

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 381 729**

② Número de solicitud: 201031626

⑤ Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **05.11.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **31.05.2012**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
31.05.2012

⑦ Solicitante/s: **Centro de Investigaciones
Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas
(CIEMAT)
Ciudad Universitaria de Madrid
Avda. Complutense, 22
28040 Madrid, ES
Universidad Politécnica de Madrid**

⑦ Inventor/es: **García Escudero, Ramón;
Paramio González, Jesús María;
Larrañaga Mújica, Pedro y
Bielza Lozoya, Concepción**

⑦ Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

⑤ Título: **Test predictor de supervivencia global de adenocarcinoma de pulmón.**

⑤ Resumen:

Test predictor de supervivencia global de adenocarcinoma de pulmón.

La presente invención se relaciona con métodos *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón. En particular, la invención se refiere a una firma de genes cuya expresión está correlacionada con el pronóstico de un sujeto que ha sido diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón.

DESCRIPCIÓN

Test predictor de supervivencia global de adenocarcinoma de pulmón.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón.

10 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de pulmón es una enfermedad desencadenada por el crecimiento descontrolado de las células en tejidos pulmonares. Este crecimiento da lugar a metástasis, cuando se produce la invasión de tejidos adyacentes e infiltración más allá de los pulmones. El cáncer de pulmón es el que más muertes produce en hombres y mujeres, siendo responsable de 1,3 millones de muertes anuales. Los síntomas más frecuentes incluyen dificultad respiratoria, tos, incluyendo tos sanguinolenta, y pérdida de peso.

La causa más frecuente de cáncer de pulmón es la exposición a largo plazo del humo del tabaco. La aparición de cáncer de pulmón en no fumadores representa el 15% de los casos y frecuentemente se atribuye a una combinación de factores genéticos, gas radón, asbestos y contaminación del aire incluyendo humo secundario (fumadores pasivos).

El cáncer de pulmón se clasifica en fases según el sistema TNM. El pronóstico está íntimamente unido a los resultados de la clasificación en fases y la clasificación en fases también se usa para asignar pacientes a tratamientos tanto en ensayos clínicos como en la práctica médica. En el año 2009 se ha publicado una actualización del sistema TNM para la clasificación del cáncer de pulmón (Rami-Porta R. *et al.*, Ann Thorac Cardiovasc Surg Vol. 15, No. 1), teniendo en cuenta los descriptores T (tamaño del tumor), N (afectación ganglionar) y M (presencia de metástasis).

Teniendo en cuenta el tamaño del tumor se puede clasificar en:

- 30 - TX: el tumor no puede verse, sólo se detectan células de lavados bronquiales o esputos.
- T0: no hay evidencia del tumor primario,
- 35 - Tis: carcinoma *in situ*,
- T1: tumor de hasta 3 cm,
- T2: de hasta 7 cm,
- 40 - T3: tumor mayor de 7 cm,
- T4: tumor que se extiende por nódulo/s adicional/es en lóbulo homolateral diferente del tumor primario.

45 Según la afectación ganglionar:

- N0: no hay metástasis en los ganglios regionales,
- N1: Metástasis en adenopatías homolaterales intrapulmonares, peribronquiales y/o hiliares, incluyendo afectación por extensión directa,
- 50 - N2: Metástasis en adenopatías homolaterales mediastínicas y/o subcarínicas,
- N3: Metástasis en adenopatías contralaterales hiliares o mediastínicas, o escalénicas homo- o contralaterales o supraclaviculares homo o contralaterales.
- 55

Teniendo en cuenta la presencia de metástasis a distancia se clasifica como:

- 60 - M0: no hay metástasis,
- M1: metástasis a distancia.

65 Existen 46 tipos distintos de cáncer pulmonar, siendo el 95% de origen epitelial (carcinomas) y se incluyen en 5 tipos principales: carcinoma escamoso, carcinoma de células pequeñas, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y tumor carcinoide. La distinción es importante porque el tratamiento varía de tal manera que el adenocarcinoma de células grandes suele tratarse con cirugía, mientras que el carcinoma de células pequeñas suelen responder mejor a

quimioterapia y radioterapia. El cáncer de pulmón puede visualizarse mediante radiografía y tomografía computarizada. El diagnóstico se confirma mediante biopsia generalmente realizada mediante broncoscopia o biopsia guiada por tomografía computarizada.

5 El adenocarcinoma es un cáncer epitelial originado en tejidos glandulares. Los tejidos epiteliales incluyen, pero no se limitan, a piel, glándulas y una gran variedad de otros tejidos que recubren las cavidades y órganos del cuerpo. Para ser clasificado como adenocarcinoma, las células no necesariamente deben formar parte de una glándula, siempre que tengan propiedades secretoras. Los adenocarcinomas bien diferenciados tienden a parecerse al tejido glandular ya que derivan de ellos, en cambio esto no ocurre en los no diferenciados. Mediante la tinción de células procedentes
10 de biopsia, un patólogo determinará si el tumor es un adenocarcinoma u otro tipo de cáncer. Los adenocarcinomas se pueden desarrollar en cualquier tejido debido a la naturaleza ubicua de las glándulas. Ya que las glándulas no secretan las mismas sustancias, debido a la función exocrina, se considera glandular como la forma maligna y por ello se denomina adenocarcinoma. Los tumores de glándulas endocrinas, como insulinooma, feocromocitoma, etc...
15 es anormal, pero benigno, se denomina adenoma. Los adenomas benignos típicamente no invaden otros tejidos y raramente metastatizan, en cambio los adenocarcinomas malignos invaden otros tejidos. El adenocarcinoma de pulmón es un tipo concreto de carcinoma de células grandes que comienza en las células glandulares que revisten los bronquios.

20 La cirugía es el principal tratamiento del adenocarcinoma de pulmón cuando no hay evidencias de diseminación en otras partes fuera del pulmón. Otros tratamientos posibles incluyen quimioterapia y radioterapia. La evaluación de la función pulmonar es importante antes de recurrir a la cirugía por la eliminación parcial o total del pulmón que se produce. Si el tumor se ha diseminado significativamente, es necesario recurrir a la quimioterapia.

25 El pronóstico de los pacientes con cáncer de pulmón depende claramente del estadio tumoral en que se diagnostica la enfermedad. La supervivencia global al cáncer de pulmón es baja (sólo del 10-13% a los 5 años) y no ha cambiado sustancialmente durante las últimas dos décadas a pesar del desarrollo de tratamientos multidisciplinarios en pacientes con estadios más avanzados de la enfermedad.

30 La necesidad de un método para predecir supervivencia reside en la posibilidad de seleccionar una terapia adicional para poder administrarla en aquellos pacientes con baja esperanza de supervivencia y por el contrario espaciar en el tiempo aquellas terapias con mayores efectos secundarios a los pacientes con probabilidad alta de supervivencia.

35 Se han descrito distintos métodos para predecir supervivencia en los que se relacionan la presencia de varios marcadores pronósticos, en combinación con características patológicas, como el grado de diferenciación, tamaño del tumor y la invasión linfovascular. Sin embargo, ninguno de ellos se ha validado para su uso rutinario en clínica (Brundage MD. *et al.*, Chest. 2002 Sep; 122(3):1037-57; Thunnissen FB. *et al.*, Histopathology. 2006 Jun; 48(7):779-86)).

40 Otros métodos predictores basados en perfiles de expresión no han sido útiles en clínica por la necesidad de laboratorios especializados y complejos análisis estadísticos, por ejemplo, el método descrito en Potti A. *et al.*, (N Engl J Med. 2006 Aug 10; 355(6): 570-80).

45 Por tanto existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos que permitan identificar los genes más relevantes implicados en adenocarcinoma de pulmón, de forma que se puedan obtener firmas más fiables y basadas en un menor número de genes. Dichas firmas permitirán la predicción del pronóstico de un paciente que sufre adenocarcinoma de pulmón de forma más eficaz que los métodos descritos en el estado de la técnica. La identificación de nuevos factores de pronóstico servirá para guiar en la selección de los tratamientos más adecuados.

Compendio de la invención

50 En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto diagnosticado con adenocarcinoma de pulmón que comprende determinar los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 en una muestra de tejido tumoral procedente de dicho sujeto.

55 En un segundo aspecto, la invención se refiere a un reactivo capaz de detectar los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende al menos un reactivo según la invención.

60 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit según la invención para el pronóstico de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón.

Asimismo, la invención se refiere en otro aspecto a un método para seleccionar marcadores genéticos para predecir el pronóstico de un paciente con adenocarcinoma de pulmón que comprende:

65 (i) determinar los genes cuya expresión se encuentra alterada respecto a un valor de referencia en una muestra de tumor de un animal no humano genéticamente modificado que muestra propensión a desarrollar tumores de forma espontánea;

- (ii) identificar los genes homólogos en humanos correspondientes a los genes identificados en la etapa (i); y
- (iii) seleccionar aquellos genes identificados en la etapa (ii) cuya expresión en muestras de tumores de pacientes con adenocarcinoma de pulmón con supervivencia de hasta 5 años está alterada con respecto a la expresión de dichos genes en tumores de pacientes con supervivencia inferior a 5 años.

Breve descripción de la figura

La Figura 1 muestra la representación de curvas Kaplan-Meier en las que representan las probabilidades de supervivencia en relación al tiempo, tanto para el global de los pacientes (n=196) (Figura 1A) como para los pacientes de estadios tempranos (n=88) (Figura 1B). A: Pacientes de alto riesgo, B: pacientes de bajo riesgo, I: pacientes de riesgo intermedio.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han seleccionado una firma de genes que son capaces de hibridar con unas sondas específicas y cuya expresión está correlacionada con la predicción de la supervivencia de un sujeto diagnosticado con adenocarcinoma de pulmón. Los ensayos llevados a cabo por los inventores han puesto de manifiesto que dicha firma de genes se puede utilizar para predecir la supervivencia global con alta significancia, tal como se muestra en el Ejemplo 2.

Método para la determinación del pronóstico de adenocarcinoma de pulmón

Por tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto diagnosticado con adenocarcinoma de pulmón que comprende determinar los niveles de expresión de los genes identificados en la Tabla 1 y en la Tabla 2 en una muestra de tejido tumoral procedente de dicho sujeto, en donde un aumento de la expresión de los genes identificados en la Tabla 1 y una disminución de la expresión de los genes identificados en la Tabla 2 respecto a una muestra control es indicativo de un peor pronóstico.

El término “*pronóstico*”, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere, en general, al conjunto de datos que posee la ciencia médica sobre la probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso del tiempo o historia natural de una enfermedad; es decir, es la predicción de los sucesos que ocurrirán en el desarrollo de una enfermedad en términos estadísticos. En particular, el término “pronóstico de un sujeto diagnosticado con adenocarcinoma de pulmón”, tal como aquí se utiliza, se refiere al conjunto de datos que permite asignar una probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso del adenocarcinoma de pulmón. Así, de acuerdo con la presente invención, incluye la capacidad de asignar una probabilidad de que ocurran determinadas situaciones en el transcurso de la enfermedad, basado en un método de determinación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 de muestras de pacientes con adenocarcinoma de pulmón. Esta asignación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, e.g., mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del p-valor, test de Student, funciones discriminantes de Fisher, etc. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el p-valor es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001.

En el contexto de la presente invención, el término “aumento de expresión de los genes” se refiere a que los niveles de expresión de un gen se encuentran elevados con respecto a los valores de referencia o controles, que corresponderían al nivel de expresión del mismo gen en una muestra control. De acuerdo con la presente invención, se considera que los niveles de expresión de un gen están aumentados con respecto a un valor de referencia cuando los niveles en la muestra del paciente están aumentados al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 110%, al menos un 120%, al menos un 130%, al menos un 140%, al menos un 150% o más.

Por otro lado, en el contexto de la presente invención, el término “disminución de expresión de los genes” se refiere a que los niveles de expresión un gen se encuentran disminuidos o reprimidos con respecto a los valores de referencia o controles, que corresponderían al nivel de expresión del mismo gen en una muestra control. De acuerdo con la presente invención, se considera que los niveles de expresión de un gen están disminuidos con respecto a un valor de referencia cuando los niveles en la muestra del paciente están disminuidos al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 15%, al menos un 20%, al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 100%, al menos un 110%, al menos un 120%, al menos un 130%, al menos un 140%, al menos un 150% o más.

En una realización particular del método de la invención, dichos genes son los genes identificados en las Tablas 1 y 2, cuyas secuencias de nucleótidos hibridan con las sondas identificadas en la Tabla 3.

Tabla 1

Tabla 2

	Símbolo gen	Número de acceso	Símbolo gen	Número de acceso
5				
10	CTSL2	GC09M098834	TRIM2	GC04P154345
	FUBP1	GC01M078124	PEBP1	GC12P117058
	CKS1B	GC01P153213	PRDX2	GC19M012768
	CDC6	GC17P035697		
15	ERO1L	GC14M052178		
	TMEM48	GC01M053946		
	SKP2	GC05P036187		
	TRIP13	GC05P000946		
	CHEK1	GC11P125001		
20	BRCA2	GC13P031787		
	GCN1L1	GC12M119027		
	SUV39H2	GC10P014960		
	TFG	GC03P101910		
25	C13ORF27	GC13M102219		
	ECT2	GC03P173951		
	MCM10	GC10P013243		
	KIF18B	GC17M040359		
	GMPS	GC03P157071		
30	H2AFZ	GC04M101116		
	HSPA14	GC10P014920		
	MAD2L1	GC04M121260		
	BRCA1	GC17M038450		
35	GEMIN6	GC02P038859		
	CDC48	GC01P037931		
	CEP55	GC10P095247		
	CKS2	GC09P091115		
40	CCNA2	GC04M122957		

En una realización particular de la invención, dicha muestra de tejido tumoral es una muestra de un tumor primario, en particular, dicho tumor es de adenocarcinoma de pulmón. Así, a modo ilustrativo, dicha muestra de tejido tumoral puede ser una muestra de biopsia obtenida, por ejemplo, por resección quirúrgica.

La cuantificación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 puede realizarse a partir del ARN resultante de la transcripción de dichos genes (ARNm) o, alternativamente, a partir del ADN complementario (ADNc) de dichos genes. Por tanto, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dichos genes, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dichos genes, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

Adicionalmente, el método de la invención puede incluir la realización de una etapa de extracción con el fin de obtener el ARN total, lo que puede realizarse mediante técnicas convencionales (Chomczynski y cols., Anal. Biochem., 1987, 162:156; Chomczynski P., Biotechniques, 1993, 15:532).

Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por los genes cuyas secuencias de nucleótidos hibridan con los genes de las Tablas 1 y 2 o de su ADNc correspondiente. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de ARNm codificados por dichos genes pueden ser cuantificados mediante el empleo de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de la amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante Northern blot y empleo de sondas específicas del ARNm de los genes de interés o de su ADNc correspondiente, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, microarrays, sondas luminex, etc. Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente a dichos ARNm codificados por los genes de las Tablas 1 y 2 también puede ser cuantificado mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARNm correspondiente seguida de amplificación y cuantificación del producto de la amplificación de dicho ADNc.

ES 2 381 729 A1

Métodos convencionales de cuantificar los niveles de expresión pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cols., 2001 "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

5 En una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa multiplex o un array de ADN o ARN.

10 En otra realización particular de la invención, la determinación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 se realiza mediante un array de ADN que comprende las sondas identificadas en la Tabla 3.

TABLA 3

15	Símbolo gen	SEQ ID NO
	CTSL2	SEQ ID NO: 1- SEQ ID NO:11
	FUBP1	SEQ ID NO: 12- SEQ ID NO: 22
20	CKS1B	SEQ ID NO: 23- SEQ ID NO:33
	CDC6	SEQ ID NO: 34 - SEQ ID NO: 55
25	ERO1L	SEQ ID NO: 56- SEQ ID NO:66
	TMEM48	SEQ ID NO: 67- SEQ ID NO:77
30	SKP2	SEQ ID NO: 78- SEQ ID NO:99,SEQ ID NO:188- SEQ ID NO:198
	TRIP13	SEQ ID NO: 100- SEQ ID NO:110
35	CHEK1	SEQ ID NO: 111- SEQ ID NO:121
	BRCA2	SEQ ID NO: 122- SEQ ID NO:132
40	GCN1L1	SEQ ID NO: 133 - SEQ ID NO: 154
	SUV39H2	SEQ ID NO: 155- SEQ ID NO:165
	TFG	SEQ ID NO: 166- SEQ ID NO:176
45	C13orf27	SEQ ID NO: 177- SEQ ID NO:187
	ECT2	SEQ ID NO: 199- SEQ ID NO:209
50	MCM10	SEQ ID NO: 210- SEQ ID NO:220
	KIF18B	SEQ ID NO: 221- SEQ ID NO:231
	GMPS	SEQ ID NO: 232- SEQ ID NO:242
55	H2AFZ	SEQ ID NO: 243 - SEQ ID NO: 264
	HSPA14	SEQ ID NO: 265- SEQ ID NO:275
60	MAD2L1	SEQ ID NO: 276- SEQ ID NO:286
	BRCA1	SEQ ID NO: 287- SEQ ID NO:297
	GEMIN6	SEQ ID NO: 298- SEQ ID NO:308
65	CDCA8	SEQ ID NO: 309- SEQ ID NO:319

ES 2 381 729 A1

CEP55	SEQ ID NO: 320- SEQ ID NO:330
CKS2	SEQ ID NO: 331- SEQ ID NO: 341
CCNA2	SEQ ID NO: 342- SEQ ID NO:352
TRIM2	SEQ ID NO: 353- SEQ ID NO:363
PEBP1	SEQ ID NO: 364 - SEQ ID NO: 385
PRDX2	SEQ ID NO: 386- SEQ ID NO:401

Así, dicho método comprende la determinación de los niveles de expresión de dichos genes de las Tablas 1 y 2 con respecto a un valor de referencia. En una realización particular de la invención, dicho valor de referencia es el valor de expresión génica de dichos genes de las Tablas 1 y 2 en una muestra de tumores primarios de pacientes con supervivencia global superior a 5 años. Preferiblemente, se considerará que los genes presentan una expresión aumentada cuando la relación de expresión de un gen es de al menos 1,5 veces con respecto a un valor de referencia, preferiblemente superior a 2 veces, más preferiblemente superior a, 3, 4, 5 y 10 veces. De igual modo, en una realización particular de la invención, se considerará que los genes presentan una expresión disminuida con respecto a un valor de referencia, cuando la relación de expresión de un gen es de al menos 1,5 veces inferior con respecto al valor de referencia.

En una realización particular de la invención, el método para la determinación del mejor o peor pronóstico de un sujeto que ha sido diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón, comprende la realización de un análisis de regresión de riesgos proporcionales en función de dichos valores de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2. Por tanto, en una realización particular de la invención, la determinación de dicho pronóstico comprende un análisis de regresión de riesgos proporcionales de dicho pronóstico en función de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2.

El término “análisis de regresión de riesgos proporcionales”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un método semiparamétrico que permite representar los efectos de un conjunto de variables explicativas sobre la variable tiempo de cambio (tiempo de supervivencia) o más bien sobre la probabilidad condicional de cambio, es decir sobre la función de riesgo.

Tal como se describe en el Ejemplo 2 que acompaña la presente descripción, los inventores han empleado un análisis de regresión de riesgos proporcionales de tipo Cox para la determinación del pronóstico de un sujeto diagnosticado con adenocarcinoma de pulmón. Dicho análisis de Cox asigna un coeficiente de regresión para cada gen, de tal forma que el gen cuya expresión esté directamente correlacionada con la variable pronóstico, por ejemplo con aparición de muerte, es > 0 , y si su expresión está relacionada inversamente con muerte es < 0 . Por tanto, en una realización particular de la invención, dicho análisis de regresión de riesgos proporcionales es un análisis de tipo Cox. En una realización más particular, en dicho análisis de tipo Cox se establece aparición de muerte como variable pronóstico. En una realización preferida, dicha aparición de muerte es aparición de muerte a los 3 o 5 años.

Los inventores han demostrado que mediante el método de la invención es posible determinar el pronóstico de un paciente con una alta sensibilidad y especificidad. Así, a partir de los valores de expresión génica de los genes de las Tablas 1 y 2 según se ha descrito anteriormente, y del valor estadístico de Wald del análisis de regresión de riesgos proporcionales, los inventores han demostrado que es posible determinar dicho pronóstico determinando el valor de riesgo genómico, VR_{gen} , aplicando la siguiente fórmula:

$$n=36$$

$$\sum_{i=1} s_i \cdot x_i$$

donde x_i es el valor del nivel de expresión en log2 estandarizado (media=0 y desviación estándar=1) de cada uno de dichos genes identificados en las Tablas 1 y 2; y

s_i es el valor del estadístico de Wald del análisis de regresión de tipo Cox para cada uno de dichos genes identificados en las Tablas 1 y 2,

en donde si dicho valor es mayor que cero entonces es indicativo de que dicho paciente presenta peor pronóstico y donde si dicho valor es menor que cero es indicativo de que dicho paciente presenta mejor pronóstico.

ES 2 381 729 A1

A partir de las variables estadio, Edad y Sexo del paciente y de los valores Wald mencionados en la Tabla 4 se calcula un valor de riesgo clínico, VR_{clin} , según la fórmula:

$$(Edad \cdot 2,09) EST + (Sexo \cdot 1,71) EST + (Estadio \cdot 6,48) EST$$

en donde la edad es el valor en años del paciente en el momento del diagnóstico, el sexo se codifica como hombre: 1, mujer: -1 y el estadio se codifica como IA: 1, IB: 2 y estadios más avanzados: 3. EST: valores estandarizados (media=0 y desviación estándar=1).

El término “estadio” del cáncer, según se utiliza en la presente invención, se refiere a cada una de las etapas de desarrollo de un cáncer. Teniendo en cuenta la combinación de los descriptores T (tamaño del tumor), N (afectación ganglionar) y M (presencia de metástasis), el adenocarcinoma de pulmón se clasifica en distintos estadios.

El “estadio IA”, según la presente invención, se refiere a un tumor T1, N0, M0, es decir de hasta 3 cm y sin metástasis. El “estadio IB”, según se emplea en la presente invención, se refiere a un tumor T2, N0, M0, es decir de hasta 7 cm y sin metástasis. Por “estadios más avanzados” se entienden aquellos tumores mayores de 7 cm o que presentan algún tipo de metástasis.

En una realización preferida de la invención, la determinación del pronóstico de un paciente se lleva a cabo mediante el predictor genómico-clínico que combina ambos valores de riesgo, VR_{gen} y VR_{clin} , según la fórmula:

$$(VR_{gen}) EST + (VR_{clin}) EST$$

en donde EST representa los valores estandarizados (media=0; desviación estándar=1). Los valores más altos de $VR_{gen-clin}$ implican mayor riesgo de fallecimiento tras padecer adenocarcinoma de pulmón.

Como se observa en la Tabla 6 en el Ejemplo 3, los valores del área bajo la curva del predictor genómico-clínico son mayores, lo que indica que la predicción a partir de datos genómicos y clínicos combinados es mejor.

El valor del estadístico de Wald es un valor empleado comúnmente por el experto en la materia para saber si las variables que se introducen en el análisis estadístico son o no relevantes. Dicho valor se puede calcular según se describe en Wald A. (Transactions of the American Mathematical Society. 1943; 54: 426-482) y Silvey (Silvey SD. Annals of Mathematical Statistics. 1959; 30: 389-407).

Por otro lado, para la puesta en práctica de la invención, aparte de cuantificar los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2, también se puede cuantificar el nivel de expresión de las proteínas codificadas por dichos genes. Así, en una realización particular, la cuantificación de los niveles de las proteínas codificadas por los genes identificados en las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación de dichas proteínas o variables de las mismas.

El término “proteína”, tal como aquí se utiliza, se refiere a una cadena molecular de aminoácidos, unidos por enlaces covalentes o no covalentes. El término incluye, además, todas las formas de modificaciones químicas post-traduccionales, relevantes fisiológicamente, por ejemplo, glicosilación, fosforilación o acetilación, etc.

En la presente invención se entiende por “variante”, una proteína cuya secuencia de aminoácidos es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos de una proteína concreta. Una secuencia de aminoácidos es sustancialmente homóloga a una secuencia de aminoácidos determinada cuando presenta un grado de identidad de, al menos, un 70%, ventajosamente de, al menos, un 75%, típicamente de, al menos, un 80%, preferentemente de, al menos, un 85%, más preferentemente de, al menos, un 90%, aún más preferentemente de, al menos, un 95%, 97%, 98% ó 99%, respecto a dicha secuencia de aminoácidos determinada. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST [Altschul S.F. *et al.*, Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3):403-10].

El experto en la materia entiende que, las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que dan lugar a sustituciones conservativas de aminoácidos en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutras que no afectan a su estructura global ni a su funcionalidad. Dichas variantes caen dentro del ámbito de la presente invención.

Por tanto, tal como aquí se utiliza, el término “variante” también incluye cualquier fragmento de una de las proteínas descritas en la presente invención. El término “fragmento” se refiere a un péptido que comprende una porción de una proteína.

El nivel de expresión de las proteínas codificadas por los genes identificados en las Tablas 1 y 2 puede ser cuantificado mediante cualquier método convencional que permita detectar y cuantificar dichas proteínas en una muestra de

un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dichas proteínas pueden cuantificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a dichas proteínas (o a fragmentos de las mismas que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar dichas proteínas, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de proteína codificada por los genes identificados en las Tablas 1 y 2 se realiza mediante western blot, ELISA, inmunohistoquímica o un array de proteínas.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un reactivo, de aquí en adelante reactivo de la invención, capaz de detectar los niveles de expresión de los genes de las Tablas 1 y 2.

En una realización particular, dicho reactivo de la invención comprende

- (i) un conjunto de ácidos nucleicos que comprende las secuencias de nucleótidos de las sondas identificadas en la Tabla 3 o los productos de su transcripción, o
- (ii) un conjunto de anticuerpos, o un fragmento de los mismos capaz de detectar un antígeno, consistente en que cada anticuerpo o fragmento es capaz de unirse específicamente a una de las proteínas codificadas por los genes identificados en las Tablas 1 y 2.

En una realización particular de la invención, dichos ácidos nucleicos son sondas y/o cebadores de ADN, ADNc o ARN. La obtención de dichos ácidos nucleicos puede realizarse por técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia a partir de las secuencias de nucleótidos de los genes de las Tablas 1 y 2. En general, dichas sondas y/o cebadores se pueden obtener de casas comerciales por síntesis química. Por otro lado, dichas secuencias de los dichos genes están bien descritas en la literatura y, por tanto, son conocidas.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende al menos un reactivo según la invención. En una realización particular de la invención, dicho kit es un array de ADN o ARN que comprende un conjunto de ácidos nucleicos, en donde dicho conjunto de ácidos nucleicos comprende las secuencias de nucleótidos de las sondas de la Tabla 3 o un fragmento de los mismos, o los productos de su transcripción. En una realización más particular, dicho kit comprende, además, una molécula de ácido nucleico de uno o varios genes de expresión constitutiva.

En la presente invención se entiende por “genes que se expresan de forma constitutiva” o “genes de expresión constitutiva”, a aquellos genes que siempre están activos o que se transcriben de manera constante. Ejemplos de genes que se expresan de forma constitutiva son 2-mioglobulina, ubiquitina, proteína ribosomal 18S, ciclofilina A, receptor de transferina, actina, GAPDH, proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (YWHAZ), ubiquitina, beta-actina y β -2-microglobulina.

En otra realización particular de la invención, el kit de la invención comprende un conjunto de anticuerpos, en donde dicho conjunto de anticuerpos consiste en anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por los genes identificados en las Tablas 1 y 2 o cualquier variante de dichas proteínas. En una realización particular, dicho kit comprende, además, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por uno o varios genes de expresión constitutiva.

Método de selección de marcadores genéticos de adenocarcinoma de pulmón

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar marcadores genéticos para predecir el pronóstico de un paciente de adenocarcinoma de pulmón que comprende:

- (i) determinar los genes cuya expresión se encuentra alterada respecto a un valor de referencia en una muestra de tumor de un animal no humano genéticamente modificado que muestra propensión a desarrollar tumores de forma espontánea;
- (ii) identificar los genes homólogos en humanos correspondientes a los genes identificados en la etapa (i); y
- (iii) seleccionar aquellos genes identificados en la etapa (ii) cuya expresión en muestras de tumores de pacientes con adenocarcinoma de pulmón con supervivencia de hasta 5 años está alterada con respecto a la expresión de dichos genes en tumores de pacientes con supervivencia inferior a 5 años.

ES 2 381 729 A1

Para la determinación de los genes cuya expresión se encuentra alterada según la etapa (i) primeramente se obtiene una muestra de dicho animal, preferiblemente dicha muestra es una muestra de tejido tumoral.

5 El término “gen supresor de tumores”, según se emplea aquí, se refiere a un gen que reduce la probabilidad de que una célula en un organismo multicelular se transforme en una célula cancerígena, inhibiendo la proliferación celular excesiva.

10 El término “expresión alterada”, según se emplea en la presente invención, se refiere a un aumento o disminución de los niveles de ARNm o proteína con respecto a los niveles de expresión en una muestra de referencia o control de un sujeto que no presenta la enfermedad.

15 El término “propensión a desarrollar tumores”, según se utiliza en la presente invención, se refiere a la situación en la que el sujeto presenta al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 100% de probabilidades de desarrollar tumores a lo largo del tiempo.

20 El término “gen homólogo”, según se emplea aquí, se refiere a una secuencia nucleotídica relacionada con un segundo gen por descendencia de una secuencia de ADN ancestral común y separados por el proceso de especiación o duplicación genética, pero con expresiones fenotípicas similares.

El término “supervivencia”, según se emplea en el presente documento, se refiere a un período de tiempo definido desde el diagnóstico del cáncer en que el paciente permanece vivo hasta que el paciente fallece.

25 En el Ejemplo 1 que acompaña la presente invención se describe un modo de realización particular del método de la invención. Así, en una realización particular, se extrae el ARN total de dicha muestra de tejido tumoral de animal no humano y dicho ARN se analiza para determinar los genes cuya expresión se encuentra alterada en dicha muestra de tumor con respecto a un valor de referencia. En una realización particular, dicho valor de referencia es el valor de la expresión génica en una muestra de tejido no tumoral procedente de dicho animal. Dicho valor de expresión se puede obtener, por ejemplo, a partir de los valores resultantes de la señal de expresión génica en un array de expresión génica de dicho modelo animal no humano según se explica en el Ejemplo 1 que acompaña la presente descripción. Así, dichos valores corresponden con los valores en los archivos tipo CEL (formato CEL) según el software GCOS (GeneChip® Operating Software) de Affymetrix.

35 En una realización particular del método para la selección de marcadores genéticos de la invención, dicho animal no humano es un animal en el que la expresión génica del gen Tp53 se encuentra inhibida. En otra realización particular, dicho animal presenta inhibida, además, la expresión génica del gen Rb. Los genes Tp53 y Rb1 codifican respectivamente los supresores tumorales p53 y pRb. Dichos modelos animales, deficientes para los genes p53 y Rb (p53- y Rb-), desarrollan espontáneamente carcinomas epidérmicos, altamente invasivos. Por tanto, en una realización particular, dicho animal es un animal no humano que desarrolla carcinomas epidérmicos de forma espontánea.

40 Para poner en práctica la etapa (ii) del método para seleccionar marcadores genéticos para predecir el pronóstico de un paciente con adenocarcinoma de pulmón, se identifican los genes homólogos en humanos correspondientes a los genes identificados en la etapa (i). Para ello, se emplean técnicas convencionales de mapeo de genes homólogos conocidas por el experto en la materia. En particular, los inventores han mapeado los identificadores de sondas de Affymetrix del animal no humano con símbolos de genes humanos a través de la búsqueda de identificadores U133A mediante el empleo de la utilidad web AILUM (Array Information Library Universal Navigator) (Chen R, *et al.*, Nat Methods 2007; 4(11): 879).

50 En una última etapa de dicho método, se seleccionan aquellos genes identificados en la etapa (ii) cuya expresión en muestras de tumores de pacientes con supervivencia de hasta 5 años está alterada con respecto a la expresión de dichos genes en tumores de pacientes con supervivencia inferior a 5 años.

55 En una realización particular de la invención, la etapa (iii) se lleva a cabo mediante un análisis de regresión de riesgos proporcionales según se ha comentado anteriormente. En una realización más particular, dicho análisis de regresión es un análisis de tipo Cox. En una realización preferida, dicho método de tipo Cox establece aparición de muerte como variable pronóstico. En una realización aún más preferida de la invención, la aparición de muerte es a 5 años.

60 Además, los inventores han aplicado el test de Wald (Wald A. Transactions of the American Mathematical Society 1943; 54: 426-482; Silvey SD. Annals of Mathematical Statistics 1959; 30: 389-407) para analizar la hipótesis nula de que el coeficiente sea 0 (no relacionado con la variable pronóstico), asignándose a cada gen un valor de estadístico de Wald, su correspondiente p-valor.

65 En una realización particular, la determinación de la expresión de dichos genes según la etapa (iii) comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dichos genes, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc), o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

En una realización más particular, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes según la etapa (iii) se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa multiplex o un array de ADN o ARN.

En una realización particular, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes según la etapa (iii) comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dichos genes. En una realización más particular, la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Análisis de tumores epidérmicos de ratón

Una caracterización previa de los ratones transgénicos utilizados se ha publicado recientemente (Martínez-Cruz, A. *et al.*, Cancer Res 2008 68: 683-92). Los modelos descritos son ratones K14Cre (expresan la recombinasa Cre en la capa basal de epitelios estratificados) cruzados con ratones con exones esenciales flanqueados por secuencias loxP en los alelos de los genes Tp53 (modelo p53-), o en los alelos Tp53 y Rb1 simultáneamente (modelo p53-; pRb-). Tp53 y Rb1 codifican respectivamente los supresores tumorales p53 y pRb. Se trata pues de modelos de delección génica en epitelios estratificados. Ambos modelos desarrollan espontáneamente carcinomas escamosos epidérmicos de tipo poco diferenciado o indiferenciado, altamente invasivos.

Se purificó ARN de carcinomas epidérmicos congelados de ratones deficientes en p53 (p53-) (7 tumores) y deficientes en p53 y pRb (p53-/pRb-) (8 tumores). Como controles, se obtuvo ARN de piel normal preservada en RNAlater de animales adultos (8 semanas edad, 5 muestras control). La integridad de las poblaciones de ARN se chequeó mediante el uso del sistema Bioanalyzer (Agilent). Todas las muestras de ARN pasaron los criterios de calidad para análisis de microarrays (número RIN (del inglés, RNA integrity number) por encima de 6). La hibridación al GeneChip de Affymetrix *Mouse Gene Expression* MOE430 2.0 se realizó en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, utilizando los protocolos estándar de Affymetrix. Los valores de expresión se extrajeron de los archivos CEL (resultantes del escaneo de la fluorescencia según el software GCOS de Affymetrix), mediante el método Robust Multichip Average (RMA) (Bolstad, B. M *et al.*, Bioinformatics 2003 19: 185-93, Irizarry, R. A., *et al.*, Biostatistics 2003 4: 249-64). Todas las hibridaciones pasaron los criterios de calidad incluidos en el programa informático RMAExpress, usando las gráficas RLE y NUSE. Los datos se encuentran disponibles en la base de datos GEO del NCBI, bajo el identificador GSE11990. Se realizaron análisis de expresión génica diferencial de los tumores de ratón comparados con tejido normal mediante el Test de la T de Student (Ttest) y SAM (Significant Analysis of Microarrays) (Tusher, V. G. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A 2001 98: 5116-21) en el software libre Multiexperiment Viewer 4.0 (MeV 4) (Saeed, A. I *et al.*, Biotechniques 2003 34: 374-8). Las sondas se seleccionaron si pasaban dos criterios: (i) análisis Ttest con p-valor de probabilidad, corregido por el método False Discovery Rate (1) ó FDR < 3×10^{-7} ; y (ii) análisis SAM con FDR < 1×10^{-3} . Un total de 682 sondas se seleccionaron como expresados diferencialmente, siendo 371 sobreexpresados y 311 regulados negativamente en los tumores frente a tejido normal. Los identificadores de Affymetrix del chip usado (MOE430 2.0) se mapearon al símbolo de gen homólogo de humano usando la utilidad web Ailun (Chen R. *et al.*, Nat Methods 2007 4: 879), lo que resultó en un número de 427 genes humanos.

Ejemplo 2

Predictor de supervivencia global genómico-clínico de adenocarcinoma de pulmón

2.1 Obtención del predictor genómico de supervivencia global

Los datos crudos de hibridación a microarrays de tumores primarios de adenocarcinoma de pulmón humano y sus correspondientes datos clínicos, realizados con la versión de GeneChip de Affymetrix *Human Gene Expression* U133A, se descargaron desde la página web <https://array.nci.nih.gov/caarray/project/jacob-00182>. Estos datos corresponden a un estudio multicéntrico con datos de expresión de 442 adenocarcinomas de pulmón, cuyo objetivo fue el de realizar predicciones de supervivencia basado en expresión génica (Director's Challenge Consortium for the Molecular Classification of Lung Adenocarcinoma) (Shedden, K. *et al* Nat Med 2008 14:822-7), con muestras provenientes de 4 instituciones distintas: "University of Michigan Cancer Center" (UM), "Moffitt Cancer Center" (HLM), "Memorial Sloan-Kettering Cancer Center" (MSK), y "Dana-Farber Cancer Institute" (CAN/DF). Los archivos CEL se tomaron para extraer los valores de intensidad de señal usando el programa RMAExpress.

Los tumores de estadio IA y IB (n=275) se utilizaron como grupo de entrenamiento (*training set*). Un análisis de regresión de *riesgos proporcionales de Cox* se realizó usando supervivencia global (SG) a 5 años para las 707 sondas de U133A correspondientes a los 427 genes humanos mapeados del análisis de expresión diferencial de los tumores de ratón, usando la utilidad de *supervivencia* implementada en la página web GEPAS (www.gepas.org) (Vaquerizas, J. M *et al.*, Nucleic Acids Res 2005 33: W616-20). El análisis de Cox asigna un coeficiente de regresión de Cox para cada sonda, de tal forma que una sonda cuya expresión esté directamente correlacionada con aparición de muerte es

ES 2 381 729 A1

5 > 0, y si su expresión está relacionada inversamente con muerte es < 0. Además, se aplica el test de Wald (Silvey, S. D. *Annals of Mathematical Statistics* 1959 30: 389-407, Wald, A. *Transactions of the American Mathematical Society* 1943 54: 426-482) para analizar la hipótesis nula de que el coeficiente sea 0 (no relacionado con muerte), asignándose a cada sonda un valor de estadístico de Wald, su correspondiente p-valor (Benjamini, Y *et al.*, *Journal of the Royal Statistical Society B* 1995 57: 289-300). Las sondas con valores de estadístico de Wald >2,5 o <-2,5 fueron elegidas para análisis posteriores (36 sondas) (Tabla 4). Estos análisis tienen como objetivo comprobar la capacidad de predicción de supervivencia global de adenocarcinoma de pulmón humano de los patrones de expresión génica.

10 Se aplicó una fórmula para calcular un “valor de riesgo genómico” (VR_{gen}) de cada tumor basado en las 36 sondas

$$15 \quad VR_{gen} = \sum_{i=1}^{n=36} s_i \cdot x_i$$

20 donde x_i es el valor del nivel de expresión en log2 estandarizado (media=0 y desviación estándar=1) de cada uno de dichos genes identificados en las Tablas 1 y 2; y

s_i es el valor del estadístico de Wald del análisis de regresión de tipo Cox para cada uno de dichos genes identificados en las Tablas 1 y 2.

25 Dicha fórmula asigna un valor numérico a cada muestra (VR_{gen}), basado en la suma de los productos de los valores de expresión estandarizados de cada gen (media=0, desviación estándar=1) y los valores del estadístico de Wald respectivos obtenidos según el análisis de Cox explicado anteriormente (Tabla 4). Los valores VR_{gen} de los 275 tumores de los estadios IA y IB del estudio del “Director’s Challenge Consortium” fueron calculados. Se computaron *Curvas Operador Receptor* (COR) para los VR_{gen} usando como variable dependiente la variable de Supervivencia Global a 3 ó 30 5 años, censurada. El test basado en la firma de 36 sondas nos permite predecir Supervivencia Global con significación (área bajo la curva (ABC)=0,664, p-val=0,0004 a 3 años; ABC=0,654, p-val=0,00007 a 5 años).

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

Tabla 4

Identificador sonda Affymetrix	Estadístico Wald	Coefficiente Cox	p-valor	Simbolo Gen	Título Gen
210074_at	3.44	0.37	5.8E-04	CTSL2	cathepsin L2
203091_at	3.41	1.31	6.6E-04	FUBP1	far upstream element (FUSE) binding protein 1
201897_s_at	3.36	0.45	7.8E-04	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B
203967_at	3.17	0.51	1.5E-03	CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
218498_s_at	3.13	0.42	1.8E-03	ERO1L	ERO1-like (S. cerevisiae)
203968_s_at	3.02	0.56	2.5E-03	CDC6	cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)
218073_s_at	2.92	0.47	3.6E-03	TMEM48	transmembrane protein 48
210567_s_at	2.90	0.75	3.8E-03	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
204033_at	2.88	0.38	4.0E-03	TRIP13	thyroid hormone receptor interactor 13
205394_at	2.83	0.52	4.7E-03	CHEK1	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)
214727_at	2.79	1.29	5.3E-03	BRCA2	breast cancer 2, early onset
212139_at	2.76	0.78	5.9E-03	GCN1L1	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)
219262_at	2.74	3.63	6.1E-03	SUV39H2	suppressor of variegation 3-9 homolog 2 (Drosophila)
217839_at	2.73	0.66	6.4E-03	TFG	TRK-fused gene
213346_at	2.71	0.66	6.7E-03	C13orf27	chromosome 13 open reading frame 27
203625_x_at	2.70	0.37	6.8E-03	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
219787_s_at	2.68	0.27	7.3E-03	ECT2	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene
220651_s_at	2.67	0.51	7.7E-03	MCM10	minichromosome maintenance complex component 10
203626_s_at	2.65	0.87	8.1E-03	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
222039_at	2.65	0.45	8.2E-03	KIF18B	kinesin family member 18B
216232_s_at	2.62	0.77	8.7E-03	GCN1L1	GCN1 general control of amino-acid synthesis 1-like 1 (yeast)
214431_at	2.61	0.54	9.2E-03	GMPS	guanine monophosphate synthetase
200853_at	2.60	0.50	9.3E-03	H2AFZ	H2A histone family, member Z
219212_at	2.59	0.51	9.7E-03	HSPA14	heat shock 70kDa protein 14
203362_s_at	2.58	0.28	1.0E-02	MAD2L1	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)
204531_s_at	2.57	0.58	1.0E-02	BRCA1	breast cancer 1, early onset
219539_at	2.56	0.76	1.0E-02	GEMIN6	gem (nuclear organelle) associated protein 6
221520_s_at	2.56	0.54	1.1E-02	CDCA8	cell division cycle associated 8
213911_s_at	2.55	0.50	1.1E-02	H2AFZ	H2A histone family, member Z
218542_at	2.53	0.27	1.1E-02	CEP55	centrosomal protein 55kDa
204170_s_at	2.53	0.29	1.2E-02	CKS2	CDC28 protein kinase regulatory subunit 2
203418_at	2.51	0.37	1.2E-02	CCNA2	cyclin A2
202341_s_at	-2.50	-0.31	1.2E-02	TRIM2	tripartite motif-containing 2
210825_s_at	-2.59	-0.51	9.6E-03	PEBP1	phosphatidylethanolamine binding protein 1
205353_s_at	-2.99	-0.51	2.8E-03	PEBP1	phosphatidylethanolamine binding protein 1
39729_at	-3.02	-0.41	2.5E-03	PRDX2	peroxiredoxin 2

2.2 Obtención de un predictor clínico de supervivencia global

Simultáneamente, se realizó un análisis similar de Cox, pero para las variables estadio, Edad y Sexo del paciente. En esta ocasión se utilizaron los datos de todos los pacientes de UM, y de HLM (n=253). En el caso de la variable estadio, se codificó como valor=1 al estadio IA, como valor=2 al estadio IB, y como valor=3 a estadios más avanzados como II, III ó IV. En el caso de la variable Edad del paciente, se consideró dicha variable como continua. En el caso de la variable Sexo, se codificó como valor=1 al sexo=hombre, y como valor=-1 al sexo=mujer.

TABLA 5

Valores estadísticos del análisis de Cox de las variables clínicas

Variable	Estadístico Wald	Coefficiente Cox	Valor P
Estadio	6.48	0.67	9.4E-11
Edad	2.09	0.20	3.6E-02
Sexo	1.71	0.16	8.7E-02

Para cada paciente se calculó un valor de riesgo clínico (VR_{clin}) similar al VR_{gen} , pero a partir de los tres parámetros clínicos descritos y de los valores de los estadísticos de Wald mencionados (Tabla 5), usando la codificación descrita de dichos parámetros clínicos y según la fórmula descrita a continuación:

$$VR_{clin} = (Edad \cdot 2,09) EST + (Sexo \cdot 1,71) EST + (estadio \cdot 6,48) EST$$

En donde la Edad indica el valor en años del paciente en el momento del diagnóstico, la variable Sexo se ha codificado como varón=1, hembra=-1 y el estadio fue codificado como IA=1; IB=2; resto=3.

EST: valores estandarizados (media=0; desviación estándar=1).

Se calcularon los valores VR_{clin} de los 253 tumores de los pacientes de UM, y de HLM del estudio del “Director’s Challenge Consortium”. Se computaron *Curvas Operador Receptor* (COR) para los VR_{clin} usando como variable dependiente la variable de Supervivencia Global a 3 ó 5 años, censurada. El test clínico permitió predecir Supervivencia Global con significación (ABC=0,631, p-val=0,0006 a 3 años; ABC=0,657, p-val=0,000001 a 5 años).

2.3 Obtención de un predictor combinado genómico-clínico de supervivencia global

Se calculó para cada paciente un valor de riesgo genómico-clínico ($VR_{gen-clin}$), basado en los VR_{gen} y VR_{clin} según la fórmula

$$VR_{gen-clin} = (VR_{gen})EST + (VR_{clin})EST$$

EST: valores estandarizados (media=0; desviación estándar=1).

Se calcularon los valores de los tres VR (VR_{gen} , VR_{clin} y $VR_{gen-clin}$) y se usaron para la predicción de la supervivencia global en nuevos tumores.

Ejemplo 3

Validación de los predictores genómico, clínico, ó genómico-clínico de supervivencia en grupos de adenocarcinomas de pulmón externos de otros estudios

Se utilizaron dos grupos de tumores para la validación que contienen la información genómica y clínica necesaria: (1) tumores de estadios II, III y IV de los centros MSK y CAN/DF del mismo estudio “Director’s Challenge Consortium” (n=67) y (2) grupo de tumores del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center independiente del incluido en el estudio del “Director’s Challenge Consortium” (Nguyen, D. X. *et al.*, Cell 2009 138: 51-62), y que incluye pacientes de todos los estadios (I, II, III y IV) (n=129). Se analizaron los tumores en grupo, bien de todos ellos en conjunto, bien del subconjunto de tumores de estadios IA y IB, cuyo comportamiento clínico es en general más difícil de predecir.

ES 2 381 729 A1

En primer lugar, se computaron curvas COR para la predicción de supervivencia global a 5 años, tanto del total de los tumores (n=196) como del subgrupo de tumores de estadio I (n=88). Como se muestra en la Tabla 6, tanto el predictor genómico como el genómico-clínico poseen valores de ABC significativos tanto en tumores de todos los estadios como en los tumores tempranos. Además, se puede apreciar que los valores de ABC son mayores en el caso del predictor genómico-clínico, lo que indica que la predicción a partir de datos genómicos y clínicos combinados es mejor.

TABLA 6

Análisis COR de la predicción de supervivencia global a 5 años

Predictor	Todos Estadios (n=196)		Estadios IA y IB (n=88)	
	ABC*	p-val	ABC*	p-val
Genómico	0,624	0,007	0,692	0,04
Clínico	0,648	0,001	0,669	0,071
Genómico-clínico	0,676	0,00008	0,730	0,014

* ABC: área bajo la curva

En segundo lugar, se decidió dividir los tumores en tres percentiles o grupos de riesgo en función del $VR_{gen-clin}$: (i) percentil 33 de valores altos=grupo de alto riesgo (A); (ii) percentil 66 de valores intermedios=grupo de riesgo intermedio (I); y (iii) percentil 100 de valores bajos=grupo de bajo riesgo (B). A partir de esta estratificación de pacientes, se representaron curvas de Kaplan-Meier, tanto para el global de los pacientes (n=196), (Figura 1A) como para los pacientes de estadios tempranos (n=88) (Figura 1B). Como se puede observar, las probabilidades de supervivencia de los 3 grupos es acorde con el grupo de riesgo al que pertenece. Además, en el grupo de bajo riesgo de los pacientes de estadio temprano no existe ningún paciente que haya fallecido, lo que demuestra que el método basado en el cálculo de $VR_{gen-clin}$ es muy sensible.

Por otro lado, se juntaron los pacientes de riesgo alto (A) e intermedio (I) en un único grupo (AI) y, comparando con el grupo de riesgo bajo (B), se calculó especificidad y sensibilidad de la predicción de supervivencia a 5 años (Tabla 7). Finalmente, se hizo análisis de regresión de Cox también a 5 años, tanto de la variable $VR_{gen-clin}$ continua como dicotómica (grupo AI frente a B) (Tabla 8). Los resultados demuestran que el test genómico-clínico es capaz de distinguir grupos de pacientes con riesgo de muerte significativamente distinto tras padecer adenocarcinoma de pulmón.

TABLA 7

Sensibilidad y especificidad de la predicción genómico-clínica de supervivencia global a 5 años

	Sensibilidad (IC* 95%)	Especificidad (IC* 95%)
Todos Estadios (n=196)	0,92 (0,81-0,97)	0,38 (0,30-0,47)
Estadios IA y IB (n=88)	1,00 (0,68-1,00)	0,53 (0,42-0,65)

* IC: intervalo de confianza

ES 2 381 729 A1

TABLA 8

Análisis de regresión de Cox de predicción de supervivencia genómico-clínica

	Variable continua			Variable dicotómica ¹		
	RR ²	IC ³ 95%	p-val	RR ²	IC ³ 95%	p-val
Todos estadios (n=196)	1,89	1,37-2,38	0,00003	5,2	2,10-13,01	0,0004
Estadios IA y IB (n=88)	1,78	1,04-3,06	0,04	NA	NA	NA

¹Grupo de riesgo alto (A) e intermedio (I) frente a grupo de bajo (B) riesgo

²RR: riesgo relativo

³Intervalo de confianza

NA: no aplicable (en el grupo de bajo riesgo no hay casos censurados)

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para determinar el pronóstico de un sujeto diagnosticado con adenocarcinoma de pulmón que comprende determinar los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 en una muestra de tejido tumoral procedente de dicho sujeto, en donde un aumento de la expresión de los genes identificados en la Tabla 1 y una disminución de la expresión de los genes identificados en la Tabla 2 con respecto a un valor de referencia es indicativo de un peor pronóstico.

2. Método según la reivindicación 1, en donde la cuantificación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación del ARN mensajero (ARNm) de dichos genes, o un fragmento de dicho ARNm, el ADN complementario (ADNc) de dichos genes, o un fragmento de dicho ADNc, o sus mezclas.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la cuantificación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa multiplex o un array de ADN o ARN.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la determinación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 se realiza mediante un array de ADN que comprende las sondas identificadas en las Tabla 3.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la determinación de dicho pronóstico comprende un análisis de regresión de riesgos proporcionales de dicho pronóstico en función de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2.

6. Método según la reivindicación 5, donde dicho análisis de regresión de riesgos proporcionales es un análisis de tipo Cox.

7. Método según la reivindicación 6, donde en dicho análisis de tipo Cox se establece aparición de muerte como variable pronóstico.

8. Método según la reivindicación 7, donde dicha aparición de muerte es a 5 años.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la determinación de dicho pronóstico se lleva a cabo aplicando la siguiente fórmula:

$$\sum_{i=1}^{n=36} s_i \cdot x_i$$

en donde x_i es el valor del nivel de expresión en log2 estandarizado (media=0 y desviación estándar=1) de cada uno de dichos genes identificados en las Tablas 1 y 2; y

s_i es el valor del estadístico de Wald del análisis de regresión de tipo Cox para cada uno de dichos genes identificados en las Tablas 1 y 2 según las reivindicaciones 6 a 8,

en donde si dicho valor es mayor que cero entonces es indicativo de que dicho paciente presenta peor pronóstico y donde si dicho valor es menor que cero es indicativo de que dicho paciente presenta mejor pronóstico.

10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, que comprende además determinar al menos un parámetro clínico seleccionado entre la edad del sujeto, el sexo del sujeto y el estadio tumoral, en donde a menor edad del sujeto, sexo masculino y grado tumoral más avanzado, es indicativo de un peor pronóstico.

11. Método según la reivindicación 1, en donde la cuantificación de los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2 comprende la cuantificación de los niveles de proteína codificada por dichos genes o de una variante de la misma.

12. Método según la reivindicación 11, en donde la cuantificación de los niveles de proteína se realiza mediante western blot, ELISA o un array de proteínas.

ES 2 381 729 A1

13. Un reactivo capaz de detectar los niveles de expresión de los genes identificados en las Tablas 1 y 2, que comprende:

- (i) un conjunto de ácidos nucleicos que comprende las secuencias de nucleótidos de las sondas identificadas en la Tabla 3 o los productos de su transcripción, o
- (ii) un conjunto de anticuerpos, o un fragmento de los mismos capaz de detectar un antígeno, consistente en que cada anticuerpo o fragmento es capaz de unirse específicamente a una de las proteínas codificadas por los genes cuyas secuencias de nucleótidos hibridan con las sondas identificadas en la Tabla 3.

14. Reactivo según la reivindicación 13, en donde los ácidos nucleicos son sondas y/o cebadores de ADN, ADNc o ARN.

15. Un kit que comprende al menos un reactivo según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 14.

16. Kit según la reivindicación 15, donde dicho kit es un array de ADN o ARN que comprende un conjunto de ácidos nucleicos, en donde dicho conjunto de ácidos nucleicos comprende las secuencias de nucleótidos de las sondas de la Tabla 3, o un fragmento de los mismos, o los productos de su transcripción.

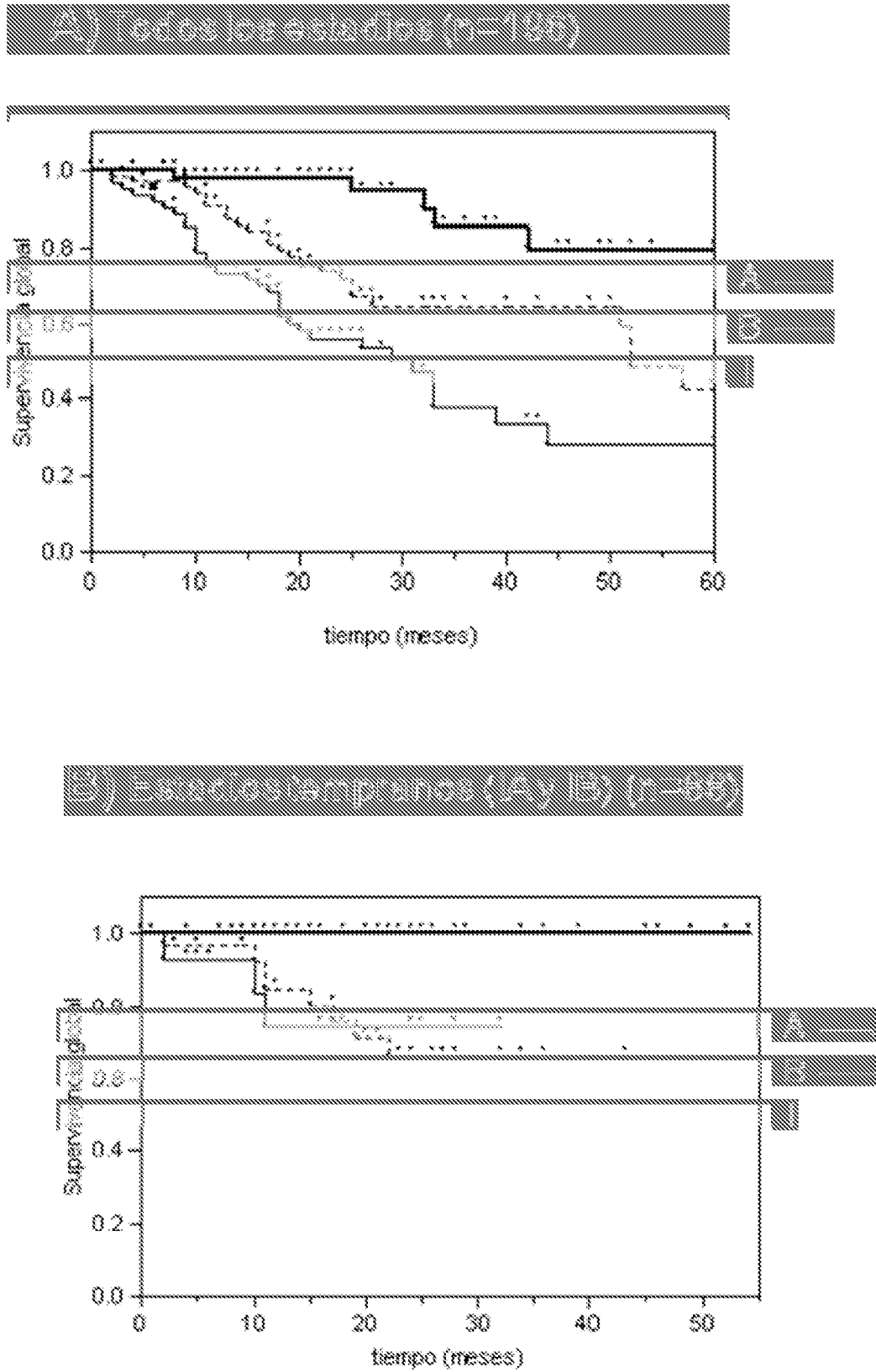
17. Kit según la reivindicación 16, que comprende además, una molécula de ácido nucleico de uno o varios genes de expresión constitutiva.

18. Kit según la reivindicación 17 que comprende un conjunto de anticuerpos, en donde dicho conjunto de anticuerpos consiste en anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por los genes identificados en las Tablas 1 y 2 o cualquier variante de dichas proteínas.

19. Kit según la reivindicación 18, que comprende además, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente con las proteínas codificadas por uno o varios genes de expresión constitutiva.

20. Uso de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19 para el pronóstico de pacientes diagnosticados con adenocarcinoma de pulmón.

FIGURA 1



ES 2 381 729 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> CENTRO DE INVESTIGACIONES ENERGÉTICAS, MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLÓGICAS
(CIEMAT), UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
- <120> TEST PREDICTOR DE SUPERVIVENCIA GLOBAL DE ADENOCARCINOMA DE PULMÓN
- 10 <130> P5907ES00
- <160> 401
- 15 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence
- <220>
25 <223> Sonda 1 para la determinación de la expresión del gen CTSL2
- <400> 1
gttgctaatg acactggctt cacag 25
- 30 <210> 2
<211> 25
<212> DNA
35 <213> Artificial Sequence
- <220>
40 <223> Sonda 2 para la determinación de la expresión del gen CTSL2
- <400> 2
cttcacagtg gtcgcacctg gaaag 25
- 45 <210> 3
<211> 25
<212> DNA
50 <213> Artificial Sequence
- <220>
55 <223> Sonda 3 para la determinación de la expresión del gen CTSL2
- <400> 3
gaaagcagtc gcaactgtgg ggccc 25
- 60 <210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- 65 <220>
<223> Sonda 4 para la determinación de la expresión del gen CTSL2

ES 2 381 729 A1

	<400> 4	
	gcccacatctcc gttgctatgg atgca	25
5	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 5 para la determinación de la expresión del gen CTSL2	
15	<400> 5	
	ctatggatgc aggccattcg tcctt	25
20	<210> 6	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 6 para la determinación de la expresión del gen CTSL2	
30	<400> 6	
	aaacctggat catggtgttc tggtg	25
	<210> 7	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 7 para la determinación de la expresión del gen CTSL2	
	<400> 7	
45	ggtggttggc tacggctttg aagga	25
	<210> 8	
50	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
55	<220>	
	<223> Sonda 8 para la determinación de la expresión del gen CTSL2	
	<400> 8	
60	ggctcgtcaa aaacagctgg ggtcc	25
	<210> 9	
	<211> 25	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 9 para la determinación de la expresión del gen CTSL2

5 <400> 9
 gaatggggct cgaatggcta tgtaa 25

<210> 10
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 10 para la determinación de la expresión del gen CTSL2

<400> 10
20 gctaccccaa tgtgtgagct gatgg 25

<210> 11
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Sonda 11 para la determinación de la expresión del gen CTSL2

<400> 11
35 gaaactgacc aaacgcttat tgtgt 25

<210> 12
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 12 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

<400> 12
50 gccccagctg gacaggttga ttata 25

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
60 <223> Sonda 13 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

<400> 13
 aaatgggtca ggcagttcct gctcc 25

65 <210> 14
<211> 25

ES 2 381 729 A1

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sonda 14 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

<400> 14
10 tcctccaggt ggtcagccag attat 25

<210> 15
<211> 25

15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Sonda 15 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

<400> 15
25 ggtcagccag attatagtgc agcct 25

<210> 16
<211> 25

30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Sonda 16 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

<400> 16
 gcagcctggg ctgagcatta tagac 25

40 <210> 17
<211> 25

<212> DNA
45 <213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Sonda 17 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

<400> 17
 aacaagcagc ctattatgcc cagac 25

55 <210> 18
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

60 <220>
<223> Sonda 18 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

<400> 18
65 tatgcccaga caagtcccca gggaa 25

ES 2 381 729 A1

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 19 para la determinación de la expresión del gen FUBP1
10
<400> 19
ctccagcacc tcagggccaa taata 25

15 <210> 20
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 20 para la determinación de la expresión del gen FUBP1
25
<400> 20
agtatttgct tcattgtgtg gggga 25

30 <210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 21 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

40 <400> 21
atatggatgc agacgacttg atgaa 25

45 <210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 22 para la determinación de la expresión del gen FUBP1

55 <400> 22
aattatgtgg ttgatgcttt gtgat 25

<210> 23
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 23 para la determinación de la expresión del gen CKS1B

ES 2 381 729 A1

	<400> 23		
	ggaatccttg cgttcagcag agtca		25
5	<210> 24		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
10	<220>		
	<223> Sonda 24 para la determinación de la expresión del gen CKS1B		
15	<400> 24		
	gatccatgaa ccagaacctc acatc		25
	<210> 25		
20	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
25	<220>		
	<223> Sonda 25 para la determinación de la expresión del gen CKS1B		
30	<400> 25		
	tacttttcag cctcaagctt tacac		25
	<210> 26		
	<211> 25		
35	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
40	<220>		
	<223> Sonda 26 para la determinación de la expresión del gen CKS1B		
	<400> 26		
45	agctttacac agctgtcctt acttc		25
	<210> 27		
	<211> 25		
50	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
55	<223> Sonda 27 para la determinación de la expresión del gen CKS1B		
	<400> 27		
	cttacttcct aacatctttc tgata		25
60	<210> 28		
	<211> 25		
	<212> DNA		
65	<213> Artificial Sequence		

ES 2 381 729 A1

	<220>	
	<223> Sonda 28 para la determinación de la expresión del gen CKS1B	
5	<400> 28	
	ggtaactgct ttgcttcttg agtag	25
	<210> 29	
10	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	<223> Sonda 29 para la determinación de la expresión del gen CKS1B	
	<400> 29	
20	gcccagccag atgagtgctc tgtgg	25
	<210> 30	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
30	<223> Sonda 30 para la determinación de la expresión del gen CKS1B	
	<400> 30	
35	gtggacccac agcctaagct gagtg	25
	<210> 31	
	<211> 25	
	<212> DNA	
40	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
45	<223> Sonda 31 para la determinación de la expresión del gen CKS1B	
	<400> 31	
	taagctgagt gtgaccccag aagcc	25
50	<210> 32	
	<211> 25	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 32 para la determinación de la expresión del gen CKS1B	
60	<400> 32	
	agaagccacg atgtgctctg tatcc	25
	<210> 33	
65	<211> 25	
	<212> DNA	

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 33 para la determinación de la expresión del gen CKS1B

<400> 33

tgccgggtgt tgtatgtgtg gtgac 25

10 <210> 34

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 34 para la determinación de la expresión del gen CDC6

20 <400> 34

taatatcttt gggctcttact atttt 25

25 <210> 35

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 35 para la determinación de la expresión del gen CDC6

35 <400> 35

cataaaagtg accaggtaga ccctt 25

<210> 36

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 36 para la determinación de la expresión del gen CDC6

50 <400> 36

taattacatt cactacttct accac 25

<210> 37

<211> 25

55 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> Sonda 37 para la determinación de la expresión del gen CDC6

<400> 37

65 attcactact tctaccactt gtgta 25

ES 2 381 729 A1

<210> 38
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 38 para la determinación de la expresión del gen CDC6
10
<400> 38
accacttgtagc tatctctagc caatg 25

15 <210> 39
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 39 para la determinación de la expresión del gen CDC6
25
<400> 39
gtatctctag ccaatgtgct tgcaa 25

30 <210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 40 para la determinación de la expresión del gen CDC6

40 <400> 40
gtgcttgcaa gtgtacagat ctgtg 25

45 <210> 41
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 41 para la determinación de la expresión del gen CDC6

55 <400> 41
atgtgtgtat atttacctct tcgtt 25

<210> 42
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 42 para la determinación de la expresión del gen CDC6

ES 2 381 729 A1

	<400> 42		
	tttacctctt cgtttgctca aacat		25
5	<210> 43		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
10	<220>		
	<223> Sonda 43 para la determinación de la expresión del gen CDC6		
15	<400> 43		
	tgttgttttt gaggecgctc tcacc		25
	<210> 44		
20	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
25	<220>		
	<223> Sonda 44 para la determinación de la expresión del gen CDC6		
30	<400> 44		
	catgctcagc cattaaggta ttttg		25
	<210> 45		
	<211> 25		
35	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
40	<220>		
	<223> Sonda 45 para la determinación de la expresión del gen CDC6		
45	<400> 45		
	ttccctcttc agcagaagat cttgg		25
	<210> 46		
	<211> 25		
50	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
55	<220>		
	<223> Sonda 46 para la determinación de la expresión del gen CDC6		
60	<400> 46		
	gatcttggtt tgctctttga tgctc		25
	<210> 47		
	<211> 25		
	<212> DNA		
65	<213> Artificial Sequence		

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 47 para la determinación de la expresión del gen CDC6

5 <400> 47
gctctttgat gctcttgatc aggca 25

<210> 48
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 48 para la determinación de la expresión del gen CDC6

<400> 48
20 gtcgcaaaca gcaggtggcg gctgt 25

<210> 49
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 49 para la determinación de la expresión del gen CDC6

<400> 49
35 gcggtgtgg accagtcaga gtggt 25

<210> 50
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 50 para la determinación de la expresión del gen CDC6

<400> 50
tgtcactttc agggctcttg gaagc 25

50 <210> 51
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 51 para la determinación de la expresión del gen CDC6

60 <400> 51
gaaatatctt agctactgga ttgcc 25

65 <210> 52
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 52 para la determinación de la expresión del gen CDC6

<400> 52

tactggattg ccttaaattc ttctc 25

10 <210> 53

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 53 para la determinación de la expresión del gen CDC6

20 <400> 53

acccacccg aaagtattca gctgg 25

25 <210> 54

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 54 para la determinación de la expresión del gen CDC6

35 <400> 54

ggcatttaga gagctacagt cttca 25

<210> 55

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 55 para la determinación de la expresión del gen CDC6

<400> 55

50 tgctttacac attcgggcct gaaaa 25

<210> 56

<211> 25

55 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

60 <223> Sonda 56 para la determinación de la expresión del gen ERO1L

<400> 56

65 tcaagttcca atctaaagtt ctttt 25

ES 2 381 729 A1

<210> 57
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 57 para la determinación de la expresión del gen ERO1L
10

<400> 57
gagttttggt gcccgtttta tgctt 25

15 <210> 58
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 58 para la determinación de la expresión del gen ERO1L

25 <400> 58
gttgcccgtt ttatgcttga tgtgt 25

30 <210> 59
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 59 para la determinación de la expresión del gen ERO1L

40 <400> 59
ctggaacttg aacgactggg ctgaa 25

45 <210> 60
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 60 para la determinación de la expresión del gen ERO1L

<400> 60
55 taccogaagt tcatttcctt tgtct 25

<210> 61
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 61 para la determinación de la expresión del gen ERO1L

ES 2 381 729 A1

	<400> 61	
	tcctttgtct ccctaaaact gaact	25
5	<210> 62	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 62 para la determinación de la expresión del gen ERO1L	
15	<400> 62	
	ggttttcatt agtggagct cttca	25
	<210> 63	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 63 para la determinación de la expresión del gen ERO1L	
30	<400> 63	
	ggggtttagg aatttatatc acatg	25
	<210> 64	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 64 para la determinación de la expresión del gen ERO1L	
45	<400> 64	
	ctatatacct caaaatcgtg ccctc	25
	<210> 65	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 65 para la determinación de la expresión del gen ERO1L	
	<400> 65	
	gtgccctcctt tacatatgtc ttatc	25
60	<210> 66	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 66 para la determinación de la expresión del gen ERO1L

5 <400> 66
atgtcagttt acactgctgt atact 25

<210> 67
<211> 25
10 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 67 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

<400> 67
20 aggtctgtcg cacttagtag cagca 25

<210> 68
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 68 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

<400> 68
35 gagttgtcca gacgacacta ccagc 25

<210> 69
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 69 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

<400> 69
accagctatc ctttaatactt tgttg 25

50 <210> 70
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

55 <220>
<223> Sonda 70 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

60 <400> 70
acaagtactt taagcttcct catgc 25

<210> 71
65 <211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 71 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

<400> 71

accccgatt tcaggaagcc ttgtg 25

10 <210> 72

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 72 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

20 <400> 72

atcactgaaa actgcatct atcga 25

25 <210> 73

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 73 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

35 <400> 73

gacttcaaca gttcttgag ttcaa 25

<210> 74

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 74 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

50 <400> 74

gacttcaaca gttcttgag ttcaa 25

<210> 75

<211> 25

55 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> Sonda 75 para la determinación de la expresión del gen TMEM48

<400> 75

65 gtgttcatta cactgctgat acaac 25

ES 2 381 729 A1

<210> 76
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 76 para la determinación de la expresión del gen TMEM48
10
<400> 76
attagatgct tcctttgtcg tggcg 25

15 <210> 77
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 77 para la determinación de la expresión del gen TMEM48
25
<400> 77
ccttttctgt accgattgct ttttg 25

30 <210> 78
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 78 para la determinación de la expresión del gen SKP2

40 <400> 78
ctcaaattta gtgcgactta acctt 25

<210> 79
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 79 para la determinación de la expresión del gen SKP2

<400> 79
55 agactggatg agctgaacct ctcct 25

<210> 80
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 80 para la determinación de la expresión del gen SKP2

ES 2 381 729 A1

	<400> 80	
	gcatgtacag gtggctggtg cgcat	25
5	<210> 81	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 81 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
15	<400> 81	
	agcggctaca gaaagaatct ccaga	25
	<210> 82	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 82 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
30	<400> 82	
	agaatctcca gaaatcagat ctctc	25
	<210> 83	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 83 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
45	<400> 83	
	aatcagatc tctctacttt agtta	25
	<210> 84	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 84 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
60	<400> 84	
	agttagaaga tgccccaatc ttgtc	25
	<210> 85	
	<211> 25	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 85 para la determinación de la expresión del gen SKP2

5 <400> 85
agaatgact gctttcagga atttt 25

<210> 86
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 86 para la determinación de la expresión del gen SKP2

<400> 86
20 caacacctat cactcagtcg gtgct 25

<210> 87
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 87 para la determinación de la expresión del gen SKP2

<400> 87
35 acctatcact cagtcggtgc tatga 25

<210> 88
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 88 para la determinación de la expresión del gen SKP2

<400> 88
tggaatcgtg ccagatggta ccctt 25

50 <210> 89
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 89 para la determinación de la expresión del gen SKP2

60 <400> 89
gagaaattcc cacactaaaa acact 25

<210> 90
65 <211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<210> 95
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 95 para la determinación de la expresión del gen SKP2
10

<400> 95
ggcatcaaat gccgactgac actgc 25

15 <210> 96
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 96 para la determinación de la expresión del gen SKP2

25 <400> 96
tgccgactga cactgcaaaa gccca 25

<210> 97
30 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 97 para la determinación de la expresión del gen SKP2

40 <400> 97
aaagcccagt tgtctatgaa gtatt 25

<210> 98
<211> 25
45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Sonda 98 para la determinación de la expresión del gen SKP2

<400> 98
55 atttattgca ggatggtgtc tcttc 25

<210> 99
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 99 para la determinación de la expresión del gen SKP2

ES 2 381 729 A1

	<400> 99		
	ggaagcccaa ttgctggagt actta		25
5	<210> 100		
	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
10	<220>		
	<223> Sonda 100 para la determinación de la expresión del gen TRIP13		
15	<400> 100		
	gaagaaccat cgaaacctgt ttgtt		25
	<210> 101		
20	<211> 25		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
25	<220>		
	<223> Sonda 101 para la determinación de la expresión del gen TRIP13		
	<400> 101		
30	aaatgcacac attactccag gtgga		25
	<210> 102		
	<211> 25		
35	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
40	<223> Sonda 102 para la determinación de la expresión del gen TRIP13		
	<400> 102		
45	ggtggcaatt gctttctgat atcag		25
	<210> 103		
	<211> 25		
	<212> DNA		
50	<213> Artificial Sequence		
	<220>		
55	<223> Sonda 103 para la determinación de la expresión del gen TRIP13		
	<400> 103		
	atcaagacat ggtcccattt gcagg		25
60	<210> 104		
	<211> 25		
	<212> DNA		
65	<213> Artificial Sequence		

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 104 para la determinación de la expresión del gen TRIP13

5 <400> 104
gtgcagactc tgagtgttcc aggga 25

<210> 105
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 105 para la determinación de la expresión del gen TRIP13

<400> 105
20 gaaacacatg ctggacatcc cttgt 25

<210> 106
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 106 para la determinación de la expresión del gen TRIP13

<400> 106
35 catcccttgt aaccggtat gggcg 25

<210> 107
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 107 para la determinación de la expresión del gen TRIP13

<400> 107
ctgcattgct gggatgtttc tgccc 25

50 <210> 108
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 108 para la determinación de la expresión del gen TRIP13

60 <400> 108
ctgcccacgg ttttgtttgt gcaat 25

65 <210> 109
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 109 para la determinación de la expresión del gen TRIP13

<400> 109

ataggtcagt tactggctctc tttct 25

10 <210> 110

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 110 para la determinación de la expresión del gen TRIP13

20 <400> 110

ggtctctttc tgccgaatgt tatgt 25

25 <210> 111

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 111 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

35 <400> 111

gaatcctggt gaatatagtg ctgct 25

<210> 112

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 112 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

50 <400> 112

gtgctgctat gttgacatta ttctt 25

<210> 113

55 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> Sonda 113 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

<400> 113

65 gagaagatta tcctgtcctg caaac 25

ES 2 381 729 A1

<210> 114
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 114 para la determinación de la expresión del gen CHEK1
10

<400> 114
aatagtagtt cctgaagtgt tcaact 25

15 <210> 115
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 115 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

25 <400> 115
cacttccctg tttatccaaa catct 25

30 <210> 116
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 116 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

40 <400> 116
tatccaaaca tcttccaatt tattt 25

45 <210> 117
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 117 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

55 <400> 117
tttattttgt ttgttcggca taaaa 25

60 <210> 118
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

65 <220>
<223> Sonda 118 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

ES 2 381 729 A1

<400> 118
tttcttcatg tgtgtttagt atctg 25

5 <210> 119
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Sonda 119 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

15 <400> 119
tttgaaactc atctggtgga aacca 25

<210> 120
20 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Sonda 120 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

<400> 120
30 aaccaagttt caggggacat gagtt 25

<210> 121
<211> 25
35 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
40 <223> Sonda 121 para la determinación de la expresión del gen CHEK1

<400> 121
45 gacatgagtt ttccagcttt tatac 25

<210> 122
<211> 25
<212> DNA
50 <213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Sonda 122 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 122
gaatgaggtc tcttagtaca gttat 25

60 <210> 123
<211> 25
<212> DNA
65 <213> Artificial Sequence

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 123 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

5 <400> 123
ttagtacagt tattttgatg cagat 25

<210> 124
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 124 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 124
20 gcagataatt ccttttagtt tagct 25

<210> 125
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 125 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 125
35 gaaatagttc tccttaatgc aaata 25

<210> 126
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 126 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 126
50 atgcaaatat gttggttctg ctata 25

<210> 127
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
60 <223> Sonda 127 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 127
ttggttctgc tatagttcca tcctg 25

65 <210> 128
<211> 25

ES 2 381 729 A1

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sonda 128 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 128
10 atagttccat cctggtcaaa agtca 25

<210> 129
<211> 25

15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Sonda 129 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 129
25 gaagagtggg gtttcctttt gagca 25

<210> 130
<211> 25

30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Sonda 130 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

<400> 130
tccttttgag caattcttca tcctt 25

40 <210> 131
<211> 25

45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 131 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

50 <400> 131
aattcttcat ccttaagtca gcatg 25

55 <210> 132
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

60 <220>
<223> Sonda 132 para la determinación de la expresión del gen BRCA2

65 <400> 132
agaaccctca gtgtaactct aattc 25

ES 2 381 729 A1

<210> 133
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 133 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1
10

<400> 133
 atatcaatag accacagcca aagcc 25

15 <210> 134
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Sonda 134 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

25 <400> 134
 cttaaatacaa acccacacac aactg 25

<210> 135
30 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 135 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 135
40 ggagctggtt gtccagtta gcatg 25

<210> 136
<211> 25
45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Sonda 136 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 136
55 ttagcatggc taggtctgga actat 25

<210> 137
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 137 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

ES 2 381 729 A1

<400> 137
gctctggttt gagagctggc gctac 25

5 <210> 138
<211> 25
<212> DNA
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sonda 138 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

15 <400> 138
ttttcctata tcccgagtgg ggcac 25

<210> 139
20 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
25 <220>
<223> Sonda 139 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

30 <400> 139
gctctggttt gagagctggc gctac 25

<210> 140
<211> 25
35 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
40 <223> Sonda 140 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 140
45 ctgcccagtg tgggtgtgtct ggctt 25

<210> 141
<211> 25
50 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
55 <223> Sonda 141 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 141
gtgtctggct tggcttttca atatt 25

60 <210> 142
<211> 25
<212> DNA
65 <213> Artificial Sequence

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 142 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

5 <400> 142
tattgtgagg tctgaatgga tctga 25

<210> 143
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 143 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 143
20 aatgattcac agctctggca gttcc 25

<210> 144
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 144 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 144
35 tgaaggctct tcttgacaac accaa 25

<210> 145
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 145 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 145
taagaacacc gtggtcaggg cctac 25

50 <210> 146
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 146 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

60 <400> 146
ggcctacagc gaccaggcaa ttgtc 25

65 <210> 147
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 147 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 147

gcaattgtca acctcctcaa gatgc 25

10 <210> 148

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 148 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

20 <400> 148

aacctcctca agatgctgca gggcg 25

25 <210> 149

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 149 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

35 <400> 149

gcagggtgaa gaggtgtttc agtcc 25

<210> 150

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 150 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 150

50 gatcctggat gtggccagtt tggag 25

<210> 151

<211> 25

55 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

60 <223> Sonda 151 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 151

65 ggtgctgaac gaggttaacc gaagg 25

<210> 152

<211> 25

ES 2 381 729 A1

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sonda 152 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 152
10 cggagcaggt ggacgacacc atcct 25

<210> 153
<211> 25

15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Sonda 153 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 153
25 tacatttggt ccaatgggga gcttg 25

<210> 154
<211> 25

30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Sonda 154 para la determinación de la expresión del gen GCN1L1

<400> 154
40 ggagcttga agatggcggt cccag 25

<210> 155
<211> 25

45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Sonda 155 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2

<400> 155
55 agcaaata gctttcagta ttct 25

<210> 156
<211> 25

60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 156 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2

<400> 156
attcctaatt ttacctaag ctcat 25

ES 2 381 729 A1

<210> 157
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 157 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2
10
<400> 157
 tttttaccta agctcattgc tccag 25

15 <210> 158
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 158 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2
25
<400> 158
 gaaccaactt caagaatgca gcact 25

30 <210> 159
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
35

<220>
<223> Sonda 159 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2
40
<400> 159
 aatgcagcac ttcttaatct ttagc 25

45 <210> 160
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
50

<220>
<223> Sonda 160 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2
55
<400> 160
 cttaatcttt agctctttct tggga 25

60 <210> 161
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
65

<220>
<223> Sonda 161 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2

ES 2 381 729 A1

	<400> 161	
	gctctttctt gggagaagct agact	25
5	<210> 162	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 162 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2	
15	<400> 162	
	gaagctagac tttattcatt atatt	25
	<210> 163	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 163 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2	
30	<400> 163	
	cattatattg ctatgacaac ttcac	25
	<210> 164	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 164 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2	
	<400> 164	
45	aaattgttta catgattgga ccctc	25
	<210> 165	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 165 para la determinación de la expresión del gen SUV39H2	
	<400> 165	
60	atgattggac cctcagattc tgтта	25
	<210> 166	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 166 para la determinación de la expresión del gen TFG

5 <400> 166
acttcctgga agtaccatga cccct 25

<210> 167
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 167 para la determinación de la expresión del gen TFG

20 <400> 167
cctccaagtg ggctaatacc ttatg 25

<210> 168
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Sonda 168 para la determinación de la expresión del gen TFG

35 <400> 168
gtcctccctt tggtcagggc tatac 25

<210> 169
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sonda 169 para la determinación de la expresión del gen TFG

50 <400> 169
atacccaacc tggacctggt tatcg 25

<210> 170
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

60 <220>
<223> Sonda 170 para la determinación de la expresión del gen TFG

<400> 170
taaggaggct cctctacacc aatta 25

65 <210> 171
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence
<220>
5 <223> Sonda 171 para la determinación de la expresión del gen TFG
<400> 171
tgtttagctgc tagctattgg cctcc 25
10 <210> 172
<211> 25
<212> DNA
15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Sonda 172 para la determinación de la expresión del gen TFG
20 <400> 172
tattggcctc ccaaaagact ccagt 25
25 <210> 173
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
30 <220>
<223> Sonda 173 para la determinación de la expresión del gen TFG
35 <400> 173
gtagcagctt cttagttact ttgga 25
<210> 174
40 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
45 <220>
<223> Sonda 174 para la determinación de la expresión del gen TFG
50 <400> 174
tactttggaa cactactctt acatg 25
<210> 175
55 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
60 <220>
<223> Sonda 175 para la determinación de la expresión del gen TFG
<400> 175
65 agcttccctt gtccggagga tatta 25

ES 2 381 729 A1

<210> 176
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 176 para la determinación de la expresión del gen TFG
10

<400> 176
agggtgaggt ttagccatct tactt 25

15 <210> 177
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 177 para la determinación de la expresión del gen C13orf27

25 <400> 177
gcagctgctt ctgtaatgtg tcaca 25

30 <210> 178
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 178 para la determinación de la expresión del gen C13orf27

40 <400> 178
tggtgatgat tttgttcggg gtctc 25

45 <210> 179
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 179 para la determinación de la expresión del gen C13orf27

55 <400> 179
tgttcgggggt ctcatttgta tttct 25

60 <210> 180
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

65 <220>
<223> Sonda 180 para la determinación de la expresión del gen C13orf27

ES 2 381 729 A1

	<400> 180	
	gagatgaaga cctctttcgt ttaaa	25
5	<210> 181	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 181 para la determinación de la expresión del gen C13orf27	
15	<400> 181	
	aaaagagcct gtactgtttg tgtca	25
	<210> 182	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 182 para la determinación de la expresión del gen C13orf27	
30	<400> 182	
	actgtttg tg tcaggctcag cagat	25
	<210> 183	
	<211> 25	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 183 para la determinación de la expresión del gen C13orf27	
45	<400> 183	
	caagctcccc ataaaatcca ctgga	25
	<210> 184	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
55	<220>	
	<223> Sonda 184 para la determinación de la expresión del gen C13orf27	
60	<400> 184	
	gaaggcaa at cattccatgg cagtg	25
	<210> 185	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 185 para la determinación de la expresión del gen C13orf27

5 <400> 185
atggcagtga aaggacggtc gacaa 25

<210> 186
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 186 para la determinación de la expresión del gen C13orf27

20 <400> 186
gaagagtatg cctctcagca ttgtg 25

<210> 187
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 187 para la determinación de la expresión del gen C13orf27

<400> 187
35 gatgttcttt aatgttcct tattt 25

<210> 188
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 188 para la determinación de la expresión del gen SKP2

<400> 188
aaattgatga cttgttcgta tgttc 25

50 <210> 189
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 189 para la determinación de la expresión del gen SKP2

60 <400> 189
aaagctaaca ccagtcattt atatt 25

65 <210> 190
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
5	<223> Sonda 190 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
	<400> 190	
	gaagtgcctt tatctgctta gacct	25
10	<210> 191	
	<211> 25	
	<212> DNA	
15	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 191 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
20	<400> 191	
	gatgatgctt caatttctta atagt	25
25	<210> 192	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
30	<220>	
	<223> Sonda 192 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
35	<400> 192	
	agagctgggg ttaggatccg gttgg	25
	<210> 193	
40	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
45	<220>	
	<223> Sonda 193 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
	<400> 193	
50	taggatccgg ttggactctg acatc	25
	<210> 194	
	<211> 25	
55	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
60	<223> Sonda 194 para la determinación de la expresión del gen SKP2	
	<400> 194	
65	ctctgacatc ggatgccctc aaaca	25

ES 2 381 729 A1

<210> 195
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 195 para la determinación de la expresión del gen SKP2
10
<400> 195
tgccctcaaa catacagaac ttcca 25

15 <210> 196
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 196 para la determinación de la expresión del gen SKP2
25
<400> 196
agaacttcca aactcaagtc cagcc 25

30 <210> 197
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 197 para la determinación de la expresión del gen SKP2
40
<400> 197
aagtccagcc ataagctatt ttgcc 25

45 <210> 198
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 198 para la determinación de la expresión del gen SKP2
55
<400> 198
agctatthttg ccaacatgtc agagt 25

60 <210> 199
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

65 <220>
<223> Sonda 199 para la determinación de la expresión del gen ECT2

ES 2 381 729 A1

	<400> 199	
	tagctgtttc agagagagta cggta	25
5	<210> 200	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 200 para la determinación de la expresión del gen ECT2	
15	<400> 200	
	ggtaatttta tccactagca aatct	25
	<210> 201	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 201 para la determinación de la expresión del gen ECT2	
30	<400> 201	
	agactgtttg tacccttcat gaaat	25
	<210> 202	
	<211> 25	
35	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
40	<223> Sonda 202 para la determinación de la expresión del gen ECT2	
	<400> 202	
45	gaagttgcc a tcagttttac taatc	25
	<210> 203	
	<211> 25	
	<212> DNA	
50	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 203 para la determinación de la expresión del gen ECT2	
	<400> 203	
	cagttttact aatcttctgt gaaat	25
60	<210> 204	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 204 para la determinación de la expresión del gen ECT2

5 <400> 204
gcatagatat gcgcatgttc aactt 25

<210> 205
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 205 para la determinación de la expresión del gen ECT2

20 <400> 205
gcatgttcaa ctttttattg tggtc 25

<210> 206
25 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Sonda 206 para la determinación de la expresión del gen ECT2

35 <400> 206
tcacaatagc ctttttatag tcagt 25

<210> 207
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 207 para la determinación de la expresión del gen ECT2

<400> 207
50 ttcctatttc tttagggagt gctac 25

<210> 208
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 208 para la determinación de la expresión del gen ECT2

60 <400> 208
gtatgtgcca cttctgagag tagta 25

65 <210> 209
<211> 25

ES 2 381 729 A1

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sonda 209 para la determinación de la expresión del gen ECT2

<400> 209

10 gtaaatagact ctttgctaca tttta 25

<210> 210
<211> 25

15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Sonda 210 para la determinación de la expresión del gen MCM10

<400> 210

25 cagccttaaa taaccgaac ttcag 25

<210> 211
<211> 25

30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

35 <223> Sonda 211 para la determinación de la expresión del gen MCM10

<400> 211

40 ggattggctg tgtattgtcc attga 25

<210> 212
<211> 25
<212> DNA

45 <213> Artificial Sequence

<220>

50 <223> Sonda 212 para la determinación de la expresión del gen MCM10

<400> 212

tccattgatt cctgattgac gccgt 25

55 <210> 213
<211> 25
<212> DNA

60 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 213 para la determinación de la expresión del gen MCM10

65

ES 2 381 729 A1

	<400> 213	
	gttaagccca taagctttgc ctgct	25
5	<210> 214	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 214 para la determinación de la expresión del gen MCM10	
15	<400> 214	
	taagctttgc ctgcttactt tctgc	25
	<210> 215	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 215 para la determinación de la expresión del gen MCM10	
30	<400> 215	
	gcttactttc tgccattggg ttggt	25
	<210> 216	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 216 para la determinación de la expresión del gen MCM10	
45	<400> 216	
	aaccaagtta tcattgtctt ttcta	25
	<210> 217	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 217 para la determinación de la expresión del gen MCM10	
60	<400> 217	
	gtcttttcta agctcagtgt ggatg	25
	<210> 218	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

	<220>	
	<223> Sonda 218 para la determinación de la expresión del gen MCM10	
5	<400> 218	
	gtttatacga acaccagag gcaaa	25
	<210> 219	
10	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	<223> Sonda 219 para la determinación de la expresión del gen MCM10	
	<400> 219	
20	attdggctta attctcactc caggt	25
	<210> 220	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
30	<223> Sonda 220 para la determinación de la expresión del gen MCM10	
	<400> 220	
35	agtagcttaa cttctgggct tcagt	25
	<210> 221	
	<211> 25	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
45	<223> Sonda 221 para la determinación de la expresión del gen KIF18B	
	<400> 221	
	tctcatttat gatgccctct gtgca	25
50	<210> 222	
	<211> 25	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 222 para la determinación de la expresión del gen KIF18B	
60	<400> 222	
	ttatgatgcc ctctgtgcag gcaga	25
65	<210> 223	
	<211> 25	

ES 2 381 729 A1

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sonda 223 para la determinación de la expresión del gen KIF18B

<400> 223
10 ggaggaatga ggatgggttg gggag 25

<210> 224
<211> 25

15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Sonda 224 para la determinación de la expresión del gen KIF18B

<400> 224
25 ggctcttcct ggtttctgag aggga 25

<210> 225
<211> 25

30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Sonda 225 para la determinación de la expresión del gen KIF18B

<400> 225
gagagggaca tcttcatccc tactc 25

40 <210> 226
<211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sonda 226 para la determinación de la expresión del gen KIF18B

50 <400> 226
attgtacata ggatacacgt tcagt 25

<210> 227
55 <211> 25

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

60 <220>
<223> Sonda 227 para la determinación de la expresión del gen KIF18B

65 <400> 227
gggaattcag gcttaatgct gcacc 25

ES 2 381 729 A1

<210> 228
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 228 para la determinación de la expresión del gen KIF18B
10
<400> 228
ggcttaatgc tgcacctaga tataa 25

15 <210> 229
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20
<220>
<223> Sonda 229 para la determinación de la expresión del gen KIF18B
25
<400> 229
gatacttggg tttatagcct tctga 25

30 <210> 230
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
35
<220>
<223> Sonda 230 para la determinación de la expresión del gen KIF18B
40
<400> 230
acttggggtt atagccttct gatcc 25

45 <210> 231
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
50
<220>
<223> Sonda 231 para la determinación de la expresión del gen KIF18B
55
<400> 231
cttctgatcc tttatttctg catat 25

<210> 232
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
65
<220>
<223> Sonda 232 para la determinación de la expresión del gen GMPS

ES 2 381 729 A1

<400> 232
aacaggggtg ctcagtactt tacgc 25

5 <210> 233
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
10 <220>
<223> Sonda 233 para la determinación de la expresión del gen GMPS

15 <400> 233
ttacgccaaag ctgattttga ggccc 25

<210> 234
20 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
25 <220>
<223> Sonda 234 para la determinación de la expresión del gen GMPS

30 <400> 234
ggcccataac attctcaggg agtct 25

<210> 235
35 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
40 <220>
<223> Sonda 235 para la determinación de la expresión del gen GMPS

<400> 235
45 attacatfff gatcgggacc cactt 25

<210> 236
<211> 25
50 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
55 <223> Sonda 236 para la determinación de la expresión del gen GMPS

<400> 236
60 acccacttca aaagcagcct tcatg 25

<210> 237
<211> 25
<212> DNA
65 <213> Artificial Sequence

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 237 para la determinación de la expresión del gen GMPS

5 <400> 237
gcagccttca tgccagagat ctgtg 25

<210> 238
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 238 para la determinación de la expresión del gen GMPS

<400> 238
20 gtgacttcat gactggtata cctgc 25

<210> 239
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 239 para la determinación de la expresión del gen GMPS

<400> 239
35 gtatacctgc aacacctggc aatga 25

<210> 240
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 240 para la determinación de la expresión del gen GMPS

<400> 240
50 cacctggcaa tgagatccct gtaga 25

<210> 241
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 241 para la determinación de la expresión del gen GMPS

60 <400> 241
aaagcccccga ggaactactg agtgg 25

65 <210> 242
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 242 para la determinación de la expresión del gen GMPS

<400> 242

 ttgtttgcat attcatctct tcgcc 25

10 <210> 243

 <211> 25

 <212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 243 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

20 <400> 243

 acctcaccgc agaggtactt gaact 25

25 <210> 244

 <211> 25

 <212> DNA

30 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 244 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

35 <400> 244

 gaggtacttg aactggcagg aaatg 25

40 <210> 245

 <211> 25

 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 245 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

50 <400> 245

 gaactggcag gaaatgcatc aaaag 25

 <210> 246

55 <211> 25

 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> Sonda 246 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

<400> 246

65 agaattggat tctctcatca aggct 25

ES 2 381 729 A1

<210> 247
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 247 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ
10

<400> 247
ggattctctc atcaaggcta caatt 25

15 <210> 248
<211> 25
<212> DNA
20 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 248 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ
25

<400> 248
ctctcatcaa ggctacaatt gctgg 25

30 <210> 249
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 249 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ
40

<400> 249
tcaaggctac aattgctgg ggtgg 25

<210> 250
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 250 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ
55

<400> 250
agtgttggtg attccagtgg actgt 25

<210> 251
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 251 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

ES 2 381 729 A1

	<400> 251	
	gtgattccag tggactgtat ctctg	25
5	<210> 252	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 252 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ	
15	<400> 252	
	acatttggtt ttgttcagac cttat	25
	<210> 253	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 253 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ	
30	<400> 253	
	gttttggtca gaccttattt ccaact	25
	<210> 254	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 254 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ	
	<400> 254	
45	cgtcacttgc aacttgctat tcgtg	25
	<210> 255	
	<211> 25	
	<212> DNA	
50	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 255 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ	
	<400> 255	
	tgcaacttgc tattcgtgga gatga	25
60	<210> 256	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 256 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

5 <400> 256
aggatgcctg gattccttgt tatct 25

<210> 257
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 257 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

<400> 257
20 ttccttgta tctcaggact ctaaa 25

<210> 258
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 258 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

<400> 258
35 aaatactcta acagctgtcc agtgt 25

<210> 259
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 259 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

<400> 259
tgcctttttg taattctatt tgagc 25

50 <210> 260
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

55 <220>
<223> Sonda 260 para la determinación de la expresión H2AFZ

60 <400> 260
ccaaccaacc aaatttctgc attcg 25

<210> 261
65 <211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 261 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

<400> 261

10 tctgcattcg agtcttaacc atatt 25

<210> 262

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Sonda 262 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

<400> 262

25 atttaagtgt tactgtggct tcaaa 25

<210> 263

<211> 25

<212> DNA

30 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 263 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

35 <400> 263

40 gggttttgat tgagttgact gtttt 25

<210> 264

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 264 para la determinación de la expresión del gen H2AFZ

50 <400> 264

55 ccactctggt ggataagttc aataa 25

<210> 265

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> Sonda 265 para la determinación de la expresión del gen GSPA14

<400> 265

65 tccctcctga tgaagtgatc cctat 25

ES 2 381 729 A1

<210> 266
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 266 para la determinación de la expresión del gen HSPA14
10

<400> 266
aagtgatccc tattggtgca gctat 25

15 <210> 267
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 267 para la determinación de la expresión del gen HSPA14

25 <400> 267
aaacctgttg gtggaagact ctctt 25

<210> 268
30 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 268 para la determinación de la expresión del gen HSPA14

40 <400> 268
gggtgtggac gaatcaggag ccagt 25

<210> 269
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 269 para la determinación de la expresión del gen HSPA14

<400> 269
55 acagtgctgt ttccatcagg gactc 25

<210> 270
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 270 para la determinación de la expresión del gen HSPA14

ES 2 381 729 A1

	<400> 270	
	gccagctcga agacaacaca cattg	25
5	<210> 271	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 271 para la determinación de la expresión del gen HSPA14	
15	<400> 271	
	cacattgcaa gcccctggaa gcata	25
	<210> 272	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 272 para la determinación de la expresión del gen HSPA14	
30	<400> 272	
	aagcatatct tcagtgtgcc ttgaa	25
	<210> 273	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 273 para la determinación de la expresión del gen HSPA14	
45	<400> 273	
	agtgtgcctt gaactctatg agtct	25
	<210> 274	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 274 para la determinación de la expresión del gen HSPA14	
60	<400> 274	
	caagtttgca caggttgtac tccag	25
	<210> 275	
	<211> 25	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

	<220>	
	<223> Sonda 275 para la determinación de la expresión del gen HSPA14	
5	<400> 275	
	acgtgatata ttagctgttc ttact	25
	<210> 276	
10	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
15	<220>	
	<223> Sonda 276 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1	
	<400> 276	
20	aaatgatact tactgaactg tgtgt	25
	<210> 277	
	<211> 25	
25	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
30	<223> Sonda 277 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1	
	<400> 277	
35	gtacctatatt gacttaccat ggagt	25
	<210> 278	
	<211> 25	
40	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
45	<223> Sonda 278 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1	
	<400> 278	
	ggaggttttt ttgtcaacat tgtga	25
50	<210> 279	
	<211> 25	
	<212> DNA	
55	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 279 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1	
60	<400> 279	
	aagctagatg ctttcctaaa tcaga	25
65	<210> 280	
	<211> 25	
	<212> DNA	

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 280 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1

<400> 280

10 cagaatcttt gttaaggtcc tgaaa 25

<210> 281

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

20 <223> Sonda 281 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1

<400> 281

25 aggtcctgaa agtaactcat aatct 25

<210> 282

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 282 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1

35 <400> 282

attgctgtat agtcctttt gacct 25

<210> 283

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 283 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1

50 <400> 283

ctccttttga ccttcatttc atgta 25

<210> 284

55 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> Sonda 284 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1

<400> 284

65 atttcatgta tagttttccc tattg 25

ES 2 381 729 A1

<210> 285
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 285 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1
10

<400> 285
gttttcccta ttgaatcagt ttcca 25

15 <210> 286
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 286 para la determinación de la expresión del gen MAD2L1

25 <400> 286
atgtgtactg tttaatgttc tgtga 25

30 <210> 287
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
35

<220>
<223> Sonda 287 para la determinación de la expresión del gen BRCA1

40 <400> 287
ttcaagaacc ggtttccaaa gacag 25

45 <210> 288
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
50

<220>
<223> Sonda 288 para la determinación de la expresión del gen BRCA1

<400> 288
55 atgtttattg ttgtagctct ggtat 25

<210> 289
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
65

<220>
<223> Sonda 289 para la determinación de la expresión del gen BRCA1

ES 2 381 729 A1

	<400> 289	
	gctctggtat ataatccatt cctct	25
5	<210> 290	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 290 para la determinación de la expresión del gen BRCA1	
15	<400> 290	
	taagacctct ggcatgaata tttca	25
20	<210> 291	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 291 para la determinación de la expresión del gen BRCA1	
30	<400> 291	
	tgacagatcc caccaggaag gaagc	25
	<210> 292	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 292 para la determinación de la expresión del gen BRCA1	
	<400> 292	
45	tgctccctgt tgctgaaacc ataca	25
	<210> 293	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 293 para la determinación de la expresión del gen BRCA1	
	<400> 293	
60	aaaccataca gcttcataaa taatt	25
	<210> 294	
	<211> 25	
65	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 294 para la determinación de la expresión del gen BRCA1

5 <400> 294
cataaaccca ttatccagga ctggtt 25

<210> 295
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 295 para la determinación de la expresión del gen BRCA1

<400> 295
20 aggactgttt atagctgttg gaagg 25

<210> 296
25 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Sonda 296 para la determinación de la expresión del gen BRCA1

<400> 296
35 tggaaggact aggtcttccc tagcc 25

<210> 297
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 297 para la determinación de la expresión del gen BRCA1

<400> 297
50 agggcagtga agacttgatt gtaca 25

<210> 298
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
60 <223> Sonda 298 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

<400> 298
agaggtccga gtgacagcca gtgag 25

65 <210> 299
<211> 25

ES 2 381 729 A1

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sonda 299 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

<400> 299

10 ggttttaact acagaccag tctct 25

<210> 300
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> Sonda 300 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

<400> 300

25 cagtctctgc caatattgctc cttgt 25

<210> 301
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 301 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

<400> 301

40 tgtccttgatg aacttccttg aagat 25

<210> 302
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sonda 302 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

<400> 302

50 gatgcatttg ttcacgtctg gagac 25

55 <210> 303
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

60 <220>
<223> Sonda 303 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

65 <400> 303

gatgcatttg ttcacgtctg gagac 25

ES 2 381 729 A1

<210> 304
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 304 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6
10

<400> 304
ggagactgca aagcatacag cccag 25

15 <210> 305
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 305 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

25 <400> 305
tgtggctggg gtcctgacta tagac 25

<210> 306
30 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 306 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

<400> 306
40 atagaccac catatggtcc agcaa 25

<210> 307
<211> 25
45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Sonda 307 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

<400> 307
55 tattctgtcg cgtgttcagg atcct 25

<210> 308
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 308 para la determinación de la expresión del gen GEMIN6

ES 2 381 729 A1

	<400> 308	
	gaaggacatc ttacagcttc ccaat	25
5	<210> 309	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 309 para la determinación de la expresión del gen CDCA8	
15	<400> 309	
	tgggacttag ggatctttca cctgc	25
	<210> 310	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 310 para la determinación de la expresión del gen CDCA8	
30	<400> 310	
	cctgctgtgc ccagtagttc tgaag	25
	<210> 311	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 311 para la determinación de la expresión del gen CDCA8	
45	<400> 311	
	gtttatcoct gtttactgaa gacca	25
	<210> 312	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 312 para la determinación de la expresión del gen CDCA8	
60	<400> 312	
	gagacaactt ccatgtcttg ctctt	25
	<210> 313	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 313 para la determinación de la expresión del gen CDCA8

5 <400> 313
tcttctacct ccctagttag tggaa 25

<210> 314
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 314 para la determinación de la expresión del gen CDCA8

<400> 314
20 agggaactgt agggcccaga ttctg 25

<210> 315
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 315 para la determinación de la expresión del gen CDCA8

<400> 315
35 aactgtctct aagctatcca tggtc 25

<210> 316
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 316 para la determinación de la expresión del gen CDCA8

<400> 316
agcagtgagg tcctcattct ccagc 25

50 <210> 317
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 317 para la determinación de la expresión del gen CDCA8

60 <400> 317
ctgccctgga gaatcatgtg ctatg 25

65 <210> 318
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 318 para la determinación de la expresión del gen CDCA8

<400> 318

 ttgagaacta gagtcctcat cccca 25

10 <210> 319

 <211> 25

 <212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 319 para la determinación de la expresión del gen CDCA8

20 <400> 319

 ttctcatgta gggctctctg tggta 25

25 <210> 320

 <211> 25

 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 320 para la determinación de la expresión del gen CEP55

35 <400> 320

 aaggatctta actgtgttcg cattt 25

40 <210> 321

 <211> 25

 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 321 para la determinación de la expresión del gen CEP55

50 <400> 321

 gttcgcattt tttatccaag cactt 25

55 <210> 322

 <211> 25

 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence

60 <220>

<223> Sonda 322 para la determinación de la expresión del gen CEP55

65 <400> 322

 aatcctaatt ttgatgtcca ttggtt 25

ES 2 381 729 A1

<210> 323
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 323 para la determinación de la expresión del gen CEP55
10
<400> 323
gttggggatt ttcttgatct ttatt 25

15 <210> 324
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20
<220>
<223> Sonda 324 para la determinación de la expresión del gen CEP55

25 <400> 324
tattgctgct taccattgaa actta 25

30 <210> 325
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
35
<220>
<223> Sonda 325 para la determinación de la expresión del gen CEP55

40 <400> 325
tgaaacttaa cccagctgtg ttccc 25

<210> 326
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 326 para la determinación de la expresión del gen CEP55

55 <400> 326
aactctgttc tgcgcacgaa acagt 25

<210> 327
60 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

65 <220>
<223> Sonda 327 para la determinación de la expresión del gen CEP55

ES 2 381 729 A1

	<400> 327	
	ttaagtggcc acacacaatg ttttc	25
5	<210> 328	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 328 para la determinación de la expresión del gen CEP55	
15	<400> 328	
	gttttctctt atggtatctg gcagt	25
	<210> 329	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 329 para la determinación de la expresión del gen CEP55	
30	<400> 329	
	gccctctcat ttgattgaca gtatt	25
	<210> 330	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 330 para la determinación de la expresión del gen CEP55	
	<400> 330	
45	aggttttcta acatgcttac cactg	25
	<210> 331	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 331 para la determinación de la expresión del gen CKS2	
	<400> 331	
	cgctctcgtt tcattttctg cagcg	25
60	<210> 332	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 332 para la determinación de la expresión del gen CKS2

5 <400> 332
cgacgaacac tacgagtacc ggcac 25

<210> 333
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 333 para la determinación de la expresión del gen CKS2

<400> 333
20 ttatggtacc cagagaactt tccaa 25

<210> 334
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 334 para la determinación de la expresión del gen CKS2

<400> 334
35 acttggtgtc caacagagtc taggc 25

<210> 335
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 335 para la determinación de la expresión del gen CKS2

<400> 335
tattcttctc tttagacgac ctctt 25

50 <210> 336
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 336 para la determinación de la expresión del gen CKS2

60 <400> 336
tctctttaga cgacctcttc caaaa 25

65 <210> 337
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 337 para la determinación de la expresión del gen CKS2

<400> 337

10 acaaatcttt catccatacc tgtgc 25

<210> 338

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 338 para la determinación de la expresión del gen CKS2

20 <400> 338

gtgcatgagc tgtattcttc acagc 25

<210> 339

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 339 para la determinación de la expresión del gen CKS2

35 <400> 339

gcaacagagc tcagttaaat gcaac 25

<210> 340

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 340 para la determinación de la expresión del gen CKS2

<400> 340

50 gataaaagtt cttccagtca gtttt 25

<210> 341

<211> 25

55 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

60 <223> Sonda 341 para la determinación de la expresión del gen CKS2

<400> 341

65 cagtcagttt ttctottaag tgcct 25

ES 2 381 729 A1

<210> 342
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 342 para la determinación de la expresión del gen CCNA2
10

<400> 342
tacccaatac tttctgcatc agcag 25

15 <210> 343
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 343 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

25 <400> 343
tctgcatcag cagcctgcaa actgc 25

<210> 344
30 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 344 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

40 <400> 344
tgatagatgc tgaccatac ctcaa 25

<210> 345
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 345 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

55 <400> 345
ccatcagtta ttgctggagc tgcct 25

<210> 346
<211> 25
60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 346 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

ES 2 381 729 A1

<400> 346
tggagctgcc tttcatttag cactc 25

5 <210> 347
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> Sonda 347 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

15 <400> 347
ttagcactc tacacagtca cggga 25

<210> 348
20 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

25 <220>
<223> Sonda 348 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

<400> 348
30 gtcacgggac aaagctggcc tgaat 25

<210> 349
35 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> Sonda 349 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

<400> 349
45 ggaaagtctt aagccttgct tcatg 25

<210> 350
<211> 25
50 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
55 <223> Sonda 350 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

<400> 350
60 tacctcaaag caccacagca tgcac 25

<210> 351
<211> 25
65 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 351 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

5 <400> 351
aaagtatcat ggtgtttctc tcctc 25

<210> 352
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 352 para la determinación de la expresión del gen CCNA2

<400> 352
20 aaagactgcc tttgttttct aagat 25

<210> 353
25 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Sonda 353 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 353
35 gaaagcgaaa gctttacctc ctgca 25

<210> 354
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 354 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 354
50 gtcagcacat gtagtaggac accag 25

<210> 355
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
60 <223> Sonda 355 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 355
acagagagcc ataagtagcc ctttg 25

65 <210> 356
<211> 25

ES 2 381 729 A1

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Sonda 356 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 356
10 gtagcccttt ggaggactga tggtg 25

<210> 357
<211> 25

15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
20 <223> Sonda 357 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 357
25 gtgattgatt aatgattccc cctta 25

<210> 358
<211> 25

30 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
35 <223> Sonda 358 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 358
40 gattccccct tagaaagcaa gtgtt 25

<210> 359
<211> 25

45 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
50 <223> Sonda 359 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 359
55 gaaagacaga agcttcgtcc agcca 25

<210> 360
<211> 25

60 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
65 <223> Sonda 360 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

<400> 360
ctcttcagca cattccttta ctaag 25

ES 2 381 729 A1

<210> 361
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 361 para la determinación de la expresión del gen TRIM2
10
<400> 361
taagcagttt aaagccgtcc tagtg 25

15 <210> 362
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20
<220>
<223> Sonda 362 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

25 <400> 362
tcctagtgga gcaagcccta aagca 25

30 <210> 363
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
35
<220>
<223> Sonda 363 para la determinación de la expresión del gen TRIM2

40 <400> 363
gacggtggtg gcttttagtc agaaa 25

<210> 364
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 364 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

55 <400> 364
ggcatcagta tgtcactctg gtccc 25

<210> 365
60 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

65 <220>
<223> Sonda 365 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

ES 2 381 729 A1

	<400> 365	
	atgtcactct ggtcccttta aagag	25
5	<210> 366	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
10	<220>	
	<223> Sonda 366 para la determinación de la expresión del gen PEBP1	
15	<400> 366	
	gtcactctgg tccctttaa gagca	25
	<210> 367	
20	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 367 para la determinación de la expresión del gen PEBP1	
30	<400> 367	
	ctgggccctt taaagagcaa tcctg	25
	<210> 368	
35	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 368 para la determinación de la expresión del gen PEBP1	
	<400> 368	
45	gtccctttaa agagcaatcc tggaa	25
	<210> 369	
	<211> 25	
50	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
55	<223> Sonda 369 para la determinación de la expresión del gen PEBP1	
	<400> 369	
	tgctggtggtt gggacatggc aatct	25
60	<210> 370	
	<211> 25	
	<212> DNA	
65	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 370 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

5 <400> 370
gttgggacat ggcaatctag accgg 25

<210> 371
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 371 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

20 <400> 371
ctgacagctt ggaggaaac ctgag 25

<210> 372
25 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> Sonda 372 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

35 <400> 372
ggaaacctga gatctgtggt tttta 25

<210> 373
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

45 <220>
<223> Sonda 373 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

50 <400> 373
gttttttaaa ttgatcgttc ttcac 25

<210> 374
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

60 <220>
<223> Sonda 374 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

<400> 374
taaattgatc gttcttcatg ggggt 25

65 <210> 375
<211> 25

ES 2 381 729 A1

<210> 380
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 380 para la determinación de la expresión del gen PEBP1
10

<400> 380
gtgatgtcac tcacctagac aacca 25

15 <210> 381
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 381 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

25 <400> 381
ctcacctaga caaccagagg ctggc 25

30 <210> 382
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 382 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

40 <400> 382
ccagaggctg gcattgaggc taacc 25

<210> 383
45 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Sonda 383 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

55 <400> 383
ggcattgagg ctaacctcca acaca 25

<210> 384
60 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

65 <220>
<223> Sonda 384 para la determinación de la expresión del gen PEBP1

ES 2 381 729 A1

	<400> 384	
	taacctccaa cacagtgcac ctcag	25
5	<210> 385	
	<211> 25	
	<212> DNA	
10	<213> Artificial Sequence	
	<220>	
	<223> Sonda 385 para la determinación de la expresión del gen PEBP1	
15	<400> 385	
	tgcatctcag atgcctcagt aggca	25
20	<210> 386	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
25	<220>	
	<223> Sonda 386 para la determinación de la expresión del gen PRDX2	
30	<400> 386	
	acacaattag gctggctaac ggata	25
35	<210> 387	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
40	<220>	
	<223> Sonda 387 para la determinación de la expresión del gen PRDX2	
45	<400> 387	
	ttaggctggc taacggatag tgagc	25
50	<210> 388	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	
55	<220>	
	<223> Sonda 388 para la determinación de la expresión del gen PRDX2	
60	<400> 388	
	gctggctaac ggatagtgag cttgt	25
65	<210> 389	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial Sequence	

ES 2 381 729 A1

<220>
<223> Sonda 389 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

5 <400> 389
 ctggctaacg gatagtgagc ttgtg 25

<210> 390
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

15 <220>
<223> Sonda 390 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

<400> 390
20 gctaacggat agtgagcttg tgccc 25

<210> 391
<211> 25
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
30 <223> Sonda 391 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

<400> 391
35 taacggatag tgagcttgtg ccct 25

<210> 392
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
45 <223> Sonda 392 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

<400> 392
 tccaaactcc acagtatggg accct 25

50 <210> 393
<211> 25
<212> DNA
55 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 393 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

60 <400> 393
 ccaaactcca cagtatggga ccctg 25

65 <210> 394
<211> 25
<212> DNA

ES 2 381 729 A1

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Sonda 394 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

<400> 394

caactccac agtatgggac cctgg 25

10 <210> 395

<211> 25

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sonda 395 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

20 <400> 395

aactccacag tatgggaccc tggag 25

25 <210> 396

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30 <220>

<223> Sonda 396 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

35 <400> 396

ccagccgcac acaggcctag aggta 25

<210> 397

40 <211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

45 <220>

<223> Sonda 397 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

<400> 397

50 cgcacacagg cctagaggta accaa 25

<210> 398

<211> 25

55 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

60 <223> Sonda 398 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

<400> 398

65 gcacacaggc ctagaggtaa ccaat 25

ES 2 381 729 A1

<210> 399
<211> 25
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Sonda 399 para la determinación de la expresión del gen PRDX2
10

<400> 399
cacaggccta gaggtaacca ataaa 25

15 <210> 400
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20

<220>
<223> Sonda 400 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

25 <400> 400
acaggcctag aggtaaccaa taaag 25

30 <210> 401
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

35 <220>
<223> Sonda 401 para la determinación de la expresión del gen PRDX2

40 <400> 401
caggcctaga ggtaaccaat aaagt 25

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031626

②② Fecha de presentación de la solicitud: 05.11.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)
C12Q1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2009103781 A1 (PANGAEA BIOTECH, S.A. [ES/ES]) 27.08.2009, página 3, línea 12 – página 5, línea 14; reivindicaciones 1-6.	1-20
A	WO 2010007791 A1 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. [JP/JP]) 21.01.2010, página 3, párrafo 0007 – página 4, párrafo 0011; reivindicaciones 1-10.	1-20
A	BEER DG et al. Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma. Nature Medicine. 2002. Vol. 8(8), páginas 816-824, todo el documento.	1-20
A	POTTI A et al. A Genomic Strategy to Refine Prognosis in Early-Stage Non-Small-Cell Lung Cancer. The New England Journal of Medicine. 2006. Vol. 355(6), páginas 570-580, todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
15.11.2011

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

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

G01N, C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 15.11.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-20	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2009103781 A1	27.08.2009
D02	WO 2010007791 A1	21.01.2010
D03	BEER et al. Nature Medicine. 2002. Vol. 8(8), páginas 816-824.	2002
D04	POTTI et al. The New England Journal of Medicine. 2006. Vol. 355(6), páginas 570-580.	2006

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

La presente solicitud divulga un método *in vitro* para determinar el pronóstico clínico de un paciente diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón. Para ello, se ha seleccionado una firma de genes capaces de hibridar con unas sondas específicas y cuya expresión está correlacionada con la predicción de supervivencia de un sujeto que padece adenocarcinoma de pulmón. Un aumento de la expresión de los genes CTSL2, FUBP1, CKS1B, CDC6, ERO1L, TMEM48, SKP2, TRIP13, CHEK1, BRCA2, GCN1L1, SUV39H2, TFG, C13ORF27, ECT2, MCM10, KIF18B, GMPS, H2AFZ, HSPA14, MAD2L1, BRCA1, GEMIN6, CDCA8, CEP55, CKS2, CCNA2 junto con una disminución de la expresión de los genes TRIM2, PEBP1, PRDX2, respecto a una muestra control es indicativo de un peor pronóstico (reivindicaciones 1-12). Se refiere también a un kit para identificación de los genes indicados y a su uso para pronóstico de un paciente diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón (reivindicaciones 13-20).

El documento D01 divulga un método *in vitro* para determinar el pronóstico clínico de un paciente diagnosticado de cáncer de pulmón de células no pequeñas, basado en el nivel de expresión de los genes BRCA1 y XPG, donde un aumento de la expresión del gen BRCA1 y una disminución de la expresión del gen XPG está relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (ver página 3, línea 12 - página 5, línea 14; reivindicaciones 1-6).

El documento D02 divulga un método *in vitro* para detección y pronóstico de cáncer de pulmón o esófago en un paciente, basado en el nivel de expresión del gen ECT2, donde un aumento de la expresión de este gen está relacionado con un peor pronóstico de la enfermedad (ver página 3, párrafo 0007 - página 4, párrafo 0011; reivindicaciones 1-10).

El documento D03 divulga el uso de un perfil de expresión genético para pronóstico clínico de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, identificando en muestras de tejidos tumorales, con ayuda de un análisis tipo Cox, los genes relacionados con un mejor o peor pronóstico de la enfermedad (ver todo el documento).

El documento D04 divulga el uso de un perfil de expresión genético para mejorar la estimación del pronóstico clínico de pacientes con adenocarcinoma de pulmón, particularmente para predecir el riesgo de recurrencia y poder seleccionar una apropiada quimioterapia adyuvante (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1-20**

El objeto técnico de la invención de la presente solicitud es un método *in vitro* para determinar el pronóstico clínico de un paciente diagnosticado de adenocarcinoma de pulmón. El aumento de la expresión de los genes CTSL2, FUBP1, CKS1B, CDC6, ERO1L, TMEM48, SKP2, TRIP13, CHEK1, BRCA2, GCN1L1, SUV39H2, TFG, C13ORF27, ECT2, MCM10, KIF18B, GMPS, H2AFZ, HSPA14, MAD2L1, BRCA1, GEMIN6, CDCA8, CEP55, CKS2, CCNA2 junto con una disminución de la expresión de los genes TRIM2, PEBP1, PRDX2, respecto a una muestra control es indicativo de un peor pronóstico.

En el estado de la técnica se encuentran documentos de patente y de literatura no patente que anticipan el uso de perfiles genéticos para diagnóstico y/o pronóstico de adenocarcinoma de pulmón. De hecho, los documentos D01-D04 anticipan métodos *in vitro* para determinar el pronóstico clínico de pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón basados en el perfil de expresión de ciertos genes, entre los que se encuentran algunos de los incluidos en la firma de genes de la presente invención. Sin embargo, en los documentos citados no se hace referencia a la expresión del conjunto de genes reivindicado en la presente solicitud.

En consecuencia, la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-20, cumple con los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)