescencia, arrays, espectrometría de masas (MS), cromatografía, cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Los pasos (b), (c) y/o (d) del método descrito anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en los pasos (b) y (d), y/o la comparación computerizada en el paso (c).

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

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

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación del resultado de la amplificación de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una amplificación de una o varias muestras de referencia deseable. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (e) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

En un **segundo aspecto** la invención se refiere a un método de clasificación de pacientes con cáncer de pulmón, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los pasos los pasos (a)-(b) según el primer método de la

invención, y además comprende determinar la concentración de citoqueratina 10. En una realización preferida además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con adenocarcinoma si presenta una concentración de citoqueratina 10 menor a 1,5 μg/ml, preferiblemente menor a 1,2 μg/ml, y más preferiblemente menor a 1 μg/ml.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere método para el seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor, de ahora en adelante tercer método de la invención, que comprende los pasos (a)-(b) según el primer método de la invención, y además comprende determinar las variaciones de las isoformas de la citoqueratina 6 en dos tiempos, un tiempo t1 y un tiempo t2. En una realización preferida de este aspecto de la invención, t1 es 0 (momento inicial), y t2 va desde 1 día en adelante. En otra realización preferida t2 es 182 días, más preferiblemente t2 es 273 días y aún más preferiblemente 365 días.

En otra realización preferida se realizan multiples análisis (tn) a partir del t1=0, realizando un seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor periódico del individuo.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, el tercer método de la invención además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con un mayor tamaño tumoral, si la cantidad de citoqueratina 6 en t1 es menor que en t2.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado. Más preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

KIT O DISPOSITIVO DE LA INVENCIÓN

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere a kit o dispositivo, de ahora en adelante kit o dispositivo de la invención, que comprende los elementos necesarios llevara a cabo el método según cualquiera de los métodos de la invención.

En una realización preferida el kit o dispositivo comprende: un dispositivo de recogida, almacenado y/o transporte de muestras de gases, por ejemplo, pero sin limitarnos, como el descrito en la patente EP99948568.3, preferiblemente adaptado para aire exhalado, que contiene los sensores necesarios para detección cuantitativa y cualitativa de proteínas y/o que puede conectarse a un ordenador que contiene las instrucciones de programa para realizar los pasos del método de la invención.

En otra realización preferida, el kit o dispositivo de la invención comprende los cebadores y sondas obtenidos de las secuencias de los genes de la invención, tal y como también se encuentran en la tabla 1. El kit puede contener la/s sonda/s y cebadores útiles para cuantificar la expresión de los genes *HBB, KRT6A*, *KRT6B,* KRT6C, KRT10, y *HIST2H2AC*, o cualquiera de las combinaciones de los genes.

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 proteínas, etc.

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

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer a partir de una muestra biológica.

El kit se basa en el poder de diagnóstico, clasificación y seguimiento del método de la presente invención. Tal como se ha mencionado anteriormente, el valor indicador de referencia para cada gen/proteína concreto se puede determinar antes de llevar a cabo el procedimiento de la presente invención. En el caso particular del kit, se pueden proporcionar con el valor indicador de referencia para el diagnóstico, clasificación y seguimiento. Con la ayuda del kit, se puede calcular la expresión de cada gen y/o número y/o concentración de proteínas, es decir, con respecto a las muestras de control ejemplificadas anteriormente. El control puede de esta manera estar comprendido también en el kit.

Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al uso del kit o dispositivo de la invención, para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer, y más preferiblemente del cáncer de pulmón.

Un **sexto 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.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el medio de almacenamiento legible comprende al menos una secuencia comprendida en cualquiera de las sondas de la invención.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención que comprende oligonucleótidos o microarreglos de canal único diseñados a partir de al menos una secuencia conocida o un ARNm comprendida cualquiera de las sondas de la invención.

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.

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

Un **séptimo 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.

Un **octavo aspecto** de la invención se refiere a un programa de ordenador almacenado en el medio legible por un ordenador de la invención, que comprende código de software adaptado para llevar 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, N^6-metil-adenina, N^6-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-metilinosina, 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'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutoxosina, pesudouracilo, 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 desoxiribonucleótidos (ADN ó DNA). Los términos “secuencia aminoacídica”, “péptido”, “oligopéptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan aquí de manera intercambiable, y se refieren a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden ser codificantes o no codificantes, química o bioquímicamente modificados.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o

pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS DE LA INVENCIÓN

Pacientes

Se incluyeron en el estudio un total de 193 pacientes: 49 controles sanos sin factor de riesgo (Grupo Control), 49 controles sanos con factor de riesgo (tabaquismo) (Grupo FR), 46 con diagnóstico de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (Grupo EPOC), y 48 con diagnóstico de cáncer de pulmón (Grupo CP).

Obtención de las muestras

Las muestras de condensado de aire exhalado (EBC) se obtuvieron usando un equipo EcoScreen II (FILT GmbH, Alemania). Los pacientes respiraron a través del dispositivo de manera normal durante 15 minutos, y se recogió para el estudio la muestra correspondiente a las vías aéreas distales (inferiores), siendo congelada a -80ºC hasta su correspondiente análisis.

Análisis proteómico

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) en el Servicio de Proteómica de la Universidad de Valencia.

Preparación de las muestras

Las muestras (400 µl) se desecaron mediante centrifugación y evaporación (SpeedVac, Thermo Scientific) y se disolvieron en 20 µl de tampón ABC (anode buffer container, Applied Biosystems). Los residuos de cisteína se redujeron mediante incubación con 2 mM Dithiothreitol (DTT) a 60ºC durante 20 min. Los grupos sulfhidrilo resultantes se bloquearon mediante alquilación con yodoacetamida (IAM) 5 mM, en una incubación de 30 min a temperatura ambiente. El exceso de IAM se neutralizó con una incubación con 10 mM DTT, durante 30 min a temperatura ambiente.

La muestra se sometió a digestión con 250 ng (100 ng/ µl) de tripsina modificada con calidad para secuenciación (Promega) en tampón ABC, durante toda la noche a 37 ºC.

La digestión se detuvo con ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% de concentración final. La mezcla de péptidos resultante se concentró mediante centrifugación y vacío (SpeedVac, Thermo Scientific) hasta un volumen final de 6µl.

Cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC–MS/MS)

De cada muestra se inyectaron 5 µl en una columna trampa (NanoLC Column, 3µ C18-CL, 350umx0.5mm; Eksigen) y se desaló con TFA 0.1% a 3µl/min durante 5 min. Los péptidos se cargaron entonces en una columna analítica (LC Column, 3 µ C18-CL, 75umx12cm, Nikkyo) equilibrada en acetonitrilo al 5% y ácido fórmico (FA) al 0.1%. La elución se realizó con un gradiente linear 5-35% B en A durante 30 min. (A: 0.1% FA; B: ACN, 0.1% FA) a un flujo de 300nl/min.

Los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas nanoESI qQTOF (6600TripleTOF, ABSCIEX). El triple TOF se manejó en el modo de adquisición información-dependiente, en el que se realizó un barrido TOF-MS de 0.26 s y 350-1250 m/z, seguido de otro barrido de 0.05 s y 100-1600 m/z de los 50 iones producto cargados (2-5) más intensos. La sensibilidad del sistema se monitorizó con 2 fmol de una mezcla patrón de 6 proteínas (LC Packings).

Se utilizó el motor de búsqueda ProteinPilot v4.6 (ABSciex) con los parámetros por defecto para generar la lista de picos directamente de los ficheros wiff del equipo 6600TripleTOF. El algoritmo Paragón se utilizó para realizar la búsqueda en la base de datos de proteínas Expasy (616203 secuencias, 181334896 residuos) con los siguientes parámetros: *trypsin specificity*, *Cys-alkylation*, restricción taxonómica a *Human* y *search effort* ajustado en *through*.

Análisis estadístico

El análisis estadístico para comparar los resultados obtenidos en cada uno de los grupos clínicos se realizó utilizando los programas SPSS 15.0 (IBM) y GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS

Los autores de la presente invención han analizado la presencia de proteínas en muestras de aire exhalado de pacientes con cáncer de pulmón, en comparación con donantes sanos, con o sin factor de riesgo (tabaquismo), y también en comparación con otra patología pulmonar no neoplásica (EPOC). Se presentan resultados que

demuestran que las proteínas presentes en el aire exhalado pueden ser usadas como marcadores para un sistema de cribado del cáncer de pulmón.

En total se identificaron 348 proteínas, que en la Figura 1 se representan mediante el número de péptidos identificados de cada una de ellas. El número de péptidos identificados para cada proteína se muestra con una gradación de color, aumentando desde el rojo-naranja hasta el amarillo–verde. Aunque se observó variabilidad entre las distintas muestras, el análisis de los resultados como a continuación se detalla, permite concluir que las proteínas presentes en el aire exhalado pueden ser usadas como marcadores para un sistema de cribado del cáncer de pulmón.

1.- En pacientes con cáncer de pulmón se identifica un número significativamente mayor de proteínas en el aire exhalado.

Como se puede observar en la Figura 2, en aquellas muestras correspondientes al grupo CP se identificó un mayor número de proteínas. De hecho, al analizar el número de proteínas identificado en cada grupo, no solo el número medio de proteínas identificado por pacientes fue significativamente más elevado, sino que un 42% de las 384 proteínas identificadas en total se encuentran únicamente en el grupo de pacientes con CP. Para examinar el potencial valor diagnóstico que proporcionaría el número total de péptidos o proteínas identificado en cada paciente se realizó un análisis mediante curvas ROC ("receiver operating characteristic curve") que se muestra en la Figura 3. Los resultados muestran que el parámetro AUC (área bajo la curva) para el total de péptidos es 0.6, y para el total de proteínas es de 0.8, indicando que el número total de proteínas identificadas en una muestra de aire exhalado posee valor diagnóstico. Si establecemos un punto de corte de >12 proteínas, podremos identificar a aquellos pacientes con cáncer de pulmón con un 70% de sensibilidad y un 67% de especificidad.

2.- Algunas proteínas se identifican mucho más a menudo en pacientes con cáncer de pulmón en comparación con los demás grupos control.

Se ha observado una mayor presencia de algunas proteínas en pacientes con cáncer de pulmón (Figura 4). Es el caso de la hemoglobina, una proteína que se sabe que se expresa en las células epiteliales del alveolo pulmonar. Otras proteínas detectadas también con más frecuencia en pacientes de cáncer de pulmón fueron varias isoformas de histonas, concretamente la isoforma 2A, cuyos elevados niveles extracelulares se ha relacionado con varias patologías pulmonares. Por tanto, la

presencia de algunas proteínas concretas en el aire exhalado puede constituir un marcador de cáncer de pulmón.

3.- En muestras de aire exhalado de pacientes con cáncer de pulmón se detectan más péptidos correspondientes a algunas isoformas de citoqueratinas.

Debido a que el mayor número de péptidos y proteínas correspondían a distintas isoformas de citoqueratinas se realizó un análisis más detallado de las mismas. Para ello, se realizó una estimación de la cantidad de proteína, basándose en el número de péptidos detectados en cada caso. Como muestra la Figura 5 en los pacientes con cáncer de pulmón se detectó una cantidad significativamente mayor de algunas isoformas de citoqueratinas. Concretamente, la cantidad de varias isoformas de citoqueratinas 6 fue significativamente mayor en las muestras procedentes de pacientes con cáncer de pulmón. Se sabe que algunos cambios específicos en la expresión de citoqueratinas de las células epiteliales del tracto respiratorio se correlacionan con la progresión desde lesiones pre-neoplásicas a neoplásicas. Además, se ha descrito que el gen que codifica para la citoqueratina 6A (KRT6A) se sobreexpresa unas 10 veces en cáncer de pulmón del tipo epidermoide. En nuestro estudio, se halló además una correlación entre el número de péptidos identificados correspondientes a algunas isoformas de citoqueratinas, y el tamaño de la lesión tumoral (Figura 6).

REIVINDICACIONES

1.- Un método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,

b) determinar la cantidad total y/o concentración de proteínas en la muestra (a).

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

c) incluir al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón si presenta un número de proteínas distintas mayor de 6, preferiblemente mayor de 9, más preferiblemente mayor de 12 proteínas distintas.

3.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que además comprende:

d) determinar adicionalmente la concentración de hemoglobina (subunidad beta), citoqueratina 6A, citoqueratina 6B, citoqueratina 6C, e histona 2A, en la muestra biológica del paso (a).

4.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón si presenta una concentración de hemoglobina mayor o igual a 0,07 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,08 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,09 μg/ml, aún más preferiblemente mayor o igual a 0,1μg/ml.

5.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende incluir al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón si presenta una concentración de citoqueratina 6A mayor o igual a 0,35 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,37 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,4 μg/ml.

6.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que además comprende incluir al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón si presenta una concentración de citoqueratina 6B mayor o igual a 0,25 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,27 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,3 μg/ml.

7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que además comprende incluir al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón si presenta una concentración de citoqueratina 6C mayor o igual a 0,15 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,17 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,2 μg/ml.

8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que además comprende incluir al individuo del paso (a) en el grupo de individuos con cáncer de pulmón si presenta una concentración de histona 2A mayor o igual a 0,15 μg/ml, preferiblemente mayor o igual a 0,17 μg/ml, más preferiblemente mayor o igual a 0,2 μg/ml.

9.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado.

10.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

11.- Un método de clasificación de pacientes con cáncer de pulmón, que comprende los pasos según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y además comprende determinar la concentración de citoqueratina 10.

12.- El método de clasificación de pacientes según la reivindicación anterior, que además comprende incluir al individuo del grupo (a) en el grupo de individuos con adenocarcinoma si presenta una concentración de citoqueratina 10 menor a 1,5 μg/ml, preferiblemente menor a 1,2 μg/ml, y más preferiblemente menor a 1 μg/ml.

13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado.

14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde el cáncer es cáncer de pulmón.

15.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, donde la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

16.- Un método para el seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor que comprende los pasos (a)-(b) según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, y además comprende determinar las variaciones de las isoformas de la citoqueratina 6 en dos tiempos, un tiempo t1 y un tiempo t2.

17.- El método para el seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor según la reivindicación anterior, t1 es 0 (momento inicial), y t2 va desde 1 día en adelante.

18.- El método para el seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor según cualquiera de las reivindicaciones 16-17, donde t2 es 365 días.

19.- El método para el seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor según cualquiera de las reivindicaciones 16-18, que además comprende asignar al individuo del paso (a) un mayor tamaño tumoral si la cantidad de citoqueratina 6 en t1 es menor que en t2.

20.- El método para el seguimiento de la progresión del cáncer y/o el crecimiento del tumor según cualquiera de las reivindicaciones 16-19, donde la muestra biológica es una muestra de aire exhalado o lavado brocoalveolar, preferiblemente es aire exhalado.

21.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 16-20, donde el cáncer es cáncer de pulmón.

22.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 16-21, donde la determinación de las proteínas de la muestra (a) se realiza por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).

23.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios llevara a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1-22, y preferiblemente comprende cebadores y sondas obtenidas de las secuencias de la Tabla 1, útiles para cuantificar la expresión de los genes *HBB, KRT6A*, *KRT6B,* KRT6C, KRT10, y *HIST2H2AC*, o cualquiera de sus combinaciones.

24.- El uso del kit o dispositivo según la reivindicación anterior, para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer, preferiblemente del cáncer de pulmón.

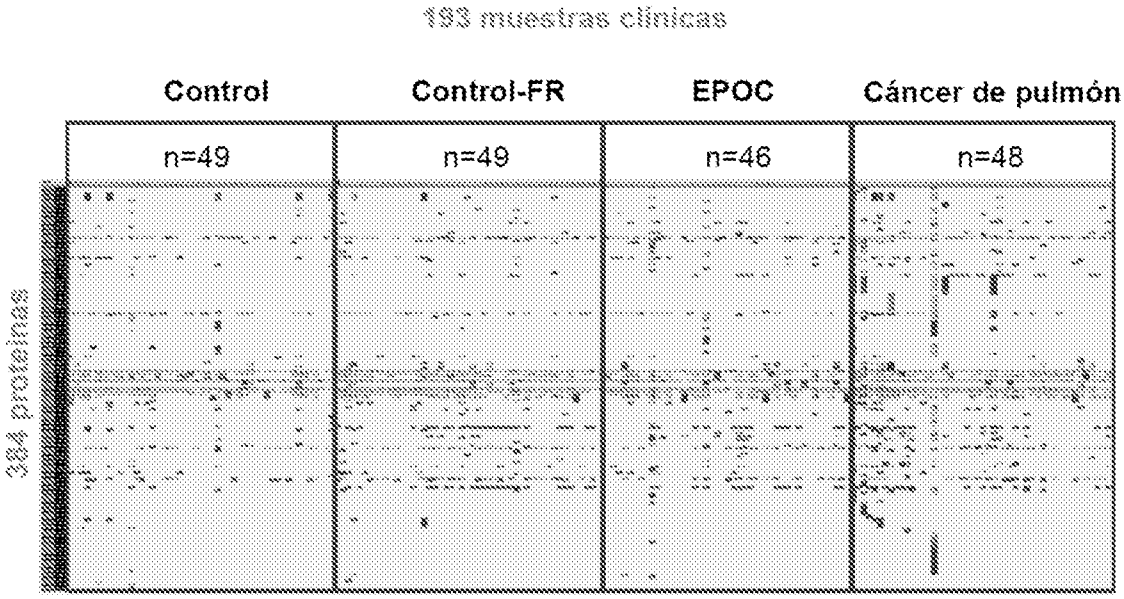
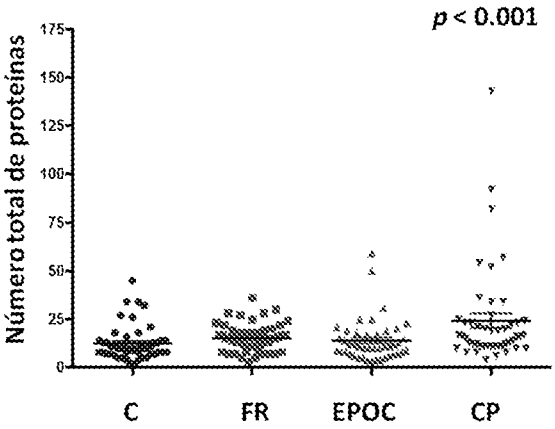

193 muestras clínicas
Control
Control-FR
EPOC
Cáncer de pulmón
n=49
n=49
n=46
n=48
384 proteínas

Fig.1



El número medio de proteínas identificado por pacientes es significativamente más alto en pacientes con cáncer de pulmón.

Una gran mayoría (42%) del total de 384 proteínas identificadas se encuentran solamente en el grupo de pacientes con cáncer de pulmón.

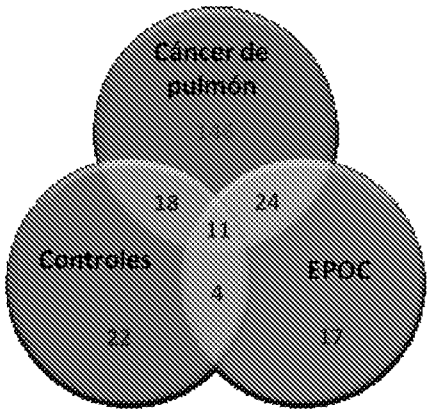
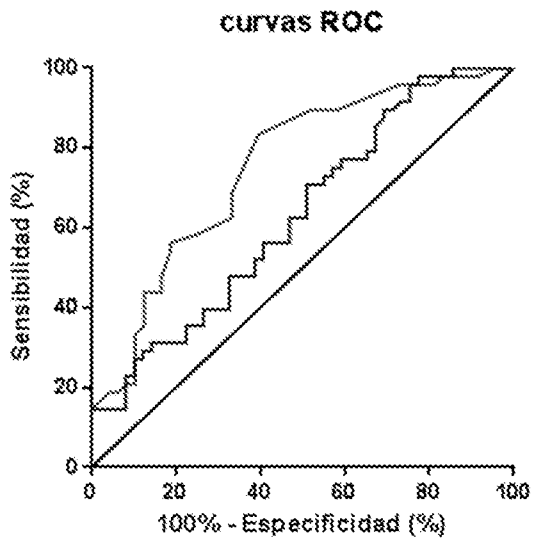


Fig.2



PEPTIDOS por paciente
Área bajo la curva: 0.6301
Error estándard: 0.05616
Intervalo de confianza: 0.5200-0.7402
Valor de p: 0.02730

PROTEÍNAS por paciente
Área bajo la curva: 0.7528
Error estándard: 0.04964
Intervalo de confianza: 0.6555-0.8501
Valor de p: <0.0001

Fig.3

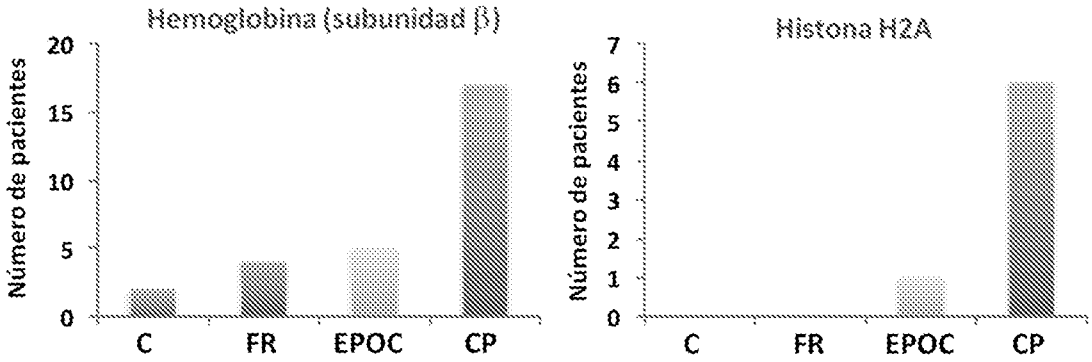

Hemoglobina (subunidad β)
Número de pacientes
20
15
10
5
0
C
FR
EPOC
CP
Histona H2A
Número de pacientes
7
6
5
4
3
2
1
0
C
FR
EPOC
CP

Fig.4

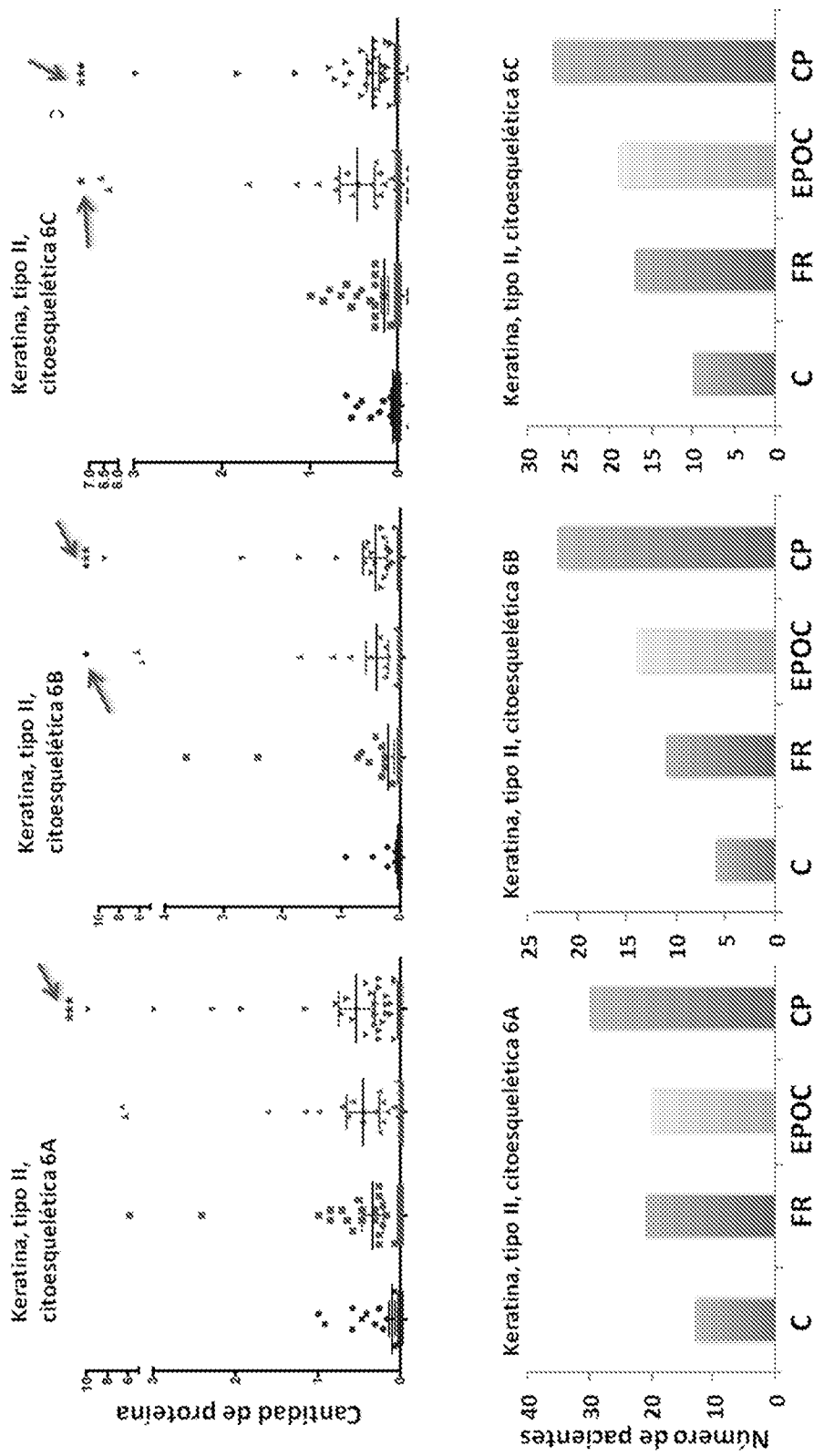

Keratina, tipo II, citoesquelética 6A
Keratina, tipo II, citoesquelética 6B
Keratina, tipo II, citoesquelética 6C
Cantidad de proteína
Keratina, tipo II, citoesquelética 6A
Keratina, tipo II, citoesquelética 6B
Keratina, tipo II, citoesquelética 6C
Número de pacientes
C
FR
EPOC
CP

Fig.5

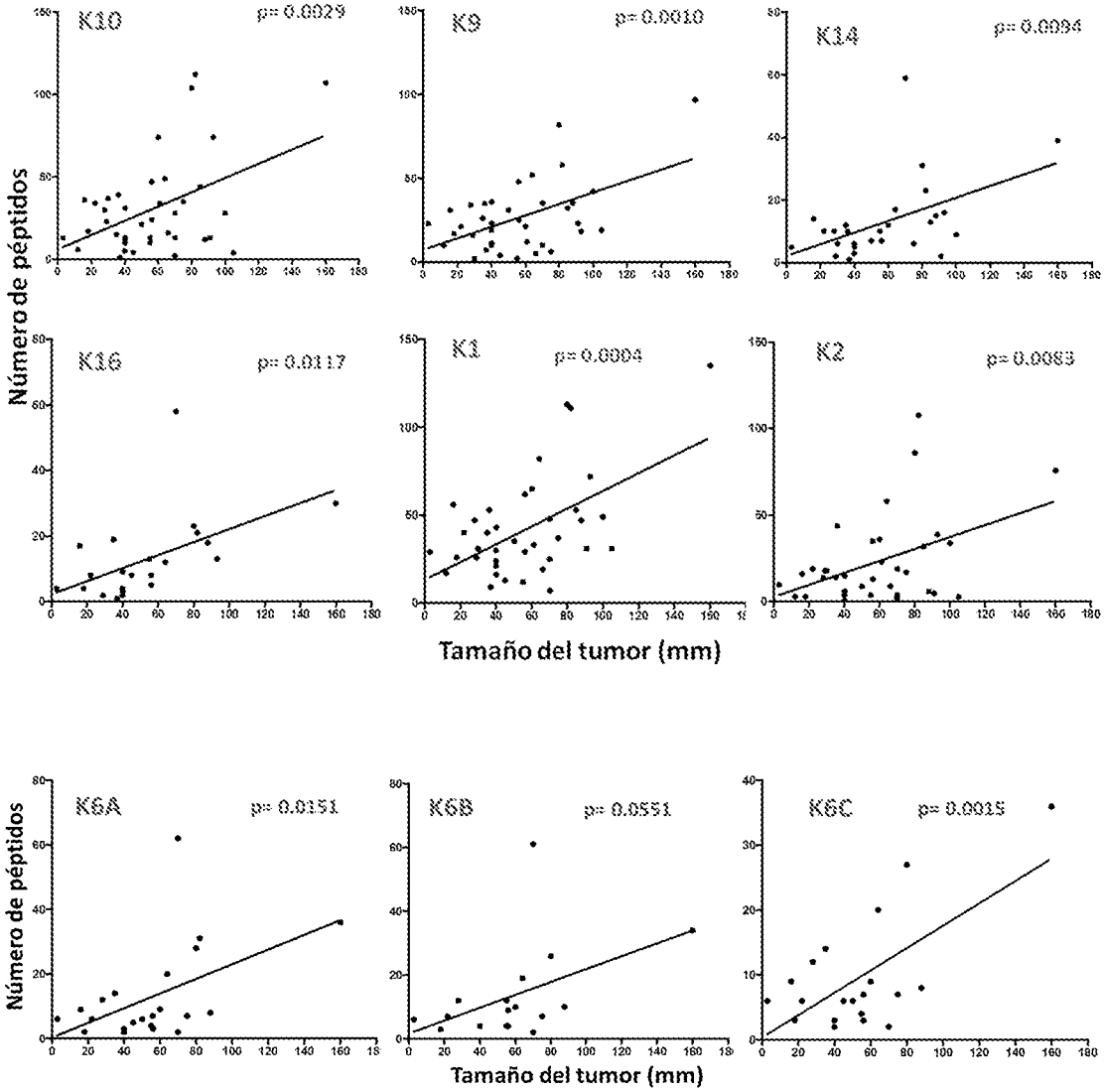

K10
p= 0.0029
K9
p= 0.0010
K14
p= 0.0094
K16
p= 0.0117
K1
p= 0.0004
K2
p= 0.0063
Número de péptidos
Tamaño del tumor (mm)
K6A
p= 0.0151
K6B
p= 0.0551
K6C
p= 0.0015
Número de péptidos
Tamaño del tumor (mm)

Fig.6

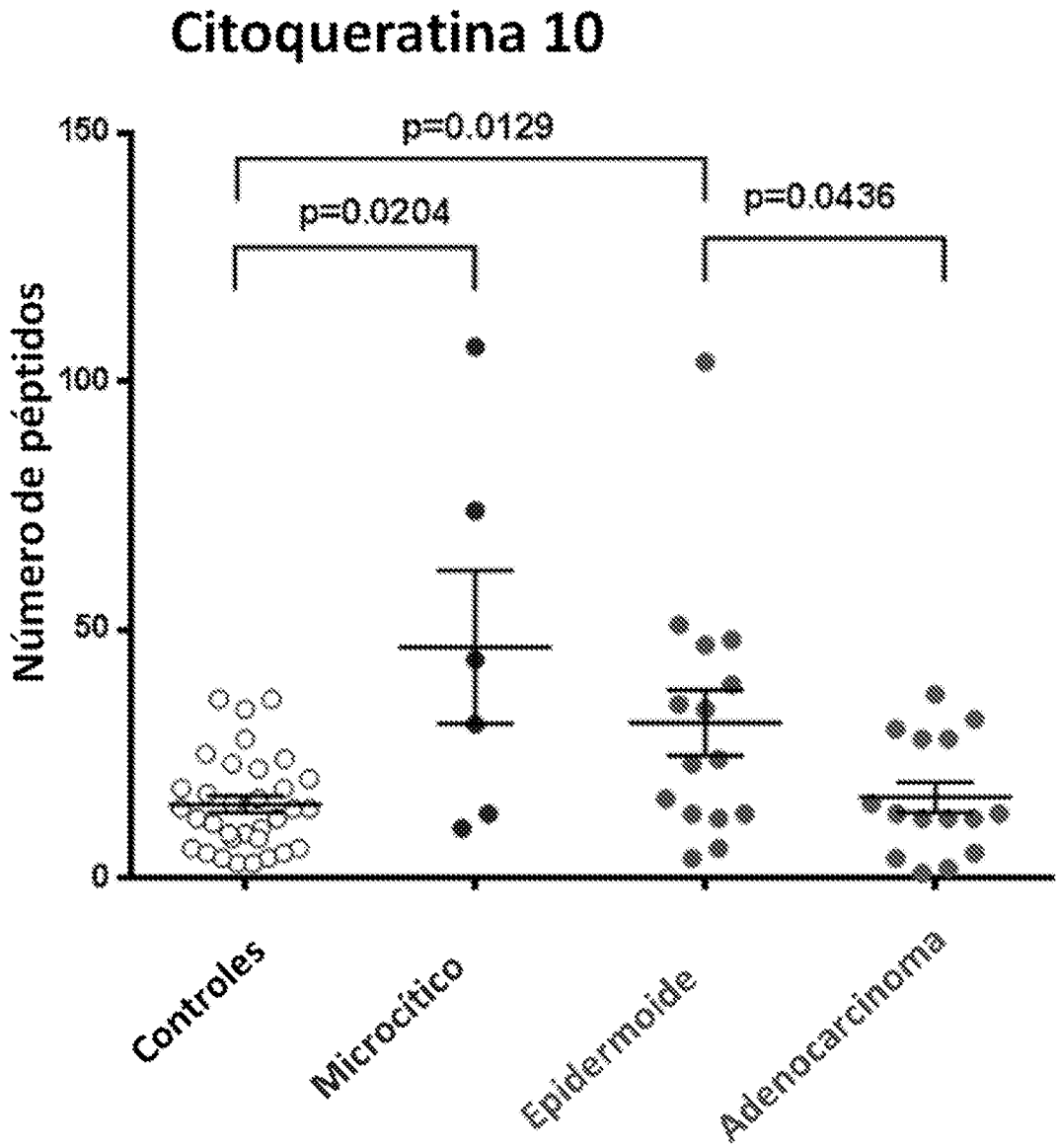

Citoqueratina 10
p=0.0129
p=0.0204
p=0.0436
Número de péptidos
150
100
50
0
Controles
Microcítico
Epidermoide
Adenocarcinoma

Fig.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2015/070887

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)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	05/11/2013, SHAOMIN Li et al. Proteomic analysis of non-small cell lung cancer tissue interstitial fluids. Word journal of Surgical Oncology 2013,11: 173.	1, 2, 9, 10, 13, 14, 15, 20-24.
X	24/10/2011, SONG QI-BIN et al. Identification of serum biomarkers for lung cancer using magnetic bead-based SELDI-TOF-MS.Acta Pharmacologica Sinica . 24/10/2011.VOL: 32 No: 12 Pags: 1537-1542 ISSN 1671-4083(print) ISSN 1745-7254(electronic) Doi: doi:10.1038/aps.2011.137	1, 2, 21-24

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

* Special categories of cited documents:	
"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)	
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"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
	"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
	"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
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 29/02/2016	Date of mailing of the international search report **(02/03/2016)**
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 04	Authorized officer J. Manso Tomico Telephone No. 91 3495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2015/070887

C (continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	30/11/2012, TESSITORE ALESSANDRA et al. Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors..International journal of proteomics Egypt 2013 00/00/2013 VOL: 2013 Pags: 125858 ISSN 2090-2166 (Print) Doi: doi:10.1155/2013/125858 pubmed:23401773	1, 2, 21-24
X	WO 2011150974 A1 (PORTO CONTE RICERCHE S R L ET AL.) 08/12/2011, claims	1,2
X	WO 2008114917 A1 (PROTAN BIO CO LTD ET AL.) 25/09/2008, claim 1.	1, 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2015/070887

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

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

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

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

See extra sheet

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1, 2, 9, 10, 13, 14, 15, 20-24**

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International application No.
PCT/ES2015/070887

Continuation of Box III

Invention 1 (claims 1, 2, 9, 10, 13, 14, 15, 20-24, all in part)

Method and kit for the screening of patients with lung cancer, by means of total protein content quantification.

Invention 2 (claims 3-24, all in part)

Method and kit for the screening of patients with lung cancer, by means of total hemoglobin subunit beta content quantification.

Inventions 3 to 7 (claims 3-24, all in part)

Identical to above for each of the proteins that appear in claim 2, plus that corresponding to the cytokeratin 10 of claims 11 and 12.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/ES2015/070887

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO2011150974 A1	08.12.2011	US2013078642 A1	28.03.2013
		EP2577313 A1	10.04.2013
WO2008114917 A1	25.09.2008	US2012252039 A1	04.10.2012
		US8911951 B2	16.12.2014
		US2010285507 A1	11.11.2010
		KR100846354B B1	15.07.2008

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2015/070887

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)
EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE, BIOSIS.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	05/11/2013, SHAOMIN Li et al. Proteomic analysis of non-small cell lung cancer tissue interstitial fluids. Word journal of Surgical Oncology 2013,11: 173.	1, 2, 9, 10, 13, 14, 15, 20-24.
X	24/10/2011, SONG QI-BIN et al. Identification of serum biomarkers for lung cancer using magnetic bead-based SELDI-TOF-MS.Acta Pharmacologica Sinica . 24/10/2011.VOL: 32 No: 12 Pags: 1537-1542 ISSN 1671-4083(print) ISSN 1745-7254(electronic) Doi: doi:10.1038/aps.2011.137	1, 2, 21-24

☒ 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:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"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).

"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.

"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.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"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.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
29/02/2016	**02 de marzo de 2016 (02/03/2016)**
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 J. Manso Tomico Nº de teléfono 91 3495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2015/070887

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	30/11/2012, TESSITORE ALESSANDRA et al. Serum biomarkers identification by mass spectrometry in high-mortality tumors..International journal of proteomics Egypt 2013 00/00/2013 VOL: 2013 Pags: 125858 ISSN 2090-2166 (Print) Doi: doi:10.1155/2013/125858 pubmed:23401773	1, 2, 21-24
X	WO 2011150974 A1 (PORTO CONTE RICERCHE S R L ET AL.) 08/12/2011, reivindicaciones	1,2
X	WO 2008114917 A1 (PROTAN BIO CO LTD ET AL.) 25/09/2008, reivindicación 1.	1, 2

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2015/070887

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

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

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

2. ☐ Las reivindicaciones nºs:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

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

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

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

Ver Recuadro Suplementario

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

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

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

4. ☒ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones **nºs: 1, 2, 9, 10, 13, 14, 15, 20-24**

Indicación en cuanto a la protesta

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

SUPLEMENTARIO DE REC. III

- *Invención 1* (reivindicación 1, 2, 9, 10, 13, 14,15, 20-24 todas en parte)

Método y Kit para el cribado de pacientes con cáncer de pulmón mediante la cuantificación de la cantidad total de proteínas.

- *Invención 2* (reivindicación 3-24 todas en parte)

Método y Kit para el cribado de pacientes con cáncer de pulmón mediante la cuantificación de la cantidad total de hemoglobina subunidad beta.

- *Invenciones 3 a 7* (reivindicaciones 3-24 todas en parte)

Idénticas a la anterior para cada una de las proteínas que aparecen en la reivindicación 2, más la que corresponde a la citoqueratina 10 de las reivindicaciones 11, 12.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/070887

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO2011150974 A1	08.12.2011	US2013078642 A1	28.03.2013
		EP2577313 A1	10.04.2013
WO2008114917 A1	25.09.2008	US2012252039 A1	04.10.2012
		US8911951 B2	16.12.2014
		US2010285507 A1	11.11.2010
		KR100846354B B1	15.07.2008