

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 732**

21 Número de solicitud: 201331228

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

05.08.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.04.2015

Fecha de la concesión:

14.04.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.04.2016

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2014/070640

73 Titular/es:

**SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (50.0%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES y
UNIVERSIDAD DE CORDOBA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**JURADO GÁMEZ, Bernabé;
SALVATIERRA VELÁZQUEZ, Ángel;
CALDERÓN SANTIAGO, Mónica;
PRIEGO CAPOTE, Feliciano y
LUQUE DE CASTRO, María Dolores**

74 Agente/Representante:

TEMIÑO CENICEROS, Ignacio

54 Título: **MÉTODO DE CLASIFICACIÓN, DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE INDIVIDUOS CON RIESGO DE PADECER CÁNCER DE PULMÓN MEDIANTE EL ANÁLISIS DE SUDOR**

57 Resumen:

Método de clasificación, diagnóstico y seguimiento de individuos con riesgo de padecer cáncer de pulmón mediante el análisis de sudor.

Método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón, kit de clasificación, diagnóstico y seguimiento, y usos.

ES 2 534 732 B1

DESCRIPCIÓN

Método de clasificación, diagnóstico y seguimiento de individuos con riesgo de padecer cáncer de pulmón mediante el análisis de sudor

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la Biología Molecular y la Medicina. Específicamente, se refiere a un método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón mediante el análisis de los biomarcadores descritos en la tabla 1, especialmente la fenilalanina, ácido nonanedioico, ácido subérico, MG (22:2) y maltotetraosa en una muestra biológica, preferiblemente sudor.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer de pulmón posee actualmente la mayor tasa de mortalidad en todo el mundo. Según la Sociedad Americana del Cáncer, el cáncer de pulmón causa más muertes que la suma de los tres tipos de cáncer más comunes (colon, mama y próstata) [World Health
15 Organization. Cancer fact sheet No. 297. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Published 2012. Accessed October 26,2012.]. La alta tasa de mortalidad en este cáncer se debe principalmente a que por lo general se detecta en una etapa avanzada (Lewis DR, Chen, HS, Feurer EJ, *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008 . Bethesda, MD : National Cancer Institute; 2010.) y al contrario de otros
20 cánceres (mama, colon y próstata) no se ha implementado un método de cribado válido. Por otra parte las pruebas disponibles para el diagnóstico de este tipo de cáncer son invasivas y caras y, por lo tanto, no pueden ser utilizadas de manera rutinaria en un programa de diagnóstico precoz de cáncer de pulmón. Por esta razón, la investigación que se ha desarrollado sobre los niveles moleculares y proteicos tiene dos fines principales: entender
25 el desarrollo y la biología del cáncer de pulmón, e identificar biomarcadores para detectar la enfermedad. Actualmente es interesante el uso de la metabolómica para la búsqueda de biomarcadores en diagnóstico clínico, ya que muchas de las herramientas analíticas utilizadas en metabolómica son automatizables y sobre todo de alto rendimiento. Estas herramientas se prestan para la clasificación y discriminación de personas con una
30 enfermedad (Priego Capote F, Luque de Castro MD, Álvarez-Sánchez B. Analytical platforms in metabolomics. Encyclopedia of Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, 2012.DOI:10.1002/9780470027318.a9240).

A pesar de que el suero y la orina son los biofluidos humanos más utilizados en el análisis clínico, se están proponiendo otros como el sudor, saliva o lágrimas. Estos biofluidos se recogen fácilmente y de manera no invasiva, concretamente en el caso del sudor no existe restricción alguna en el muestreo.

5

A diferencia de la numerosa investigación que existe cuando las muestras son el suero o la orina, el sudor ha recibido atención escasa. Probablemente se ha debido a la dificultad para su muestreo en cantidades suficientes para realizar el trabajo analítico. Sin embargo, la sensibilidad de los instrumentos analíticos disponibles actualmente hace posible determinar metabolitos utilizando un pequeño volumen de muestra. Además, la recogida de sudor también se ha mejorado y permite que los muestreadores operen de una manera eficiente y reproducible.

El principal componente del sudor es el agua, pero también contiene sales y metabolitos tales como urea o lactato (Huang CT, Chen ML, Huang LL, Mao IF. Uric acid and urea in human sweat. *Chin. J. Physiol.* 45, 109–115, 2002). El sudor es producido por las glándulas sudoríparas y entre sus funciones más importantes destacan: controlar la temperatura del cuerpo, eliminar algunos productos de desecho de la sangre o proteger la piel por un pH ácido y mediante la excreción de algunos péptidos antimicrobianos. Las células cancerosas modifican el metabolismo de los diferentes tipos de compuestos (Meijera TWH, Schuurbiersb OCJ, Kaandersa JA, *et al.*, Differences in metabolism between adeno- and squamous cell non-small cell lung carcinomas: Spatial distribution and prognostic value of GLUT1 and MCT4. *Lung Cancer* 76 (2012) 316– 323) y pueden cambiar la vía por el que se excretan algunos productos de desecho.

25

Uno de los problemas relativos al diagnóstico del cáncer de pulmón es que los tests disponibles son caros e inviables para ser aplicados a toda la población diana, es decir, en riesgo de padecer cáncer de pulmón (Wegwarth O, Schwartz LM , Woloshin S , Gaissmaier W , Gigerenzer G. Do physicians understand cancer screening statistics? A national survey of primary care physicians in the United States . *Ann Intern Med* . 2012 ; 156 (5): 340 - 349). Por lo tanto, es necesaria una prueba más barata, no invasiva, repetible, no dolorosa y que en la que la recogida de la muestra pueda realizarse en cualquier escalón asistencial. Esta prueba preliminar tendría una gran aplicabilidad clínica, ya que permitiría reducir la población en estudio mediante la eliminación de los individuos del grupo categórico "no"

(aquellos que presentan mínimas probabilidades de padecer cáncer de pulmón). Por esta razón, lo más importante en un modelo de predicción es obtener una cantidad reducida de falsos negativos, mientras que la probabilidad de falsos positivos no es tan importante, porque la enfermedad puede ser confirmada con otra prueba.

5

Por tanto, supondría un avance notable desarrollar un método y un kit o dispositivo de diagnóstico que mediante la determinación de una serie de marcadores en sudor, permita diagnosticar y pronosticar enfermedades como el cáncer en general, y más concretamente el cáncer de pulmón, determinando estos marcadores, por ejemplo, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-TOF/MS), y la creación de un modelo de predicción con una cantidad pequeña de falsos negativos, capaz de reducir la población que ha de someterse a un estudio en profundidad más agresivo para el diagnóstico.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los metabolitos identificados y recogidos en la tabla 1, la maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico, el trisacárido fosfato, la fenilalanina, la histidina, la taurina, la citrulina, un lípido sulfónico, el ácido urocánico y el triptófano, para la clasificación, el diagnóstico y el seguimiento del cáncer.

Preferiblemente, se refiere a la determinación de la cantidad y/o concentración de los metabolitos identificados y recogidos en la tabla 1, la maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico, el trisacárido fosfato, la fenilalanina, la histidina, la taurina, la citrulina, un lípido sulfónico, el ácido urocánico y el triptófano, para la clasificación, el diagnóstico y el seguimiento del cáncer. Aunque se puede emplear cualquier metabolito, o cualquiera de sus combinaciones, más preferiblemente la determinación de los metabolitos es simultánea. En otra realización preferida, se determinan simultáneamente los metabolitos maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico y el trisacárido fosfato (GRUPO I). En otra realización preferida, además se determinan simultáneamente los metabolitos fenilalanina, histidina y taurina (GRUPO II). En otra realización preferida, además se determinan simultáneamente los metabolitos citrulina, lípido sulfónico, ácido urocánico y triptófano (GRUPO III).

En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer es el cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la muestra biológica es el sudor.

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

- a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,
 - b) determinar la cantidad y/o concentración de los metabolitos que se seleccionan de la lista que consiste en: maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico y el trisacárido fosfato.
- 10

En una realización preferida, el primer método de la invención comprende además determinar la cantidad y/o concentración los metabolitos fenilalanina, la histidina y la taurina en el paso (b). En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende determinar la cantidad y/o concentración de los metabolitos fenilalanina, la histidina y la taurina en el paso (b).

15

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

- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
- 20

En una realización preferida del método de la invención, los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados. Los metabolitos que se determinan en el paso (b) pueden determinarse individualmente, o se puede determinar cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, se determinan simultáneamente los metabolitos del GRUPO I, aún más preferiblemente se determinan además los metabolitos del GRUPO II, y aún más preferiblemente, se determinan además simultáneamente los metabolitos del GRUPO III. Más preferiblemente, se determinan simultáneamente todos los metabolitos.

25

30

En otra realización preferida, la muestra biológica del paso (a) es el sudor. En otra realización preferida, el cáncer es el cáncer de pulmón.

5 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de clasificación y diagnóstico del cáncer, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los paso (a)-(c) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con escasa probabilidad de padecer cáncer (alto valor predictivo negativo) cuando presentan un perfil de concentración estadísticamente diferente del establecido como referencia mediante los algoritmos adecuados.

10

En una realización preferida del método de la invención, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es una muestra de sudor. En otra realización preferida, el cáncer es el cáncer de pulmón.

15 Otro aspecto de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución del cáncer, que comprende los pasos (a) – (c) del método según el primer método de la invención, y además:

- d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

20

En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer es el cáncer de pulmón. En otra realización preferida, la muestra biológica del paso (a) es el sudor.

25 La determinación de los metabolitos se puede hacer por cualquier medio conocido por el experto en la materia. En otra realización preferida, la determinación de la cantidad y/o concentración metabolitos se realiza mediante una cromatografía líquida LC conectada a un detector de masas (MS) de tiempo de vuelo (TOF/MS) con ionización mediante electrospray (ESI) dual.

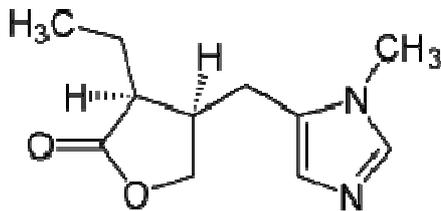
30 La determinación la cantidad y/o concentración metabolitos, se puede hacer, por ejemplo, mediante un sistema indicador preparado sobre un soporte sólido (papel o sorbente sólido)

en el que se han inmovilizado reactivos selectivos o específicos para los compuestos identificados como marcadores.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para la determinación la cantidad y/o concentración de los metabolitos que se han descrito en los métodos de la invención.

En una realización preferida, el kit o dispositivo de la invención es un kit de partes, que comprende un componente A, formado por un dispositivo para provocar el sudor, y un componente B, que comprende un sistema indicador que absorbe el sudor.

El componente A puede comprender una composición, preferiblemente con un principio activo colinérgico, y más preferiblemente la pilocarpina, o cualquiera de sus sales, ésteres, taurómeros o derivados, de Fórmula (I).



Fórmula (I)

El componente B puede ser únicamente un sistema que absorba el sudor, o puede servir, a su vez, para llevar a cabo el análisis. Por ejemplo, puede ser un sistema indicador preparado sobre un soporte sólido (papel o sorbente sólido) en el que se han inmovilizado reactivos selectivos o específicos para los compuestos identificados como marcadores.

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

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es sudor.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Modelo PLS-DA construido para la discriminación del cáncer de pulmón. Cuadrado: cáncer de pulmón, triángulo: sin cáncer de pulmón.

5 **Figura 2.** Curvas ROC de la fenilalanina, ácido nonanedioico, ácido subérico, MG (22:2) y maltotetraosa, incluyendo el cálculo de pAUC para el rango de especificidad entre 90–100%.

Figura 3. Análisis por componentes principales (PCA) utilizando los perfiles de metabolitos obtenidos mediante análisis de las muestras de pool preparadas a partir de los individuos de cada uno de los tres grupos (■ individuos con cáncer de pulmón; ● individuos control sanos no fumadores y ▲ individuos control sanos fumadores). La caracterización se hizo mediante LC–TOF/MS en modo de ionización positivo.

10

Figura 4. Análisis supervisado mediante PLS-DA utilizando los perfiles de metabolitos obtenidos mediante análisis de las muestras de pool preparadas a partir de los individuos de cada uno de los tres grupos (individuos con cáncer de pulmón; individuos control sanos no fumadores e individuos control sanos fumadores). La caracterización se hizo mediante LC–TOF/MS en modo de ionización positivo. Se observa la discriminación entre pacientes con cáncer (■) e individuos sanos (▲).

15

Figura 5. Análisis por componentes principales (PCA) utilizando los perfiles de metabolitos obtenidos mediante análisis de las muestras de pool preparadas a partir de los individuos de cada uno de los tres grupos (■ individuos con cáncer de pulmón; ● individuos control sanos no fumadores y ▲ individuos control sanos fumadores). La caracterización se hizo mediante LC–TOF/MS en modo de ionización negativo.

20

Figura 6. Análisis supervisado mediante PLS-DA utilizando los perfiles de metabolitos obtenidos mediante análisis de las muestras de pool preparadas a partir de los individuos de cada uno de los tres grupos (individuos con cáncer de pulmón; individuos control sanos no fumadores e individuos control sanos fumadores). La caracterización se hizo mediante LC–TOF/MS en modo de ionización negativo. Se observa la discriminación entre pacientes con cáncer (■) e individuos sanos (▲).

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han analizado la concentración de los distintos metabolitos del sudor en individuos que no padecen cáncer de pulmón y en individuos que padecen cáncer de pulmón. Han encontrado una serie de marcadores para el diagnóstico de los individuos con cáncer de pulmón, diferenciando los sujetos con cáncer de pulmón de aquéllos que no lo padecen. Esto, entre otras cosas, permitiría hacer un cribado inicial para diferenciar aquellos individuos que serían susceptibles de ser sometidos a otras pruebas diagnósticas, más agresivas o caras, y/o confirmar o apoyar el diagnóstico mediante otras pruebas. Así pues, la presente invención proporciona un método de obtención de datos útiles para la clasificación, diagnóstico y seguimiento de individuos con cáncer de pulmón.

Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los metabolitos identificados y recogidos en la tabla 1, maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico, el trisacárido fosfato, fenilalanina, la histidina, la taurina, citrulina, lípido sulfónico, ácido urocánico y triptófano, para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer.

Preferiblemente, se refiere a la determinación de la cantidad y/o concentración de los metabolitos identificados y recogidos en la tabla 1, maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico, el trisacárido fosfato, fenilalanina, la histidina, la taurina, citrulina, lípido sulfónico, ácido urocánico y triptófano, para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer. Aunque se puede emplear cualquier metabolito, o cualquiera de sus combinaciones, más preferiblemente la determinación de los metabolitos es simultánea. En otra realización preferida, se determinan simultáneamente los metabolitos maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico y el trisacárido fosfato (GRUPO I). En otra realización preferida, además se determinan simultáneamente los metabolitos fenilalanina, la histidina y la taurina (GRUPO II). En otra realización preferida, además se determinan simultáneamente los metabolitos citrulina, lípido sulfónico, ácido urocánico y triptófano (GRUPO III).

30

En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer es el cáncer de pulmón. Aún más preferiblemente, la muestra biológica es el sudor.

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

- 5 a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,
 b) determinar la cantidad y/o concentración de los metabolitos que se seleccionan de la lista que consiste en: maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico y el trisacárido fosfato.

10 En una realización preferida, el primer método de la invención comprende además determinar la cantidad y/o concentración los metabolitos fenilalanina, la histidina y la taurina en el paso (b). En otra realización preferida, el primer método de la invención además comprende determinar la cantidad y/o concentración los metabolitos fenilalanina, la histidina y la taurina en el paso (b).

15

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

- c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.

20 En una realización preferida del método de la invención, los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados. Los metabolitos que se determinan en el paso (b) pueden determinarse individualmente, o se puede determinar cualquiera de sus combinaciones. Más preferiblemente, se determinan simultáneamente los metabolitos del GRUPO I, aún más preferiblemente se determinan además los metabolitos
25 del GRUPO II, y aún más preferiblemente, se determinan además simultáneamente los metabolitos del GRUPO III. Más preferiblemente, se determinan simultáneamente todos los metabolitos.

30 En otra realización preferida, la muestra biológica del paso (a) es el sudor. En otra realización preferida, el cáncer es el cáncer de pulmón.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de clasificación y diagnóstico del cáncer, de ahora en adelante segundo método de la invención, que comprende los paso (a)-(c) según el primer método de la invención, y además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con escasa probabilidad de padecer cáncer (alto valor predictivo negativo) cuando presentan un perfil de concentración de los compuestos de componen el panel estadísticamente diferente del obtenido con una población control utilizado como referencia.

En una realización preferida del método de la invención, la muestra biológica aislada de un individuo del paso (a) es una muestra de sudor. En otra realización preferida, el cáncer es el cáncer de pulmón.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de seguimiento de la evolución del cáncer, que comprende los pasos (a) – (c) del método según el primer método de la invención, y además:

- d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

En una realización preferida de este aspecto de la invención el cáncer es el cáncer de pulmón. En otra realización preferida, la muestra biológica del paso (a) es el sudor.

La determinación de los metabolitos se puede hacer por cualquier medio conocido por el experto en la materia. En otra realización preferida, la determinación la cantidad y/o concentración metabolitos se realiza mediante una cromatografía líquida LC conectada a un detector de masas (MS) de tiempo de vuelo (TOF/MS) con ionización mediante electrospray (ESI) dual.

La determinación la cantidad y/o concentración metabolitos, se puede hacer, por ejemplo, mediante un sistema indicador preparado sobre un soporte sólido (papel o sorbente sólido) en el que se han inmovilizado reactivos selectivos o específicos para los compuestos identificados como marcadores.

Los tratamientos del cáncer de pulmón comunes incluyen cirugía, quimioterapia y radioterapia en el NSCLC (*non-small-cell lung carcinoma*) (Detterbeck FC, Lewis SZ; Diekemper R, Addrizzo-Harris DJ, Alberts WA. Executive summary diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians. Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. Chest 2013; 143(5)(Suppl):7S–37S), mientras que SCLC (*small-cell lung carcinoma*) está indicada la quimioterapia y ocasionalmente la radioterapia (Jett JR, Schild SE, Kesler KA, Kalemkerian GP. Treatment of small cell lung cancer. Chest 2013; 143(5)(Suppl):e400S–e419S.)

10

Tratamiento de cáncer de pulmón tipo NSCLC

El tratamiento para el cáncer de pulmón depende del tipo histológico del cáncer, de su diseminación (estadio) y del estado del paciente (edad, reserva funcional cardiorrespiratoria, *performance status*, comorbilidad, etc). Los tratamientos comunes incluyen la cirugía, la quimioterapia, la radioterapia y los cuidados paliativos,

15

La cirugía está indicada en los estadios precoces (I y II). En la mayoría de los subgrupos de pacientes en estadio III la terapia multimodal, con una combinación variable de cirugía y/o quimiorradioterapia. En estadio IV es una enfermedad tratable, pero no curable, y el tratamiento quimioterápico es de elección. La respuesta depende del estado funcional en el momento del diagnóstico y del tipo histológico y la presencia de algunas mutaciones genéticas que condicionan la respuesta a determinados fármacos.

20

Quimioterapia dirigida

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

30

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

El inhibidor de la angiogénesis Bevacizumab (Avastin) (en combinación con paclitaxel y carboplatino) mejora la supervivencia de los pacientes con carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Sin embargo, esto aumenta el riesgo de sangrado de los pulmones, sobre todo en los pacientes con carcinoma de células escamosas.

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

25

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

30

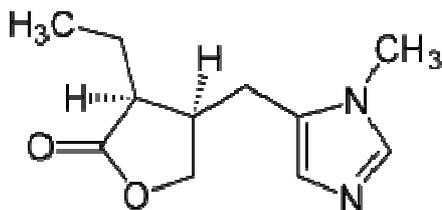
Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende un principio activo que se selecciona de entre complejos de coordinación de platino (cisplatino o carboplatino), gemcitabine, paclitaxel, docetaxel, etopósido, vinorelbina, pemetrexed,, gefitinib, erlotinib, bevacizumab, o cualquiera de sus combinaciones, en la
 5 elaboración de un medicamento para el tratamiento de un individuo con adenocarcinoma y/o carcinoma escamoso, identificables por el método de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para la determinación la cantidad y/o concentración de los metabolitos
 10 que se han descrito en los métodos de la invención.

En una realización preferida, el kit o dispositivo de la invención es un kit de partes, que comprende un componente A, formado por un dispositivo para provocar el sudor, y un componente B, que comprende una tira que absorbe el sudor.

15

El componente A puede comprender una composición, de ahora en adelante composición de la invención, que preferiblemente comprende un principio activo colinérgico o un agonista de los receptores muscarínicos, y más preferiblemente la pilocarpina, o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, profármacos, solvatos e hidratos farmacéuticamente aceptables,
 20 de Fórmula (I).



Fórmula (I)

El componente B puede ser únicamente una tira que absorba el sudor, o puede servir, a su vez, para llevar a cabo el análisis. Por ejemplo, puede ser un sistema indicador preparado
 25 sobre un soporte sólido (papel o sorbente sólido) en el que se han inmovilizado reactivos selectivos o específicos para los compuestos identificados como marcadores.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición que comprende un agente

colinérgico en la elaboración de un medicamento para el diagnóstico del cáncer, o
alternativamente a una composición que comprende un agente colinérgico para el
tratamiento del cáncer. Preferiblemente, el cáncer es el cáncer de pulmón. Otro aspecto de
la invención se refiere a una composición que comprende un agonista de los receptores
5 muscarínicos, en la elaboración de un medicamento para el diagnóstico del cáncer o,
alternativamente, a una composición que comprende un agonista de los receptores
muscarínicos para el tratamiento del cáncer. Preferiblemente, el cáncer es el cáncer de
pulmón. En una realización más preferida, el agonista de los receptores muscarínicos es la
pilocarpina o cualquiera de sus sales, ésteres, tautómeros, profármacos, solvatos e hidratos
10 farmacéuticamente aceptables.

El término "tautómero" o "forma tautomérica", tal y como se usa en la presente invención, se
refiere a isómeros estructurales de diferentes energías que son interconvertibles vía una
barrera de baja energía. Por ejemplo, tautómeros protónicos (también conocidos como
15 tautómeros prototrópicos) que incluyen interconversiones mediante la migración de un
protón, como por ejemplo isomerizaciones ceto-enólicas o imina-enamina. Los tautómeros
de valencia incluyen interconversiones por reorganización de algunos electrones de enlace.

El término "sal y/o, solvato farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier sal, éster,
20 solvato farmacéuticamente aceptable, o cualquier otro compuesto que, cuando se administra
a un receptor es capaz de proporcionar (directamente o indirectamente) un compuesto
según se describe en el presente documento. Sin embargo, se apreciará que las sales
farmacéuticamente no aceptables también están dentro del alcance de la invención ya que
éstas pueden ser útiles en la preparación de sales farmacéuticamente aceptables. El
25 término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones
que son tolerables fisiológicamente y no producen típicamente una reacción alérgica o una
reacción desfavorable similar, tal como trastorno gástrico, mareo y similares, cuando se
administran a un humano. Preferiblemente, el término "farmacéuticamente aceptable"
significa probado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o recogido en
30 la farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida generalmente para uso en
animales, y más particularmente en humanos. La preparación de sales y solvatos puede
llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, sales farmacéuticamente aceptables de compuestos previstos en el presente

documento se sintetizan mediante métodos químicos convencionales a partir de un compuesto original que contiene un resto básico o ácido. Generalmente, tales sales se preparan, por ejemplo, haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de los compuestos con una cantidad estequiométrica de la base o ácido apropiado en agua o en un disolvente orgánico o en una mezcla de los dos. Generalmente, se prefieren medios no acuosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo. Ejemplos de sales de adición de ácidos incluyen sales de adición de ácido mineral tales como clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, sulfato, nitrato, fosfato y sales de adición de ácido orgánico tales como, acetato, maleato, fumarato, citrato, oxalato, succinato, tartrato, malato, mandelato, metanosulfonato y *p*-toluenosulfonato. Ejemplos de sales de adición de bases incluyen sales inorgánicas tales como sales de sodio, potasio, calcio, amonio, magnesio, aluminio y litio, y sales de bases orgánicas tales como, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, *N,N*-dialquilenetanolamina, trietanolamina, glucamina y sales de aminoácidos básicos.

Cualquier compuesto que es un profármaco o prodroga de un compuesto de fórmula (I) está dentro del alcance de la invención. Los términos "profármaco" y "prodroga" se usan en su sentido más amplio y abarcan aquellos derivados que se convierten in vivo en los compuestos de la invención. Tales derivados serán evidentes para aquellos expertos en la técnica e incluyen, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la molécula y sin limitación, los siguientes derivados de los compuestos presentes ésteres, ésteres de aminoácido, ésteres de fosfato, ésteres de sulfonato de sales metálicas, carbamatos y amidas.

Los derivados profármacos o prodrogas particularmente favoritos son aquellos que aumentan la biodisponibilidad de los compuestos de esta invención cuando se administran tales compuestos a un paciente, o que potencian la liberación del compuesto original en un compartimento biológico con relación a la especie original.

El término "medicamento", tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a la composición de la invención, comprende un agente colinérgico y/o un agonista de los receptores muscarínicos, preferiblemente la pilocarpina o cualquiera de sus sales, profármacos, derivados, análogos o cualquiera de sus combinaciones en una concentración

determinada, para el diagnóstico e identificación de individuos con cáncer, y más concretamente, con cáncer de pulmón.

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

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica es sudor

Una “muestra biológica aislada” incluye, pero sin limitarse a, células, tejidos y/o fluidos
10 biológicos de un organismo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia. En la presente invención se refiere, preferiblemente, a una muestra de sudor.

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
15 pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, género y condición física.

La detección de los metabolitos que aparecen en la tabla 1, con especial énfasis en los metabolitos del GRUPO I en el sudor, puede realizarse por cualquier método capaz de
20 ofrecer una respuesta cuantitativa mediante cualquier técnica analítica (absorción molecular, fluorescencia, espectrometría de masas, etc) en función e la concentración del compuesto de interés.

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la
25 cantidad absoluta o relativa de los metabolitos, de su concentración en el sudor, 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
30 incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

- El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad y/o concentración de los metabolitos de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad y/o concentración de los metabolitos 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 (c) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.
- 10 Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Así, por ejemplo pero sin limitarnos, la muestra de referencia pueden ser los controles negativos, esto es, las cantidades detectadas por el método de la invención en muestras de individuos que no padecen la enfermedad.
- 15

A continuación se describen las características de los metabolitos que son objeto del estudio:

- 20 Fenilalanina: es uno de los ocho aminoácidos esenciales. En su cadena lateral presenta un anillo bencénico. La L-fenilalanina se puede transformar, mediante una reacción catalizada por la enzima fenilalanina hidroxilasa, en tirosina. La L-fenilalanina es también el precursora de las catecolaminas como la L-dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina), la norepinefrina y la epinefrina, a través de una etapa en la que se forma tirosina. Por otro lado, la L-fenilalanina se encuentra en la estructura de neuropéptidos como la somatostatina, vasopresina, melanotropina, encefalina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), angiotensina, sustancia P y colecistoquinina.
- 25

- Ácido nonanedioico: también es conocido como ácido azelaico. Es un ácido dicarboxílico saturado de cadena lineal con fórmula química $C_9H_{16}O_4$. Se encuentra en determinadas gramíneas como el trigo, el centeno y la cebada. Se puede sintetizar junto al ácido
- 30

pelargónico a partir de una oxidación vigorosa del ácido oleico con KMnO_4 . De manera bioquímica se sintetiza a partir de ácidos dicarboxílicos de cadena larga. Comúnmente se utiliza de forma tópica como queratolítico y en el tratamiento del acné y posee propiedades antioxidantes.

5

Ácido subérico: es un ácido dicarboxílico de cadena lineal con fórmula $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4$ derivado de la degradación del ácido oleico. Se encuentra presente en la orina de pacientes con problemas en el mecanismo de oxidación de ácidos grasos.

10 MG (22:2): es un monoacilglicérido. Son componentes menores en animales y poseen actividad detergente. Son el producto final de la digestión intestinal de las grasas de la dieta en los animales a través de la enzima lipasa pancreática. Son absorbidos directamente por las células intestinales y se convierten en triglicéridos antes de ser transportados por la linfa al hígado.

15

Maltotetraosa: es un tetrasacárido compuesto de cuatro moléculas de glucosa que puede venir de la degradación de estructuras macromoleculares de tipo glucosídico. La maltotetraosa tiene asimismo la importante propiedad de ser un agente que retiene la humedad.

20

Como se emplea aquí, el término "principio activo", "sustancia activa", "sustancia farmacéuticamente activa", "ingrediente activo" o "ingrediente farmacéuticamente activo" significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto. En la presente invención, hace referencia, por ejemplo, a un compuesto capaz de generar el sudor en un individuo, como por ejemplo, sin limitarnos, del grupo de los colinérgicos o un agonista de receptores muscarínicos, como por ejemplo la pilocarpina.

30

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.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

Ejemplo 1

Desarrollo experimental

10 *Reactivos*

El ácido fórmico MS-grado y el acetonitrilo (ACN) para preparar las fases móviles cromatográficas se adquirieron de Scharlab (Barcelona, España). Se usó agua desionizada (18 mΩ • cm) de un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore.

15 *Instrumentos y aparatos*

Se usó un sistema Agilent 1200 Serie LC (que consiste en una bomba binaria, un desgasificador de vacío, un muestreador automático y un compartimento de columna termostaticado) acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6540 UHD QqTOF equipado con una fuente de ionización electrospray (ESI) dual (Santa Clara, CA, EE.UU.). El eluido cromatográfico se monitorizó en modo masa exacta.

Población seleccionada para el estudio

Los sujetos del estudio fueron 41 pacientes con diagnóstico clínico de cáncer de pulmón y 55 controles (24 de ellos fumadores). Todos los pacientes con cáncer de pulmón se diagnosticaron después de aplicar los métodos estandarizados basados en broncoscopia (broncoaspirado, cepillado bronquial, biopsia, punción con aguja fina de ganglios mediastínicos), punción aspiración con agujas finas mediante control de ecografía torácica o tomografía axial computarizada, o videotoracosopia. La cohorte tenía una edad media de 59 ± 11 años y el 75% de ellos eran individuos masculinos.

Todos los pasos de extracción del sudor para el análisis se realizaron de acuerdo con las directrices dictadas por la Asociación Médica Mundial Declaración de Helsinki de 2004. El estudio se aprobó por el comité de ética del Hospital Universitario Reina Sofía. Se informó
5 previamente a las personas seleccionadas en el estudio para obtener el consentimiento.

Extracción de sudor

El sudor se recogió utilizando el Sistema de Análisis de sudor Macroduct (Wescor, Utah, EE.UU.), que consiste en un inductor sudor Webster y un colector de sudor Macroduct
10 (patente de EE.UU. 4.542.751). Para la estimulación iontoforética de sudor se utilizaron discos Pilogel ® iontoforéticos (Wescor, Utah, EE.UU.), un depósito de gel de iones pilocarpinium (patente de EE.UU. 4.383.529). Todo el sudor recogido en el colector de sudor Macroduct para cada paciente se extrajo, se colocó en un tubo Eppendorf y se almacenó a –
80 °C.

15

Tratamiento de las muestras

Las muestras de sudor (10 µl) se diluyeron con 0,1% de ácido fórmico en una proporción de 1:2. La mezcla se agitó durante 1 min y se colocó en un inyector LC automático para el análisis posterior.

20

Un *pool* de cada grupo de estudio (cáncer de pulmón y los individuos de control) se prepararon tomando 5 alícuotas de cada participante. Los dos *pools* también se diluyeron con ácido fórmico al 0,1% en una relación de 1:2 y se agitaron para su homogeneización.

25 *Análisis LC–QqTOF MS/MS*

La separación cromatográfica se realizó usando una columna analítica C18 de fase inversa (Mediterranean, 50 mm x 0,46 mm id, 3 µm de tamaño de partícula) de Teknokroma (Barcelona, España) termostatazada a 25 °C. Las fases móviles fueron agua (fase A) y ACN (fase B), ambos con 0,1% de ácido fórmico como agente de ionización. La bomba de LC se

programó con un caudal de 0,8 ml/min y siguiendo el gradiente de elución: 3% de fase B se mantuvo constante a partir del minuto 0 al 1; de 3 a 80% de la fase B de 1 a 10,5 minutos y de 80 a 100% de la fase B de 10,5 a 11,5 minutos. Para estabilizar las condiciones iniciales se requirió un de 5 minutos tras la etapa cromatográfica. El volumen de inyección fue de 3 μ l y la aguja del inyector se lavó 10 veces entre las inyecciones con 70% de metanol. Por otra parte, el soporte trasero de la aguja se lavó abundantemente durante 15 s a una velocidad de flujo de 4 ml/min con 70% de metanol para evitar la contaminación cruzada.

Los parámetros de la fuente de ionización por electrospray, operando en modo de ionización positivo y negativo, fueron los siguientes: la capilaridad y la tensión del fragmentador se fijaron en 3,5 kV y 175 V, respectivamente; el nebulizador de gas N_2 fluyó a 40 psi; el gas N_2 de secado a una tasa de flujo y temperatura fueron 8 l/min y 350 °C, respectivamente. El instrumento se calibró y ajustó de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. Los datos fueron recogidos en modo centroide y perfil a una velocidad de 1 espectro/s en el modo de rango dinámico extendido (2 GHz). La exactitud de la espectrometría de masas se consiguió en el rango m/z de 60 a 1100. El instrumento mostró resolución típica 15000 FWHM (ancho completo en la mitad del máximo) en m/z 118.086255 y 30000 FWHM a m/z 922.009798. Se realizó la calibración interna continua durante el análisis mediante el uso de las señales a m/z 121.0509 (purina protonado) y m/z 922,0098 [protonado hexaquis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxi) fosfazina o HP -921] en el modo de iones positivos, mientras que en modo de iones negativos se utilizaron m/z 119,0362 (protón abstraído purina) y m/z 966.000725 (aducto formato de HP-921) del ión.

Las muestras se inyectaron primero en el modo barrido de masas para obtener una “huella dactilar” de la composición de cada muestra de sudor y, posteriormente en el modo de adquisición de MS/MS para obtener información de los iones producto de los compuestos discriminantes con el fin de proceder a su identificación. Se utilizaron tres energías diferentes de colisión (10, 20 ó 40 eV) para obtener el máximo de información de fragmentación para cada compuesto.

30

Procesamiento de los datos y análisis estadísticos

Para el procesamiento de todos los datos obtenidos con el LC-TOF/MS en el modo barrido total MS se utilizó el MassHunter Workstation software (versión 3.01 Qualitative Analysis, Agilent Technologies). El tratamiento de los datos brutos se inició mediante extracción de las entidades moleculares (MFs, se refiere a los potenciales compuestos) con el algoritmo apropiado incluido en el software. Con este propósito el algoritmo consideró todos los iones que excedían de 500 cuentas en el modo de ionización positivo y de 400 en el negativo. Adicionalmente, la distribución isotópica para considerar una entidad molecular como válida estuvo definida por dos o más iones (con una tolerancia de espaciado entre picos de 0.0025 m/z, más 100.0 ppm) y la carga máxima admitida fue de 2. La formación de aductos en modo de ionización positivo (+H, +Na) y negativo (-H, +HCOO), así como la pérdida de masa neutra por deshidratación también se incluyeron para identificar todas las entidades moleculares procedentes de una misma molécula. Así, los iones con perfiles de elución idénticos y valores de m/z relacionados (representando diferentes aductos o isótopos del mismo compuesto) se extrajeron como entidades caracterizadas por el mismo tiempo de retención, intensidad en el máximo de los picos cromatográficos y masa exacta. La contribución del ruido de fondo se eliminó por sustracción de las entidades moleculares (MFs) relacionadas con material plástico, impurezas de los disolventes y otros compuestos contaminantes después del análisis de un blanco (disolución con 0.1% de ácido fórmico) en las mismas condiciones de operación que con las muestras. De esta forma se crearon los archivos de datos de cada compuesto en formato .cef para cada muestra y se exportaron al paquete de software Mass Profiler Professional (MPP) version 2.0, Agilent Technologies.

En el siguiente paso los datos se preprocesaron mediante alineamiento del tiempo de retención y los valores de m/z en la matriz de datos utilizando una ventana de tolerancia de 0.4 min y 10 ppm de seguridad en la masa, respectivamente. El pretratamiento de los datos se basó en un filtrado para eliminar ruido de fondo y en normalización mediante transformación logarítmica para reducir las diferencias relativamente grandes entre las abundancias de las respectivas MFs. La reducción del número de MFs por etapas se basó en la frecuencia con la que se detectaron en las muestras, en la abundancia de las respectivas MFs en cada clase (controles y enfermos) y en los resultados del análisis de varianza (ANOVA). El software MPP también permitió el análisis supervisado y no supervisado de los datos mediante PCA y PLS-DA. En el primer caso (PCA) se utilizó el centrado como algoritmo de escalado de los datos como pretratamiento y se seleccionó el

autoescalado en el caso de PLS-DA. Se seleccionó para esta investigación un modelo de validación tipo N -veces. Con este modelo, los individuos de los datos de entrada se dividen aleatoriamente en N partes iguales; $N-1$ partes se usan para el entrenamiento y la parte restante para la comprobación. El proceso se repite N veces utilizando iterativamente una parte diferente para la comprobación. De esta forma, cada objeto se utiliza al menos una vez para el entrenamiento y una vez para la comprobación, generándose una matriz de confusión. El proceso global puede repetirse tantas veces como se haya especificado mediante el número de repeticiones. En todos los modelos PLS-DA se seleccionaron 10 repeticiones y un número de veces de 3.

10

Resultados y discusión

Extracción de datos y tratamiento previo

El pool de cada grupo de estudio se inyectó 10 veces en cada modo de polaridad para obtener el perfil global para cada grupo. El conjunto de datos inicial se construyó después de la alineación de los cromatogramas LC-TOF/MS para la extracción eficiente de MFs en función del tiempo de retención y la exactitud de masas. La ventana de tolerancia para ambos parámetros se fijó en 0.4 min y 10 ppm para el tiempo de elución y la exactitud de masa, respectivamente. Además de esta etapa de pre-tratamiento, también se aplicó un tratamiento basal a la mediana para cada variable a través de muestras, que trata a todas las entidades moleculares por igual, independientemente de su abundancia.

15
20

Después del pretratamiento de datos, se obtuvieron dos conjuntos de datos, que constaron de 1.046 y 197 MFs para los modos de ionización positivo y negativo, respectivamente. La variabilidad experimental se redujo al mínimo mediante la aplicación de un algoritmo de filtro en función de la frecuencia de detección de MFs en las repeticiones. En particular, el algoritmo elimina los datos establecidos de los MFs no detectados en por lo menos todos los replicados de cada grupo, en este caso los pacientes con cáncer de pulmón y grupo de control. La aplicación del filtro de frecuencia simplifica los conjuntos de datos a 209 y 35 MFs en modos de ionización negativo y positivo, respectivamente.

25
30

Estas MFs se extrajeron en todas las muestras individuales inyectadas y alineadas con los mismos parámetros de tolerancia utilizados para los *pools*. A continuación, se aplicó un filtro de frecuencia para eliminar de la matriz de datos las MFs no detectadas en por lo menos un porcentaje representativo de muestras que forman cada clase predefinida. Este porcentaje representativo se fijó en 75%, la selección estuvo apoyada en criterios estadísticos para construir “huellas dactilares” del metaboloma del sudor de los dos grupos de destinatarios. Además, hay que mencionar que el binomio metaboloma del sudor/enfermedad puede aparecer de manera diferente en ciertos individuos. Por esta razón, el algoritmo de filtrado no debe ser completamente restrictivo. Además, antes del análisis estadístico multivariante no supervisado y supervisado, se utilizó otra prueba para evaluar el nivel de significación de las MFs de acuerdo con una prueba de ANOVA, en el establecimiento de un valor de corte, p , de 0.01. Tras la aplicación de todos los filtros, se encontraron 33 y 28 entidades moleculares significativas en el modo de ionización positivo y el modo de ionización negativo, respectivamente.

15

Identificación y análisis estadístico

Una vez que se establecieron las entidades estadísticamente significativas, los espectros MS/MS de estas entidades se obtuvieron por LC–QqTOF MS/MS en modo automático para obtener la información necesaria para identificarlos. En este modo la selección del ión precursor se realiza de forma automática, pero se puede incluir una lista de los iones preferidos para ser monitorizados, por lo que en este caso, la lista de entidades moleculares significativas se incluyeron en forma de iones preferidos. Las bases de datos utilizadas para la identificación fueron la “Human Metabolome Data Base” (HMDB) y la base de datos METLIN. Para comparar los espectros MS/MS de cada entidad con los registrados en la base de datos METLIN, se recogió la información obtenida a 10, 20 y 40 eV, ya que son las energías de colisión utilizadas en esta base de datos. La tabla 1 muestra la lista de compuestos identificados incluyendo el tiempo de retención y los iones precursores y productos. Otros compuestos identificados se eliminaron de la lista, ya que eran los componentes de los discos de Pilogel® utilizados para inducir la producción de sudor o compuestos presentes en el colector de sudor (por ejemplo, pilocarpina o propilparabeno). La mayoría de los compuestos identificados se detectaron en el modo de ionización negativo, ya que la mayoría de las entidades detectadas en el modo de ionización positivo eran péptidos o los espectros MS/MS no fueron lo suficientemente buenos para su

30

identificación. Como resultado, sólo tres compuestos del modo de ionización positivo se incluyeron en el panel final de los compuestos.

Tabla1.

- 5 **Parámetros utilizados para la identificación de los metabolitos significativos que permiten discriminar entre individuos control y enfermos de cáncer.**

Modo de ionización negativo					
	Nombre del compuesto	RT(min)	Ion precursor (m/z)	Δppm	iones productos (m/z)
1	Citrulina	0,7	174,0883	0	131,0818 44,9974 72,0078
2	Trisacárido fosfato C ₁₈ H ₃₄ O ₂₀ P	0,8	601,1371		547,0835 96,9696 161,0440 259,0221
3	Fenilalanina	3,5	164,0718	0	147,0445 103,0549 91,0549 72,0094
4	Ácido nonanedioico	7	187,0981	2	125,0962 187,0954 97,0645 123,0799

ES 2 534 732 B1

					57,0335
5	Lípido sulfónico	8,5	577,1470		170,0046 391,1109 497,1911
6	Maltotriosa	0,7	549,1672	0	503,1598 341,1085 179,0553 89,0241
7	Histidina	0,6	154,0624	1	137,0358 93,0457 80,0385 67,0307
8	Taurina	0,7	124,0072	1	79,9567
9	Ácido urocánico	1,2	137,0360	2	93,0445 66,0349 65,0206 50,0050
10	Ácido mucónico	7,5	123,0089	5	53,0033 95,0139 68,9982
11	Ácido subérico	6,2	173,0824	2	111,0809 83,0503 57,0349

12	MG(22:2)	8,7	431,3127	3,6	89,0247
Modo de ionización positivo					
	Nombre del compuesto	RT(min)	Ion precursor (m/z)	Δppm	iones productos (m/z)
1	Triptófano	4,7	205,0970	0,7	188,0699 146,0593 118,0647
2	Maltotetraosa	0,8	689,2103	1	145,0488 127,0385 85,0283 487,1640
3	1-Octen-3-il-glucósido	8,4	291,1802	0,1	273,1697 127,1117 57,0899

Después de la identificación, las alturas de los picos cromatográficos de todos los compuestos identificados se extrajeron individualmente en todas las muestras inyectadas. A continuación, se realizó una prueba de ANOVA para estudiar el significado real de cada compuesto y discriminar entre los dos grupos en estudio. La maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico y el trisacárido fosfato son los compuestos más significativos con un valor p inferior a 0,0001. La fenilalanina, la histidina, la taurina también son importantes, ya que presentan un valor de p inferior a 0,05. El resto de compuestos no presentaron diferencias significativas entre los dos grupos en estudio.

Análisis multivariante para la discriminación de individuos con cáncer de pulmón y del grupo de control

5 En este caso, se construyó un modelo de predicción basado en PLS-DA usando la altura del pico cromatográfico de cada compuesto en el panel de compuestos identificados que presentan un valor de p inferior a 0,05. Los parámetros de precisión para la validación y capacitación conjuntos del PLS-DA se muestran en la Tabla 2 y las puntuaciones y las cargas parciales del modelo en la figura 1.

Tabla2

10 **Parámetros del modelo PLS-DA para la discriminación de individuos con cáncer de pulmón frente a individuos control**

		Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (%)	Valor predictivo negativo (%)
Modelo de validación		82,3	59,5	55,3	84,7
Modelo de entrenamiento		84,3	61,9	57,3	86,7

15 Como se observa en la Tabla 2, la posibilidad de obtener un falso positivo es del 42,7%, mientras que la posibilidad de obtener un falso negativo es sólo del 13,3%. Esto significa que este PLS-DA se puede utilizar para reducir la población que necesita un estudio más exhaustivo, sea control clínico (algoritmo de seguimiento) o pruebas diagnósticas (algoritmo diagnóstico) basadas en técnicas de imagen (tomografía axial computarizada, ecografía, o en su caso tomografía por emisión de positrones)) o exploración de la vía aérea (fibrobroncoscopia). Ambas pruebas no están exentas de potenciales complicaciones y
 20 requieren un consumo de recursos elevado.

Evaluación estadística de la capacidad de predicción por curvas ROC

Con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad de los compuestos identificados para la predicción de cáncer de pulmón, se construyeron las curvas ROC de cada uno y se estimó la zona parcial bajo la curva (pAUC). La evaluación de un predictor mediante su valor de AUC total no es recomendable cuando la prueba de rendimiento sólo se lleva a cabo en alta especificidad o regiones de alta sensibilidad. Por esta razón, el parámetro pAUC es más adecuado ya que se limita a regiones específicas de la curva. En este caso, la región seleccionada comprende del 90 a 100% de especificidad para reducir la probabilidad de falsos negativos predicciones. Los compuestos que presentan un mayor valor de pAUC son el ácido nonanedioico (2,4%), el ácido subérico (2,7%), MG (22:2) (3,8%), la maltotetraosa y la fenilalanina (1,4%). Como se observa en sus curvas ROC (Fig. 2), la maltotetraosa y la fenilalanina presentan la misma pAUC, pero a pesar de que ambos compuestos fueron capaces de discriminar a los pacientes con cáncer del grupo de control con alta especificidad (90% y 92%, respectivamente), la fenilalanina presentó más baja sensibilidad (23%) que la maltotetraosa (36%), por lo tanto, esta última tiene una capacidad de discriminación mayor que la fenilalanina. El ácido subérico, el ácido nonanedioico y el MG (22:2) fueron capaces de discriminar los dos grupos en estudio con especificidad similar (91, 91 y 93%, respectivamente), pero con diferente sensibilidad (52, 43 y 44%, respectivamente). Con estos valores, el ácido subérico parece tener una capacidad de discriminación mayor que el ácido nonanedioico y el MG (22:2), pero la pAUC es mayor para la MG (22:2), lo que significa que la capacidad de discriminación del ácido subérico es menos robusta que la observada para el MG (22:2).

Se ha demostrado que el sudor es un biofluido útil que puede ser analizado y utilizado para el diagnóstico del cáncer de pulmón. Se ha construido un modelo de predicción basado en un panel de compuestos como los aminoácidos, azúcares y algunos lípidos para discriminar a los pacientes con cáncer de pulmón de un grupo de control. El alto valor predictivo negativo refleja el uso potencial de esta matriz para reducir la población a ser estudiada en caso positivo. Los lípidos y los perfiles de azúcares parecen ser los dos grupos más influenciados por las células cancerosas. De hecho, la forma en que se excretan los lípidos almacenados parece ser diferente entre las personas con cáncer y el grupo de control.

Ejemplo 2

Muestras

Se utilizaron muestras de sudor de 3 grupos de individuos: de 41 pacientes con cáncer de pulmón (Grupo 0), de 24 individuos con riesgo de padecerlo (fumadores, principal factor de riesgo) (Grupo 1) y de 31 individuos considerados sanos (sin cáncer y no fumadores) (Grupo 2).

Tratamiento de muestra

El único tratamiento de muestra que se llevó a cabo fue una dilución 1:2 (muestra–diluyente), siendo el diluyente una disolución acuosa al 0.1% en ácido fórmico.

Instrumentación

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida (LC) conectado a un detector de masas (MS) de tiempo de vuelo (TOF/MS) con ionización mediante electrospray (ESI) dual.

15

Características del instrumento: Un sistema Agilent de la serie 1200 (que consiste en una bomba binaria, un desgasificador a vacío, un automuestreador y un compartimento de columna termostatado) acoplado a un espectrómetro de masas TOF Agilent 6540 UHD Accurate-Mass equipado con una fuente de ionización por electrospray dual.

20

Valores de las variables instrumentales del TOF para el estudio: Los parámetros del ESI dual, operando en los modos de ionización positivo y negativo, fueron los siguientes: El voltaje del capilar y del fragmentador se fijaron en 4 kV y 175 V, respectivamente; el gas N₂ del nebulizador fluyó a 40 psi; el N₂ de secado fluyó a 8 l/min y 350 °C. El instrumento se calibró y sintonizó de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. Los datos se recogieron en los modos centroide y perfil a una velocidad de 1 espectro/s en el modo de rango dinámico extendido (2 GHz), tanto en el modo de barrido total de MS como en el modo MS/MS orientado. Los rangos de masas fueron 60–1100 m/z en el modo MS y 35–1100 m/z en el modo MS/MS.

Separación cromatográfica

Se utilizó una columna analítica en fase reversa C18 Mediterranean (50 mm x 0.46 mm d.i., 3 µm tamaño de partícula) de Teknokroma (Barcelona), que se mantuvo a 25 °C. Las fases móviles fueron agua (fase A) y acetonitrilo (fase B), ambas conteniendo un 0.1% de ácido fórmico como agente ionizante. La bomba LC se programó con un caudal de 0.8 mL/min y se desarrolló el siguiente gradiente en todos los casos: 3% de fase B mantenida constante del minuto 0 al 1; del 3 al 80% de fase B del minuto 1 al 10.5 y del 80 al 100% del minuto 10.5 al 11.5.

10

Características de la inyección: El volumen de inyección fue 3 µL y la aguja del inyector se enjuagó 10 veces con 30% de metanol entre inyecciones consecutivas. Para evitar la contaminación entre muestras también se lavó la base de la aguja de inyección durante 15 s a un caudal de 4 mL/min con agua conteniendo 30% de metanol.

15

Procedimiento de trabajo

Se hizo un pool de cada uno de los grupos, que se analizó 10 veces en ambos modos de ionización.

Tratamiento de los datos

Para el procesamiento de todos los datos obtenidos con el LC-TOF/MS en el modo barrido total MS se utilizó el MassHunter Workstation software (version 3.01 Qualitative Analysis, Agilent Technologies). El tratamiento de los datos brutos se inició mediante extracción de las potenciales características moleculares (MFs) con el algoritmo apropiado incluido en el software. Con este propósito el algoritmo consideró todos los iones que excedían de 500 cuentas en el modo de ionización positivo y de 400 en el negativo. Adicionalmente, la distribución isotópica para una característica válida estuvo definida por dos o más iones (con una tolerancia de espaciado entre picos de 0.0025 m/z, más 100.0 ppm) y la carga máxima admitida fue de 2. La formación de aductos en modo de ionización positivo (+H, +Na) y negativo (-H, +HCOO), así como la pérdida de masa neutra por deshidratación también se

30

incluyeron para identificar las características correspondientes a la misma molécula. Así, los iones con perfiles de elución idénticos y valores de m/z relacionados (representando diferentes aductos o isótopos del mismo compuesto) se extrajeron como entidades caracterizadas por el mismo tiempo de retención, intensidad en el máximo de los picos cromatográficos y masa exacta. La contribución del ruido de fondo se eliminó por sustracción de las MFs relacionadas con material plástico, impurezas de los disolventes y otros compuestos contaminantes después del análisis de un blanco (disolución con 0.1% de ácido fórmico) en las mismas condiciones de operación que con las muestras. De esta forma se crearon los archivos de datos de cada compuesto en formato de intercambio (.cef files) para cada muestra y se exportaron al paquete de software Mass Profiler Professional (MPP) version 2.0, Agilent Technologies.

En el siguiente paso los datos se preprocesaron mediante alineamiento del tiempo de retención y los valores de m/z en la matriz de datos utilizando una ventana de tolerancia de 0.4 min y 10 ppm de seguridad en la masa, respectivamente. El pretratamiento de los datos se basó en un filtrado para eliminar ruido de fondo y en normalización mediante transformación logarítmica para reducir las diferencias relativamente grandes entre las abundancias de las respectivas MFs. La reducción del número de MFs por etapas se basó en la frecuencia con la que se detectaron en las muestras, en la abundancia de las respectivas MFs en cada clase (controles y enfermos) y en los resultados del análisis de varianza (ANOVA). El software MPP también permitió el análisis supervisado y no supervisado de los datos mediante PCA y PLS-DA. En el primer caso (PCA) se utilizó el centrado como algoritmo de escalado de los datos como pretratamiento y se seleccionó el autoescalado en el caso de PLS-DA. Se seleccionó para esta investigación un modelo de validación tipo N -veces. Con este modelo, los individuos de los datos de entrada se dividen aleatoriamente en N partes iguales; $N-1$ partes se usan para el entrenamiento y la parte restante para la comprobación. El proceso se repite N veces utilizando iterativamente una parte diferente para la comprobación. De esta forma, cada objeto se utiliza al menos una vez para el entrenamiento y una vez para la comprobación, generándose una matriz de confusión. El proceso global puede repetirse tantas veces como se haya especificado mediante el número de repeticiones. En todos los modelos PLS-DA se seleccionaron 10 repeticiones y un número de veces de 3.

Resultados

Las Figs. 3 a 6 muestran los resultados de los tratamientos realizados (PCA y PLS-DA) para los modos de ionización positivo y negativo. Aunque en ambos modos se consigue una excelente discriminación entre los tres grupos, en el modo positivo se consigue una mayor separación.

Modo de ionización positivo. La Fig. 3 muestra el PCA que proporciona este modo de ionización: Una perfecta separación de los grupos mostrando las 10 repeticiones del análisis realizadas con cada uno de los pools, que pone de manifiesto un comportamiento totalmente diferenciado de cada pool.

La Fig. 4 recoge el PLS-DA, que igualmente muestra una excelente separación entre pools que pone de manifiesto el diferente comportamiento de ellos y, por tanto, una diferente composición de las muestras de sudor en cada caso. La matriz de confusión para la validación muestra una seguridad en la predicción del 100% en todos los casos.

Modo de ionización negativo: La Fig. 5 muestra el PCA que proporciona este modo de ionización: Una buena separación de los grupos también en este modo mostrando las 10 repeticiones del análisis realizadas con cada uno de los pools, que ratifica el comportamiento totalmente diferenciado de cada pool obtenido en el modo positivo.

La Fig. 6 recoge el PLS-DA, que igualmente muestra en este modo de ionización una buena separación entre pools, es decir, un diferente comportamiento de ellos y, por tanto, una diferente composición de las muestras de sudor en cada caso. También en este caso la matriz de confusión para la validación muestra una seguridad en la predicción del 100%.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso de los metabolitos maltotetraosa, MG (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico y el trisacárido fosfato para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer.
- 5 2.- El uso de los metabolitos según la reivindicación anterior, donde además se emplean los metabolitos fenilalanina, la histidina, y la taurina.
- 3.- El uso de los metabolitos según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde además se emplean los metabolitos citrulina, lípido sulfónico, ácido urocánico y triptófano.
- 4.- El uso de los metabolitos según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el cáncer
10 es el cáncer de pulmón.
- 5.- Un método de obtención de datos útiles, para la clasificación, diagnóstico y seguimiento del cáncer, que comprende:
 - a) obtener una muestra biológica aislada del individuo,
 - b) determinar la cantidad y/o concentración de los metabolitos maltotetraosa, MG
15 (22:2), el ácido subérico, la maltotriosa, el ácido nonanedioico y el trisacárido fosfato.
- 6.- El método según la reivindicación anterior, que además comprende determinar la cantidad y/o concentración los metabolitos fenilalanina, la histidina y la taurina en el paso (b).
- 7.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-6, que además comprende
20 determinar la cantidad y/o concentración los metabolitos citrulina, lípido sulfónico, ácido urocánico y triptófano.
- 8.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que además comprende:
 - c) comparar las cantidades obtenidas en el paso (b) con una cantidad de referencia.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, donde los pasos (b) y/o (c)
25 pueden ser total o parcialmente automatizados.
- 10.- Un método de clasificación y diagnóstico del cáncer que comprende los paso (a)-(c) según cualquiera de las reivindicaciones 5-8, y además comprende asignar al individuo del paso (a) al grupo de individuos con escasa probabilidad de padecer cáncer (alto valor predictivo negativo) cuando presentan una cantidad de los metabolitos fenilalanina, ácido

nonanedioico, ácido subérico, MG (22:2) y maltotetraosa estadísticamente diferente de la población control establecida como referencia.

11.- Un método de seguimiento de la evolución del cáncer, que comprende los pasos (a) – (c) del método según cualquiera de las reivindicaciones 5-9, y además:

5 d) repetir al menos dos veces la secuencia de pasos (a) – (c) en muestras obtenidas del mismo individuo según el paso (a), de manera no simultánea.

12.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-11, donde el cáncer es el cáncer de pulmón.

10 13.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-12, donde la muestra biológica es una muestra de sudor.

14.- El método según cualquiera de las reivindicaciones 5-13, donde la cuantificación de los compuestos se hace mediante una cromatografía líquida LC conectada a un detector de masas (MS) de tiempo de vuelo (TOF/MS) con ionización mediante electrospray (ESI) dual.

15 15.- Un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para determinar la cantidad y/o concentración de los metabolitos según se describen en cualquiera de las reivindicaciones 5-14.

16.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, que es un kit de partes que además comprende un dispositivo para la administración de una composición que comprende un agente colinérgico.

20 17.- El kit o dispositivo según la reivindicación anterior, donde el agente colinérgico es la pilocarpina.

18.- El uso del kit o dispositivo según las reivindicación 15-17, para el diagnóstico y seguimiento del cáncer de pulmón a partir de una muestra biológica.

25 19.- El uso del kit o dispositivo según las reivindicación 18, donde la muestra biológica es sudor.

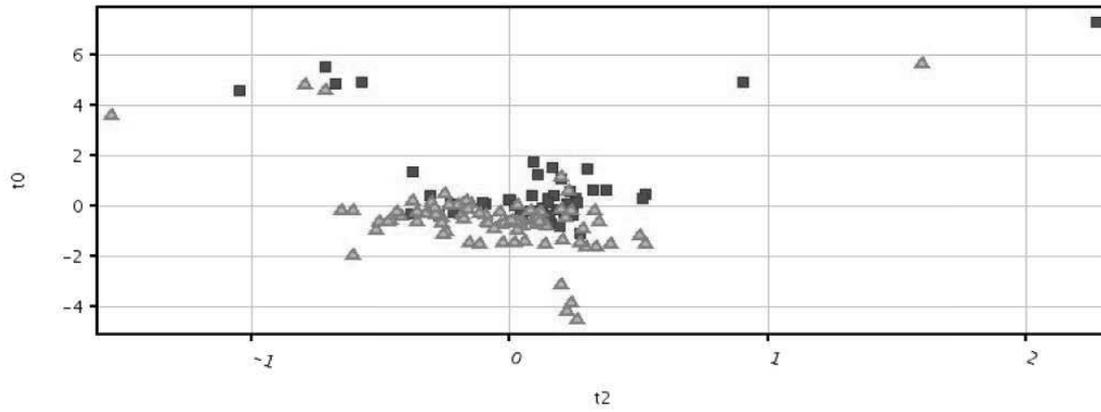


Fig. 1

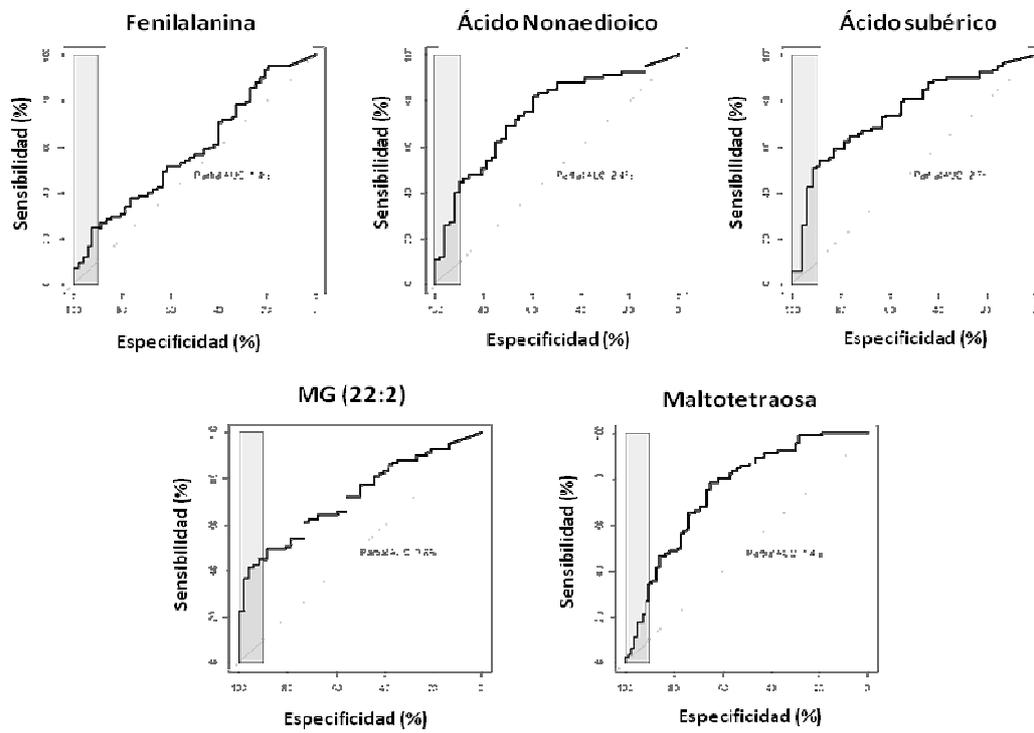


Fig. 2

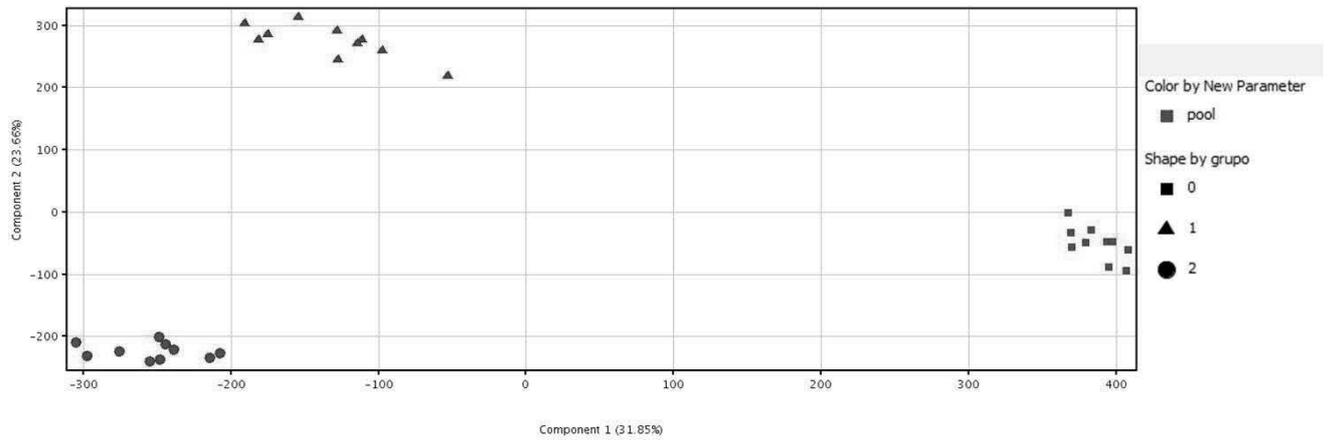


Fig. 3

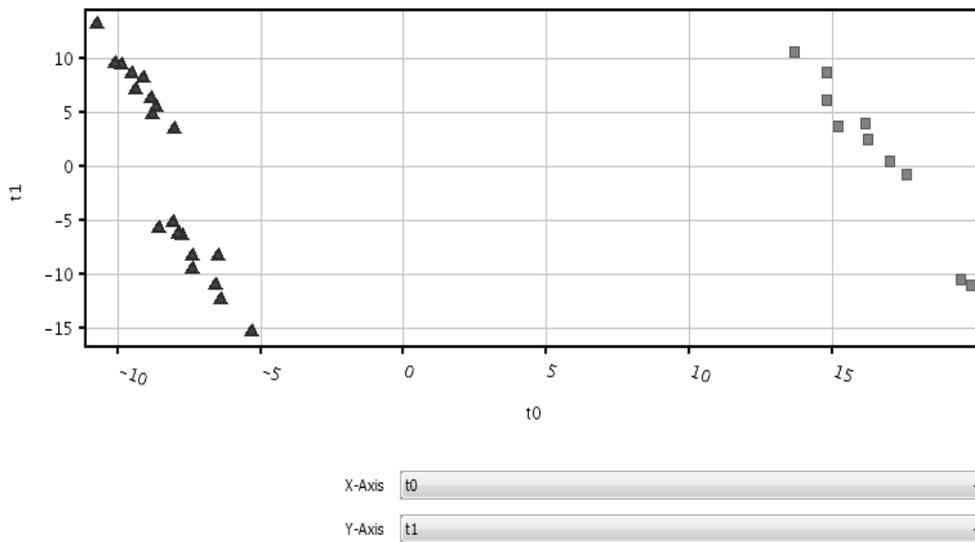


Fig. 4

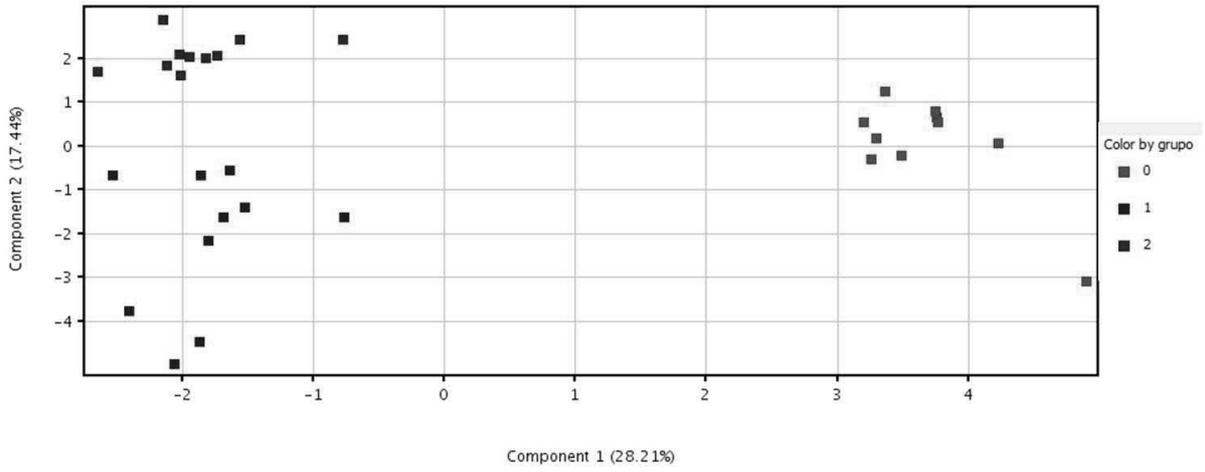


Fig. 5

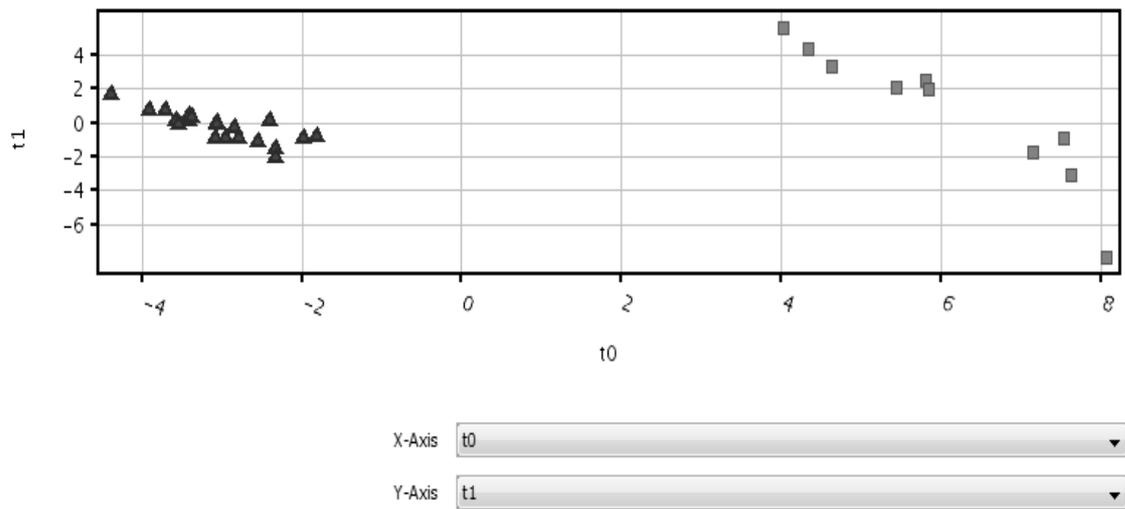


Fig. 6