

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 228**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.04.2010** **PCT/US2010/031528**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.10.2010** **WO10121231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.04.2010** **E 10715067 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016** **EP 2419531**

54 Título: **Métodos para evaluar la capacidad de respuesta de un linfoma de células B al tratamiento con anticuerpos anti-CD40**

30 Prioridad:

18.04.2009 US 170615 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.03.2017

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

DORNAN, DAVID y

BURINGTON, BART

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 605 228 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para evaluar la capacidad de respuesta de un linfoma de células B al tratamiento con anticuerpos anti-CD40

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a los campos de la predicción, la evaluación y la ayuda a la evaluación de la sensibilidad de un paciente con linfoma de células B al tratamiento con anticuerpos anti-CD40, y a métodos para tratar a individuos identificados como candidatos para el tratamiento con anticuerpo anti-CD40.

10 Antecedentes

CD40 es una proteína transmembrana de tipo I de la superfamilia del receptor de necrosis tumoral. CD40 es una molécula importante implicada en la proliferación y diferenciación de células B, en el cambio de isotipo de inmunoglobulinas, y en la viabilidad celular. La señalización del receptor se inicia por la unión de CD40 al ligando de CD40 (CD40L o CD 154), que se expresa principalmente en células T CD4⁺ activadas.

En las células normales, CD40 se expresa en células con un elevado potencial proliferativo, incluyendo progenitores hematopoyéticos, células epiteliales y endoteliales, y todas las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, linfocitos B activados, y monocitos activados). CD40 está altamente expresado en varios tipos de neoplasias hematológicas de células B, incluyendo mieloma múltiple, linfoma no de Hodgkin (NHL), y leucemia linfocítica crónica (CLL). La alta prevalencia de la expresión de CD40 en las neoplasias de células B hace que sea una diana tumoral potencial atractiva para la terapia para el cáncer basada en anticuerpos. CD40 se expresa también en una mayoría de cánceres de vejiga y en un porcentaje significativo de otros tumores sólidos, incluyendo cánceres de cabeza y cuello, carcinomas de células renales, y cáncer de pulmón y de ovario.

Se han descrito anticuerpos anti-CD40 y sus usos para tratar neoplasias hematológicas de células B. Véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos 6.946.129; 6.843.989; 6.838.261; WO 2000/075348; US-2002-0197256; WO 2006/128103; y WO 2007/075326. Se ha demostrado que un anticuerpo humanizado anti-CD40 induce la inhibición del crecimiento y la apoptosis de células positivas a CD40 en un subconjunto de líneas celulares tumorales hematológicas mediante transducción directa de señales. Documentos WO 2006/128103; WO 2007/075326. Además, el anticuerpo humanizado anti-CD40 elimina a las células tumorales mediante funciones efectoras inmunitarias, incluyendo citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) y fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP). *In vivo*, usando modelos de xenoinjerto de mieloma múltiple (MM) y de linfoma no de Hodgkin (NHL), el anticuerpo anti-CD40 suprime el crecimiento tumoral y mejorala supervivencia en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). La comparación del anticuerpo anti-CD40 con rituximab (Genentech, Inc.) en varios modelos reveló que la actividad antitumoral del anticuerpo anti-CD40 era al menos tan eficaz como rituximab. Se iniciaron ensayos clínicos para probar el anticuerpo humanizado anti-CD40 en pacientes con mieloma múltiple (MM) recidivante y refractario, linfoma no de Hodgkin (NHL) recidivante, linfoma linfocítico crónico (CLL), o en el linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) recidivante.

Aunque se ha demostrado que los anticuerpos anti-CD40 pueden inducir inhibición del crecimiento y apoptosis de las células positivas a CD40 y que puede tener actividad antitumoral en diversos tipos de pacientes con linfoma de células B, no todas las células de linfoma de células B son sensibles a la muerte celular mediada por anticuerpo anti-CD40. Sigue habiendo la necesidad de identificar uno o más marcadores predictivos para la sensibilidad de los pacientes con linfoma de células B a una terapia con anticuerpo anti-CD40.

El documento WO2009/062125, que se presentó antes pero se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud, divulga métodos y kits útiles para predecir o evaluar la sensibilidad del linfoma de células B al tratamiento con anticuerpos anti-CD40.

Sumario de la invención

La invención proporciona métodos para predecir la sensibilidad de un sujeto que tiene un tipo de linfoma de células B al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 y composiciones para su uso tal como se define en las reivindicaciones.

Se divulgan métodos para evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad de un sujeto que tiene un linfoma de células B al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40, que comprende comparar un nivel de expresión medido de al menos un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B en una muestra de linfoma de células B del sujeto con un nivel de referencia.

Se divulgan métodos para predecir la sensibilidad o para controlar el tratamiento/sensibilidad a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40 en un sujeto que tiene un linfoma de células B, que comprende comparar un nivel de expresión medido de al menos un gen marcador seleccionado del grupo que consiste en UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B en una muestra de linfoma de células B

del sujeto con un nivel de referencia.

Se divulgan métodos para predecir, evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad de un sujeto que tiene linfoma de células B a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40, que comprende las etapas de: (a) medir el nivel de expresión de uno o más genes marcadores en una muestra que comprende células de linfoma de células B obtenida de dicho sujeto, en el que dichos uno o más genes marcadores se seleccionan del grupo que consiste en IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1, PUS7, y BCL6; y (b) predecir si el sujeto tiene probabilidades de responder al tratamiento con anticuerpos anti-CD40 basándose en el nivel de expresión medido de dichos uno o más genes marcadores de la etapa (a). En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de al menos dos, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece, al menos catorce o de quince genes marcadores del grupo y se usan para la predicción, evaluación, o ayuda a la evaluación. En algunas realizaciones, la predicción, evaluación, o ayuda a la evaluación se determina comparando el nivel de expresión medido de uno o más genes marcadores con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es un valor o un intervalo determinado basándose en el nivel de expresión medido del gen marcador correspondiente en muestras que comprenden células de linfoma de células B de sujetos que tienen un volumen tumoral aumentado o reducido después del tratamiento con anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, las muestras de sujetos para la determinación del nivel de referencia comprenden el mismo tipo de células de linfoma de células B que la muestra del sujeto cuya sensibilidad al tratamiento con anticuerpo anti-CD40 se está prediciendo. En algunas realizaciones, se predice o evalúa la sensibilidad usando el valor de índice de sensibilidad determinado basándose en el nivel de expresión medido de uno o más de los genes marcadores. De acuerdo con la invención, se predice o evalúa la sensibilidad clasificando al sujeto usando un análisis de K-vecinos más próximos descrito en el presente documento.

Se divulgan métodos para preparar un perfil genómico personalizado para un sujeto que tiene linfoma de células B que comprende las etapas de: (a) determinar el nivel de expresión de uno o más genes marcadores seleccionados entre el grupo que consiste en IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1, PUS7, y BCL6 en una muestra que comprende células de linfoma de células B obtenidas del sujeto; y (b) generar un informe que resume el nivel de expresión de uno o más genes marcadores obtenido en la etapa (a). En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de al menos dos, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece, al menos catorce o de quince genes marcadores del grupo y se usan para generar el informe para el perfil genómico personalizado. En algunas realizaciones, el informe incluye una recomendación de tratamiento con anticuerpo anti-CD40 para el sujeto. En algunas realizaciones, la recomendación se determina comparando el nivel de expresión medido de los genes marcadores con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, un nivel de referencia es un valor o un intervalo determinado basándose en el nivel de expresión medido del gen marcador correspondiente en muestras que comprenden células de linfoma de células B de sujetos que tienen un volumen tumoral aumentado o reducido después del tratamiento con anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, la recomendación se determina según el valor del índice de sensibilidad basándose en el nivel de expresión medido de los genes marcadores. En algunas realizaciones, la recomendación se determina clasificando al sujeto usando un análisis de K-vecinos más cercanos descrito en el presente documento.

Se divulgan métodos para predecir, evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad de un sujeto que tiene linfoma de células B a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40, que comprende las etapas de: (a) medir el nivel de expresión de al menos dos genes marcadores seleccionados entre el grupo que consiste en IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1, PUS7, y BCL6 en una muestra que comprende células de linfoma de células B del sujeto; (B) calcular el valor del índice de sensibilidad (SI) basándose en el nivel de expresión medido de los genes marcadores en la etapa (a) mediante la siguiente ecuación:

$$SI = \sum_{j=1}^p \beta_j \frac{x_j - \hat{\mu}_j}{\sqrt{\hat{\sigma}_j^2}}$$

en la que se mide el nivel de expresión de al menos un gen marcador que tiene un valor de correlación positiva y al menos un gen marcador que tiene un valor de correlación negativa mostrado en la tabla 4; en la que (i) β_j es el valor de coeficiente para cada gen marcador medido; (ii) p es el número de genes marcadores medidos; (iii) X_j es el nivel de expresión transformado normalizado para la muestra del sujeto por el nivel de expresión de cada marcador medido; e (iv) μ_j y σ_j son las medias y desviaciones estándar para gen marcador medido; en la que β_j , μ_j y σ_j se determinan a partir de muestras de paciente que comprenden las células de linfoma de células B. En algunas realizaciones, un valor igual o mayor de cero para el índice de sensibilidad indica que el sujeto tiene probabilidades de responder al tratamiento con anticuerpo anti-CD40, o en el que un valor menor de cero para el índice de sensibilidad indica que el sujeto tiene menos probabilidades de responder al tratamiento con anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece, al menos catorce o quince genes marcadores y se usan para el cálculo del

índice de sensibilidad. En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de IFITM1, RGS13, CD79B, CD22, BTG2, CD44, EPDR1, y UAP y se usan para el cálculo del índice de sensibilidad. En algunas realizaciones, β_j , μ_j y σ_j se determinan a partir de muestras de pacientes que tienen el mismo tipo de células de linfoma de células B que la muestra del sujeto cuya sensibilidad al tratamiento anti-CD40 se predice.

En un aspecto, la invención proporciona métodos para predecir la sensibilidad de un sujeto que tiene linfoma de células B a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40, que comprende las etapas de (a) medir el nivel de expresión de los genes marcadores BCL6, IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1, y PUS7 en una muestra que comprende células de linfoma de células B obtenidas de dicho sujeto; y (b) clasificar al sujeto como un sujeto sensible o no sensible usando un análisis de K-vecinos más próximos basado en el nivel de expresión de dichos genes marcadores en la muestra del sujeto y muestras de referencia con clases conocidas. En algunas realizaciones, dicha clasificación se determina usando un análisis ponderado de K-vecinos más próximos. En algunas realizaciones, dicha clasificación se determina usando un análisis no ponderado de K-vecinos más próximos. En algunas realizaciones, la clasificación del sujeto en la etapa (b) se lleva a cabo (1) determinando el parámetro K (es decir, el número de vecinos más próximos); (2) calculando la diferencia entre el nivel de expresión medido de los genes marcadores en la muestra del sujeto y el nivel de expresión de los genes marcadores respectivos en cada muestra de referencia; (3) determinando las muestras de referencia más próximas seleccionando aquellas muestras con la menor media ponderada de las diferencias absolutas (WAAD) entre la muestra del sujeto y la muestra de referencia; y (4) determinar la clase de sujeto basándose en las clases conocidos de las K-muestras de referencias más próximas. En algunas realizaciones, K se determina usando validación cruzada con muestras de ensayos clínicos. En algunas realizaciones, K es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o 13. En algunas realizaciones, las muestras de referencia son muestras que comprenden células de linfoma de células B obtenidas de sujetos cuya sensibilidad al tratamiento con anticuerpo anti-CD40 ya se ha evaluado o es conocida. En algunas realizaciones, las muestras de referencia comprenden el mismo tipo de células de linfoma de células B que la muestra del sujeto cuya sensibilidad al tratamiento con anticuerpo anti-CD40 se predice o evalúa. En algunas realizaciones, se normaliza el nivel de expresión medido.

En otro aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-CD40 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene linfoma de células B, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD40, en el que se ha predicho la sensibilidad del linfoma de células B en el sujeto mediante métodos definidos en las reivindicaciones.

En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de expresión medido del gen marcador en una muestra de linfoma de células B diferente. En algunas realizaciones, dicha muestra diferente de linfoma de células B comprende células de linfoma de células B que son resistentes a la muerte celular inducida por anticuerpo anti-CD40.

En algunas realizaciones, se normalizan el nivel de expresión medido del gen marcador y/o el nivel de referencia.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión se mide detectando la expresión de ARNm (por ejemplo, retrotranscripción PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)) y/o detectando la expresión de proteínas (por ejemplo, inmunohistoquímica (IHC)). Las sondas y cebadores mostrados en la tabla 1 pueden usarse en la qRT-PCR.

En algunas realizaciones, el linfoma de células B es linfoma no de Hodgkin (NHL), incluyendo, pero sin limitación, linfoma folicular, linfoma folicular recidivante, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmacítico, micosis fungoide/síndrome de Sezary, linfoma de la zona marginal esplénica, y linfoma difuso de células B grandes (DLBCL). En algunas realizaciones, el linfoma de células B se selecciona entre el grupo que consiste en linfoma indolente, linfoma agresivo, y linfoma altamente agresivo. En algunas realizaciones, el linfoma de células B es linfoma recidivante y/o refractario. En algunas realizaciones, el linfoma de células B es DLBCL recidivante/refractario.

En algunas realizaciones, el tratamiento con anticuerpo anti-CD40 es un tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 agonista. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 agonista estimula a CD40 y potencia la interacción entre CD40 y el ligando de CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo agonista anti-CD40 estimula a CD40 pero no potencia o inhibe la interacción entre CD40 y el ligando de CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo agonista anti-CD40 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 2.

También se divulgan kits que comprenden reactivos para medir los niveles de expresión de al menos un gen marcador seleccionado entre el grupo que consiste en UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. En algunas realizaciones, los kits comprenden al menos un par de cebadores para amplificar mediante PCR al menos un gen marcador. Por ejemplo, pueden usarse los cebadores directos e inversos mostrados en la tabla 1. Los kits pueden comprender además una superficie que tiene unida a la misma sondas para detectar los productos génicos amplificados, tales como una micromatriz y la invención contempla e incluye dichas superficies. En algunas realizaciones, los kits comprenden al menos un par de cebadores y una sonda para detectar el nivel de expresión de un gen marcador (tal como UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B) mediante qRT-PCR. Los kits pueden comprender

además un par de cebadores y una sonda para detectar el nivel de expresión de un gen de referencia mediante qRT-PCR. En algunas realizaciones, los kits comprenden uno o más anticuerpos que reconocen específicamente a una o más proteínas codificadas por el gen marcador. Los kits pueden comprender además otros reactivos y/o instrucciones para llevar a cabo cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Debe entenderse que una, algunas, o todas las propiedades de las diversas realizaciones descritas en el presente documento pueden combinarse para formar otras realizaciones de la presente invención. Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes para un experto en la materia.

Breve descripción de las figuras

Figura 1-1 a 1-26. Secuencias de GenBank para algunos de los genes listados en la tabla 1. Secuencias de ácido nucleico que codifican el ARNm de VNN2 (figura 1-1: SEQ ID NO: 258), RGS13 (figura 1-2: SEQ ID NO: 259), CD22 (figura 1-3 y 1-4: SEQ ID NO: 260), CD40 (figura 1-5: SEQ ID NO: 261), IFITM1 (figura 1-6: SEQ ID NO: 262), BCL6 (figura 1-7 y 1-8: SEQ ID NO: 263), EPDR1 (figura 1-9: SEQ ID NO: 264), IGF1R (figura 1-10 a 1-13: SEQ ID NO: 265), BTG2 (figura 1-14 y 1-15: SEQ ID NO: 266), LMO2 (figura 1-16: SEQ ID NO: 267), CD79B (figura 1-17: SEQ ID NO: 268), CD44 (figura 1-18 y 1-19: SEQ ID NO: 269), CTSC (figura 1-20: SEQ ID NO: 270), UAP1 (figura 1-21: SEQ ID NO: 271), PUS7 (figura 1-22 y 1-23: SEQ ID NO: 272), CD22 (figura 1-24 y 1-25: SEQ ID NO: 273), y RGS13 (figura 1-26: SEQ ID NO: 274).

Figura 2. Asociación del índice de sensibilidad multivariable y cambio porcentual en la suma tumoral del producto de las mediciones de los diámetros (SPD) para 21 pacientes en el ensayo clínico 001. El cambio porcentual de SPD se determina comparando el menor SPD después del inicial con el SPD inicial. Un cambio positivo indica aumentos del volumen tumoral, y un cambio negativo indica reducciones del volumen tumoral. Las ponderaciones (coeficientes) usados para el cálculo del índice de sensibilidad se muestran en la tabla 5. Los mayores valores del índice de sensibilidad multivariable se asocian con reducciones de SPD después del inicio (Rho de Sperman = -0,58; P = 0,006).

Figura 3. Asociación de la expresión de BCL6 y cambio porcentual en las mediciones de SPD para 26 pacientes con DLBCL. El cambio porcentual de SPD se determinó comparando el menor SPD después del inicial con el SPD inicial. Un cambio positivo indica aumentos del volumen tumoral, y un cambio negativo indica reducciones del volumen tumoral.

Figura 4. Uso de los niveles de expresión de ARNm de los genes marcadores para predecir la sensibilidad al tratamiento con el Ab.1 anti-CD40. El cambio porcentual de SPD se determinó comparando el menor SPD después del inicial con el SPD inicial. Un cambio positivo indica aumentos del volumen tumoral, y un cambio negativo indica reducciones del volumen tumoral.

Figura 5. Supervivencia libre de progresión para pacientes que se han clasificado como sensibles (Dx positiva) al tratamiento con Ab.1 anti-CD40 o no sensibles (Dx negativa) basándose en los niveles de expresión de ARNm de los genes marcadores.

Descripción detallada

La presente invención se basa en el hallazgo de que determinados genes se expresan de manera diferencial entre células de linfoma de células B que son sensibles a la muerte celular inducida por anticuerpo anti-CD40 y células de linfoma de células B que son resistentes a la muerte celular inducida por anti-CD40. Los datos de ensayos clínicos descritos en los ejemplos 1 y 2 indican que el nivel de expresión de uno o más de los quince genes, UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B puede usarse para predecir, evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad al tratamiento con anticuerpo anti-CD40 (tal como tratamiento con Ab.1 anti-CD40). Algunos de los genes expresados de manera diferencial entre las células de linfoma de células B sensibles y las células de linfoma de células B resistentes son los genes de la vía regulada negativamente por el ligando de CD40; y algunos se encuentran en la vía de señalización del receptor de células B. Por consiguiente, pueden usarse los niveles de expresión de uno o más de estos genes expresados de manera diferencial para evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad de un sujeto que tiene linfoma de células B al tratamiento con anticuerpos anti-CD40, a predecir la sensibilidad del sujeto al tratamiento con anticuerpos anti-CD40, y a controlar el tratamiento/sensibilidad en el sujeto.

A. Técnicas generales

La práctica de la presente invención empleará, salvo que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica, e inmunología, que se encuentran dentro de las capacidades de la técnica. Dichas técnicas se explican detalladamente en la bibliografía, tal como, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, y las actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994).

Los cebadores, oligonucleótidos y polinucleótidos empleados en la presente invención pueden generarse usando técnicas convencionales conocidas en la técnica.

A menos que se defina de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2ª ed., J. Wiley & Sons (Nueva York, N.Y. 1994), y March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 4ª ed., John Wiley & Sons (Nueva York, N.Y. 1992), ofrecen a un experto en la materia una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud.

B. Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "un sujeto que tiene un linfoma de células B" y "paciente de linfoma de células B" se refieren a un sujeto al que se le ha diagnosticado un tipo de linfoma de células B o al que se le ha dado un diagnóstico probable de un tipo de linfoma de células B.

El término "biomarcador" o "marcador", tal como se usa en el presente documento, se refiere en general a una molécula, incluyendo un gen, proteína, estructura de carbohidrato, o glucolípido, cuya expresión en un tejido o célula de mamífero o su secreción pueden detectarse mediante métodos conocidos (o métodos divulgados en el presente documento) y es predictivo o puede usarse para predecir (o ayudar en la predicción) la sensibilidad de una célula o tejido de mamífero a, y en algunas realizaciones, a predecir (o ayudar en la predicción) de la sensibilidad de un sujeto a regímenes de tratamientos basados en anticuerpos anti-CD40.

El término "muestra", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que se obtiene o deriva de un sujeto de interés que contiene una entidad celular y/o molecular distinta que se va a caracterizar y/o identificar, por ejemplo, basándose en características físicas, bioquímicas, químicas y/o fisiológicas. Por ejemplo, la frase "muestra de enfermedad" y variaciones de ésta se refieren a cualquier muestra obtenida de un sujeto de interés que se esperaría o se sabe que contiene la entidad celular y/o molecular que va a caracterizarse.

Por "muestra de tejido o de células" se entiende una colección de células similares obtenidas a partir de un tejido de un sujeto o paciente. La fuente de la muestra de tejido o células puede ser tejido sólido tal como de un órgano fresco, congelado y/o conservado o una muestra o biopsia o aspirado de tejido; sangre o cualquier componente de la sangre; fluidos corporales, tales como fluido cefalorraquídeo, fluido amniótico, fluido peritoneal, o fluido intersticial; células de cualquier momento de la gestación o desarrollo del sujeto. La muestra de tejido también puede ser de células o líneas celulares primarias o cultivadas. Opcionalmente, la muestra tisular o celular se obtiene de un tejido/órgano enfermo. La muestra de tejido puede contener compuestos que no se encuentren mezclados con el tejido de manera natural, tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijativos, nutrientes, antibióticos, o similares.

Para los fines del presente documento, se entiende que una "sección" de una muestra de tejido es una sola parte o trozo de una muestra de tejido, *por ejemplo*, una fina lámina de tejido o células cortada de una muestra de tejido. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a análisis de acuerdo con la presente invención, siempre que se entienda que la presente invención comprende un método mediante el cual se analiza la misma sección de tejidos a niveles tanto morfológicos como moleculares, o se analiza respecto tanto de proteínas como de ácidos nucleicos.

Tal como se usa en el presente documento, una "muestra de linfoma de células B" o una "muestra que comprende células de linfoma de células B" es una muestra de tejido o células que contiene células de linfoma de células B de un sujeto o de un paciente al que se le ha diagnosticado un tipo de linfoma de células B.

Tal como se usa en el presente documento, un método para "ayudar en la evaluación" se refiere a métodos que ayudan a efectuar una determinación clínica (por ejemplo, la sensibilidad de un linfoma de células B al tratamiento con anticuerpos anti-CD40), y puede ser o no determinante respecto de la evaluación definitiva.

Un "sujeto" o un "individuo" es un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, a seres humanos, primates, animales de granja, animales de deporte, roedores, y mascotas (*por ejemplo*, perros y gatos).

Tal como se usa en el presente documento, un "valor de referencia" puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior y/o inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor mediano; un valor medio; o un valor comparado con un valor de control o inicial particular.

El término "matriz" o "micromatriz", tal como se usa en el presente documento se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables, tales como sondas de polinucleótidos (por ejemplo, oligonucleótidos) y anticuerpos, sobre un sustrato. El sustrato puede ser un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio, o un sustrato semisólido, tal como una membrana de nitrocelulosa. Las secuencias de nucleótidos pueden ser ADN, ARN, o cualquier permutación de los mismos.

La "amplificación", tal como se usa en el presente documento, se refiere en general al proceso de producir múltiples copias de una secuencia deseada. "Múltiples copias" significa al menos 2 copias. Una "copia" no significa

necesariamente una complementariedad o identidad perfecta de la secuencia con respecto a la secuencia del molde. Por ejemplo, las copias pueden incluir análogos de nucleótidos, tales como desoxiinosina, alteraciones de secuencia intencionadas (tales como alteraciones de secuencia introducidas mediante un cebador que comprende una secuencia que es hibridable, pero no complementaria, al molde), y/o errores de secuencia que se producen durante la amplificación.

La expresión/cantidad de un gen o biomarcador en una primera muestra se encuentra a un nivel "mayor que" el nivel en una segunda muestra si el nivel/cantidad de expresión del gen o biomarcador en la primera muestra es al menos aproximadamente 1,5X, 1.75X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X o 10X el nivel/cantidad de expresión del gen o biomarcador en la segunda muestra. Los niveles/cantidades de expresión pueden determinarse basándose en cualquier adecuado conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, ARNm, ADNc, proteínas, fragmentos de proteínas y/o copias de genes. Los niveles/cantidades de expresión pueden determinarse cualitativa o cuantitativamente.

Un "polinucleótido" o "ácido nucleico" tal como se usa de manera indistinta en el presente documento, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificadas, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, puede conferirse la modificación a la estructura del nucleótido antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleótidos. Un polinucleótido puede modificarse además después de la polimerización, tal como mediante conjugación con un componente de marcado. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapones", sustitución de uno o más de los nucleótidos de origen natural con un análogo, modificaciones internucleótido, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos colgantes, tal como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, poli-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como formas no modificadas de los polinucleótidos. Además, cualquiera de los grupos hidroxilo normalmente presentes en los azúcares pueden reemplazarse, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse mediante grupos protectores convencionales, o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse a soportes sólidos. Los OH en los 5' y 3' terminales pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de tapado orgánicos de desde 1 hasta 20 átomos de carbono. También pueden derivatizarse otros hidroxilos a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que se conocen generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-2'-O-alilo, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos carbocíclicos de azúcares, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos, tales como metil ribósido. Pueden reemplazarse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se reemplaza por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditioato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que cada uno de R o R' es independientemente H o alquilo (C 1-20) sustituido o no sustituido que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces de un polinucleótido tienen que ser idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos citados en el presente documento, incluyendo ADN y ARN.

Un "oligonucleótido", tal como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos que, generalmente, pero no necesariamente, tienen menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para los polinucleótidos puede aplicarse igual y por completo a los oligonucleótidos.

Un "cebador" es en general un polinucleótido monocatenario corto, generalmente con un grupo 3'-OH libre, que se une a una diana potencialmente presente en una muestra de interés mediante hibridación con una secuencia diana, y posteriormente promueve la polimerización de un polinucleótido complementario a la diana. Un "par de cebadores" se refiere a un cebador 5' y a un cebador 3' que pueden usarse para amplificar una porción de un gen diana específico.

El término "3'" se refiere generalmente a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 3' (cadena abajo) de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido. El término "5'" se refiere generalmente a una región o posición en un polinucleótido u oligonucleótido 5' (cadena arriba) de otra región o posición en el mismo polinucleótido u oligonucleótido.

La expresión "amplificación génica" se refiere a un proceso mediante el cual se forman múltiples copias de un gen o fragmento génico en una célula o línea celular concreta. La región duplicada (un fragmento de ADN amplificado) a menudo se cita como "amplicón". Generalmente, la cantidad del ARN mensajero (ARNm) producido, es decir, el nivel

de expresión génica, también aumenta en función del número de copias producidas del gen particular expresado.

La "detección" incluye cualquier medio de detección, incluyendo la detección directa e indirecta.

- 5 El término "predicción" se utiliza en el presente documento para referirse a la probabilidad de que un paciente responda de forma favorable o desfavorable a un fármaco o conjunto de fármacos. En una realización, la predicción se refiere al alcance de esas respuestas. En una realización, la predicción se refiere a la si el paciente sobrevivirá o mejorará y/o a la probabilidad de supervivencia o mejora del paciente después del tratamiento, por ejemplo, tratamiento con un agente terapéutico concreto, y durante un periodo de tiempo determinado sin recurrencia de la enfermedad. Los métodos predictivos de la invención se pueden usar clínicamente para tomar las decisiones del tratamiento escogiendo las modalidades de tratamiento más adecuadas para cualquier paciente concreto. Los métodos predictivos de la presente invención son herramientas valiosas para predecir si es probable que un paciente responda favorablemente a un régimen de tratamiento, tal como un régimen terapéutico dado, incluyendo, por ejemplo, la administración de un agente o combinación terapéutica dada, una intervención quirúrgica, un tratamiento con esteroides, etc., o si es probable la supervivencia a largo plazo del paciente después de un régimen terapéutico.

La expresión supervivencia "a largo plazo" se usa en el presente documento para referirse a la supervivencia durante al menos 1 año, 5 años, 8 años, o 10 años después del tratamiento terapéutico.

- 20 La "respuesta del paciente" puede evaluarse usando cualquier criterio de valoración que indique un beneficio para el paciente, incluyendo, sin limitación, (1) la inhibición, hasta cierto punto, de la progresión de la enfermedad, incluyendo la ralentización y la detención completa; (2) la reducción en el número de episodios y/o síntomas de la enfermedad; (3) la reducción del tamaño lesional; (4) la inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la infiltración de células enfermas en los órganos y/o tejidos periféricos adyacentes; (5) la inhibición (es decir, reducción, ralentización o detención completa) de la diseminación de la enfermedad; (6) el alivio, hasta cierto punto, de uno o más síntomas asociados con el trastorno; (7) el aumento de la duración de la presentación sin enfermedad después del tratamiento; y/u (8) la mortalidad reducida en un instante dado después del tratamiento.

- 30 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre que muestren la actividad o función biológica deseada.

- 35 Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo de longitud completa, generalmente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

- 40 "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y de unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de región variable de cadena ligera y de cadena pesada en asociación estrecha no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles en cada una de las cadenas H y L) que aportan los restos de aminoácidos para la unión al antígeno y que confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un solo dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

- 45 La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo procedente de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es *decir*, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen a los mismos epítopos, salvo por posibles variantes que puedan surgir durante la producción del anticuerpo monoclonal, estando dichas variantes presentes generalmente en cantidades menores. Dicho anticuerpo monoclonal incluye normalmente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a antígeno se obtuvo mediante un proceso que incluye la selección de una sola secuencia de polipéptido de unión a diana de diversas secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el proceso de selección puede ser la selección de un único clon de diversos clones, tales como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Debe entenderse que la secuencia de unión a diana seleccionada puede alterarse adicionalmente, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en cultivo celular, para reducir su inmunogenicidad *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, *etc.*, y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen normalmente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un solo determinante o antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas en tanto que normalmente no están contaminadas por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe entenderse que requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para su uso de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante diversas técnicas, incluyendo, por ejemplo, el método de hibridoma (*por ejemplo*, Kohler et al., Nature,

256:495 (1975); Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)), métodos de ADN recombinante (véase, *por ejemplo*, la patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, *por ejemplo*, Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); y Lee et al. *J. Immunol. Methods* 284(1-2):1119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen la totalidad o partes de los locus de inmunoglobulina humana o genes que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véanse, *por ejemplo*, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); Patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.806; 5.569.825; 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; WO 1997/17852; Patentes de los Estados Unidos n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks et al., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); y Lonberg Y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpo "quiméricos". Los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricas" tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo concreta, mientras que la cadena (o las cadenas) restante es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Un anticuerpo humanizado, tal como se usa en el presente documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una mínima parte de la secuencia derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor o aceptor) en el que los restos de la región hipervariable se reemplazan con restos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como un ratón, rata, conejo o un primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región marco conservada (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por restos correspondientes no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender restos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se efectúan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo, tal como la afinidad de unión. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todas de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana, aunque las regiones FR pueden incluir una o más sustituciones de aminoácidos que mejoran la afinidad de unión. El número de estas sustituciones de aminoácidos en la FR es normalmente no mayor de 6 en la cadena H, y en la cadena L, de no más de 3. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera opcional al menos una porción de la región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente aquella de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véase Jones et al., *Nature* 321:522-525 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con aquella de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha producido usando cualquiera de las técnicas conocidas para producir anticuerpos humanos. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende restos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR/HVR del mismo que dan como resultado una mejora de la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee dichas alteraciones. Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares por el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad mediante reordenamiento de los dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de restos de CDR/HVR y/o marco conservados se describe por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

La expresión "región Fc" se usa para definir la región C-terminal de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede generarse mediante digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, se ha definido que la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde un resto de aminoácido aproximadamente en la posición Cys226, o aproximadamente en la posición Pro230, respecto del extremo carboxilo de la región Fc. La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4. Por "cadena de región

Fc" se entiende en el presente documento una de las dos cadenas polipeptídicas de una región Fc.

Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de secuencia de aminoácidos variante) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: Unión a C1q y citotoxicidad dependiente de complemento; unión a receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación negativa de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y activación de células B.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que una Ig unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (*por ejemplo*, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permiten a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana que porta un antígeno y posteriormente eliminar a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha eliminación. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede efectuarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.500.362 o 5.821.337 o en Presta, Patente de los Estados Unidos n.º 6.737.056. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleadas de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el descrito en Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere al tratamiento terapéutico en el que el objetivo es frenar (aminorar) si no curar la patología o trastorno diana o prevenir la recidiva de la afección. Un sujeto se "trata" de manera satisfactoria para la neoplasia de células B si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo de unión a CD40, el sujeto muestra una reducción observable y/o medible en o la ausencia de uno o más signos y síntomas de la enfermedad particular. Por ejemplo, una reducción significativa en el número de células cancerosas o la ausencia de células cancerosas; una reducción en el tamaño del tumor; la inhibición (es decir, ralentizar hasta cierto punto y preferentemente detener) de la metástasis tumoral; la inhibición, hasta cierto punto, del crecimiento tumoral; el aumento de la duración de la remisión, y/o el alivio hasta cierto punto, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en los asuntos relacionados con la calidad de vida. La reducción en los signos o síntomas de una enfermedad también pueden percibirse por el paciente. El tratamiento puede lograr una respuesta completa, definida como la desaparición de todos los signos de cáncer, o una respuesta parcial, en la que se reduce el tamaño del tumor, preferentemente en más de un 50 por ciento, más preferentemente en un 75 %. También se considera a un paciente como tratado si el paciente experimenta una enfermedad estable. En un criterio, los anticuerpos de la invención logran una eliminación de células B de sangre periférica > 95 % y las células B retornan a un 25 % de las iniciales. En algunas realizaciones, el tratamiento con los anticuerpos anti-CD40 es eficaz para dar como resultado que los pacientes de cáncer estén libres de progresión en cáncer 3 meses después del tratamiento, preferentemente 6 meses, más preferentemente un año, aún más preferentemente 2 o más años después del tratamiento. Estos parámetros para evaluar un tratamiento exitoso y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos rutinarios familiares para un médico experto en la materia.

La expresión "linfoma no de Hodgkin" o "NHL", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cáncer del sistema linfático distinto de los linfomas de Hodgkin. Los linfomas de Hodgkin pueden distinguirse generalmente de los linfomas no de Hodgkin por la presencia de células de Reed-Sternberg en los linfomas de Hodgkin y por la ausencia de dichas células en los linfomas no de Hodgkin.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente terapéutico puede variar dependiendo de factores tales como la patología, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y de la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del agente terapéutico se ve sobrepasada por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad que es eficaz, en las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Típica pero no necesariamente, ya que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes de o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "gen constitutivo" se refiere a un grupo de genes que codifican proteínas cuyas actividades son esenciales para el mantenimiento de la función celular. Estos genes se expresan normalmente de manera similar en todos los tipos de células.

Por "correlaciona" o "correlacionar" se entiende comparar, de cualquier modo, en rendimiento y/o los resultados de un primer análisis o protocolo con el rendimiento y/o los resultados de un segundo análisis o protocolo. Por ejemplo, se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo al llevar a cabo un segundo protocolo y/o se pueden usar los resultados de un primer análisis o protocolo para determinar si debería realizarse un segundo análisis o protocolo.

Con respecto a la realización del análisis o protocolo de expresión génica, pueden usarse los resultados del análisis o protocolo de expresión génica para determinar si debe aplicarse un régimen terapéutico específico.

La palabra "marcador", cuando se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto o a una composición que se conjuga o fusiona directamente o indirectamente a un reactivo, tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al que se conjuga o fusiona. El marcador puede ser detectable en sí (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química del compuesto o composición de sustrato que es detectable.

Tal como se usa en el presente documento, "un", "una" y "el" o "la" pueden significar singular o plural (es decir, pueden significar uno o más) a menos que se indique lo contrario.

Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste" y "que consiste esencialmente en" aspectos y realizaciones.

C. Métodos de la invención

La invención proporciona métodos para evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad de un sujeto que tiene linfoma de células B al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40. La invención también proporciona métodos para predecir la sensibilidad o controlar el tratamiento/sensibilidad a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40 en un sujeto que tiene linfoma de células B. La invención proporciona métodos para seleccionar un sujeto que tiene un linfoma de células B para su tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 y tratar al sujeto con un tratamiento de anticuerpos anti-CD40. En algunas realizaciones, los métodos comprenden medir el nivel de expresión de uno o más genes marcadores seleccionados entre el grupo que consiste en UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B en una muestra que comprende células de linfoma de células B obtenidas del sujeto; y predecir, evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad del sujeto a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40 basada en la medición del nivel de expresión de dichos uno o más genes marcadores. En algunas realizaciones, los métodos comprenden comparar el nivel de expresión medido de al menos un gen marcador seleccionado entre UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B en una muestra de linfoma de células B del sujeto con un nivel de referencia para el gen marcador respectivo. En algunas realizaciones, se predice o evalúa la sensibilidad usando el valor de índice de sensibilidad determinado basándose en el nivel de expresión medido de uno o más de los genes marcadores. En algunas realizaciones, se predice o evalúa la sensibilidad clasificando al sujeto usando un análisis de K-vecinos más próximos descrito en el presente documento.

Los métodos de la presente invención son útiles para los médicos para identificar pacientes con linfoma de células B para su tratamiento con un anticuerpo anti-CD40, ayudar en la selección de pacientes durante el transcurso del desarrollo de terapias con anticuerpo anti-CD40, predecir las posibilidades de éxito cuando se trata a un paciente individual con un régimen de tratamiento particular, evaluar y controlar la progresión de la enfermedad, controlar la eficacia del tratamiento, y determinar el pronóstico para pacientes individuales. Cualquiera de estas realizaciones se incluye en la presente invención.

En algunas realizaciones, el linfoma de células B es linfoma no de Hodgkin (NHL), incluyendo, pero sin limitación, linfoma folicular, linfoma folicular recidivante, linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal, linfoma linfoplasmacítico, micosis fungoide/síndrome de Sezary, linfoma de la zona marginal esplénica, y linfoma difuso de células B grandes.

En algunas realizaciones, el linfoma de células B es indolente. En algunas realizaciones, el linfoma de células B es agresivo. En algunas realizaciones, el linfoma de células B es altamente agresivo. En algunas realizaciones, el linfoma indolente de células B es linfoma folicular, linfoma de la zona marginal, o linfoma linfocítico de células pequeñas. En algunas realizaciones, el linfoma indolente de células B es linfoma folicular.

Genes marcadores

Puede usarse el nivel de expresión de diversos genes marcadores en una muestra de linfoma de células B en los métodos de la invención para predecir la sensibilidad del linfoma de células B al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, se usa el nivel de expresión de uno o más de los genes marcadores en relación a un nivel de referencia en los métodos de la invención.

El uso del nivel de expresión de UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B para predecir, evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40 se muestra en los ejemplos 1 y 2. Los niveles de expresión de estos diversos genes se usan en los métodos de la invención. En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos doce, al menos trece, al menos catorce, al menos quince o quince genes seleccionados entre UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B y se usan en los métodos

de la invención.

Los genes (incluyendo las secuencias) usados como marcadores en el presente documento se conocen en la técnica. Por ejemplo, los ejemplos de números de referencia de GenBank para genes humanos son VNN2 (NM_004665; NM_078488; AJ132100; D89974; BC064641; CR609799; BC126145; BC126147; y AB026705); RGS13 (NM_002927; NM_144766; BT006929; BC056866; AY562947; CR536532; CR610389; CR599001; BC016667; AF493935; BC036950; y AF030107); CD22 (NM_001771; AK026467; BC109306; BC109307; AK225694; AK225625; X52785; y X59350); LRRC8A (AY143166; BC051322; AK123611; AY358286; NM_019594; XM_026998; AK001199; AB037858; CR619692; CR619448; AK024649; BC000775; AK027495; y AK074723); CD40 (NM_001250; NM_152854; BC064518; AY225405; CR619622; CR608994; CR605787; AB209660; AK222896; AJ300189; BT019901; y BC012419); IFITM1 (NM_003641; BC000897; BT007173; BT009859; CR456894; CR541874; CR604902; X57351; X84958; NM_006435; BC009696; X02490; y J04164); SMN1 (NM_000344; BC062723; CR611445; CR593735; BC000908; NM_022874; BC015308; y U18423); PRKCA (NM_002737; AB209475; BC109274; BC109273; AF035594; BC053321; BX648954; AK125425; BC062759; BC071767; BC103691; BC101403; BC107592; AY633609; BC122530; BC015855; AF086287; AF035595; M22199; y X52479); EPDR1 (DQ914439; AY027862; NM_017549; AJ250475; AF202051; CR624676; CR596656; NM_016616; BC000686; BC018299; AF305596; y BC036816); PRPSAP2 (NM_002767; AB007851; BX648850; AK126398; CR457082; BC101672; BC101670; y BC106050); IGF1R (NM_000875; NM_015883; AY429545; CR624013; BC078157; BC088377; BC107089; BC111046; BC113610; BC113612; BC010607; X04434 M24599; y U09023); BTG2 (NM_006763; CR606002; CR604962; CR595352; CR591042; BC105948; BC105949; U72649; y Y09943); LMO2 (BC042426; NM_005574; BC073973; AK127915; CR625714; CR614368; CR604507; AF257211; BC034041; BC035607; y X61118); YIPF3 (AL050274; AK000946; CR533541; CR623137; CR622890; CR622532; CR621993; CR619816; CR619437; CR619054; CR618212; CR616987; CR616384; CR615623; CR615153; CR615118; CR612415; CR611748; CR611260; CR610983; CR610470; CR607768; CR606024; CR603408; CR603202; CR602267; CR601987; CR599615; CR598162; CR597677; CR596581; CR596249; CR595236; CR592266; CR590752; CR590349; NM_015388; AK021433; AK021655; AK022757; BC019297; y AF162672); y BCL6 (NM_001706; NM_138931; BX649185; U00115; BC142705; BC146796; BC150184; AL713713; AK090890; AL832990; y Z21943). Los números de referencia de GenBank para los genes marcadores se enumeran también en la tabla 1.

La secuencia de ácido nucleico de algunos de los genes se muestra en la figura 1 (1-1 a 1-26).

Niveles de referencia

El nivel de expresión medido de uno o más genes marcadores en una muestra de linfoma de células B se compara con un nivel de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es el nivel de expresión de un gen cuyo nivel de expresión no cambia (no cambia significativamente) entre diferentes tipos de linfomas de células B, por ejemplo, entre linfoma de células B sensible al anticuerpo anti-CD40 y linfoma de células B resistente al anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, se usan los niveles de expresión de uno o más genes constitutivos (tales como los genes mostrados en las tablas 8 y 9 del documento WO 2009/062125) como niveles de referencia.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión medido del gen marcador se normaliza usando el nivel de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión normalizado del gen marcador se calcula como una proporción o diferencia entre el gen marcador y los niveles de expresión de referencia, o el original en una escala logarítmica, respectivamente.

Los genes de referencia pueden seleccionarse como homólogos de normalización específicos para los genes marcadores. Los genes de referencia se seleccionaron respecto de su alta expresión media y baja varianza en muestras de linfoma de células B. Además, se seleccionaron los genes de referencia para que tuviesen una varianza similar entre mediciones de expresión replicadas de líneas celulares individuales en relación a la varianza entre mediciones de expresión de líneas celulares biológicamente distintas. Además, se seleccionaron los genes de referencia para que tuviesen una baja asociación estadística con uno o más marcadores.

En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un nivel de expresión medido del gen marcador en una muestra de linfoma de células B diferente. En algunas realizaciones, la muestra diferente de linfoma de células B comprende células de linfoma de células B que son resistentes a la muerte celular inducida por anticuerpo anti-CD40.

En algunas realizaciones, el nivel de referencia se determina basándose en el nivel de expresión del gen marcador correspondiente en muestras que comprenden células de linfoma de células B de sujetos que tienen un volumen tumoral aumentado después del tratamiento con anticuerpo anti-CD40 y/o que tienen un volumen tumoral reducido después del tratamiento con anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, las muestras de sujetos para la determinación del nivel de referencia comprenden el mismo tipo de células de linfoma de células B que la muestra del sujeto cuya sensibilidad al tratamiento con anticuerpo anti-CD40 se está prediciendo o evaluando. En algunas realizaciones, se usa el mismo método (por ejemplo, qRT-PCR) y/o los mismos reactivos (por ejemplo, cebadores y sondas) para medir el nivel de expresión de los genes marcadores en la muestra y para medir el nivel de expresión de los genes marcadores correspondientes en las muestras de referencia.

Medición de los niveles de expresión

Los métodos divulgados en el presente documento proporcionan métodos para examinar el nivel de expresión de uno o más de estos genes marcadores en una muestra de linfoma (por ejemplo, muestra de linfoma de células B). En algunas realizaciones, se examina el nivel de expresión en relación a un nivel de referencia para uno o más genes marcadores. Los métodos y ensayos incluyen aquellos que examinan la expresión de genes marcadores, tales como uno o más de UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. Los niveles de expresión pueden medirse a nivel de ARNm y/o a nivel de proteína.

La invención proporciona métodos para medir los niveles de expresión a partir de una muestra de tejido de mamífero o de células (tales como células y/o tejidos asociados con el linfoma de células B). Por ejemplo, para obtener muestras de paciente, se lleva a cabo una tinción de H&E y se usa como guía para la macrodissección de tejidos para enriquecer respecto del contenido tumoral. La muestra puede obtenerse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. La muestra puede estar fresca o congelada. En algunas realizaciones, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares. En los métodos, se obtiene una muestra de tejido de mamífero o de células y se examina respecto de la expresión de uno o más biomarcadores. Los métodos pueden llevarse a cabo en diversos formatos de ensayo, incluyendo ensayos que detectan la expresión de ARNm, ensayos enzimáticos que detectan la presencia de actividad enzimática, y ensayos inmunohistoquímicos. La determinación de la expresión de dichos biomarcadores en dichos tejidos o células será predictiva de que dichos tejidos o células serán sensibles/responderán al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40.

Tal como se discute más adelante, puede analizarse la expresión de diversos biomarcadores en una muestra mediante una serie de metodologías, muchas de las cuales se conocen en la técnica y son entendidas por el experto en la materia, incluyendo, pero sin limitación, micromatrices (análisis de matrices de genes y/o tejidos), hibridación *in situ*, análisis de Northern, análisis PCR de ARNm, análisis inmunohistoquímico y/o de Western, FACS, matrices de proteínas, espectrometría de masas, ensayos cuantitativos basados en sangre (tales como, por ejemplo, ELISA en suero) (para examinar, por ejemplo, los niveles de expresión de proteínas), y/o ensayos bioquímicos de actividad enzimática. Los protocolos típicos para evaluar el estado de genes y productos génicos se encuentran, por ejemplo, en Ausubel et al. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unidades 2 (Transferencia de Northern), 4 (Transferencia de Southern), 15 (Inmunotransferencia) y 18 (Análisis PCR). Los protocolos a continuación relativos a la detección de biomarcadores particulares, tales como el nivel de expresión de uno o más de UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B, en una muestra se proporcionan con fines ilustrativos.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención incluyen además protocolos que examinan la presencia y/o expresión de ARNm, tales como ARNm de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve, al menos diez, al menos once, al menos doce, al menos trece, al menos catorce, o quince genes entre UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B, en una muestra de tejidos o de células. En algunas realizaciones, puede analizarse la expresión de diversos biomarcadores mediante tecnologías de micromatriz, que examinan o detectan ARNm, en una muestra de tejidos o de células. Para el uso de micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de ensayo y de control de muestras de tejido de ensayo y de control se retrotranscriben y marcan para generar sondas de ADNc. Entonces se hibridan las sondas a una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. La matriz se configura de tal modo que se conoce la secuencia y posición de cada miembro de la matriz. Por ejemplo, puede disponerse en forma de matriz una selección de genes tienen el potencial de expresarse en determinadas patologías sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro concreto de la matriz indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. El análisis de expresión génica diferencial de tejido enfermo puede proporcionar información valiosa. La tecnología de micromatriz utiliza técnicas de hibridación de ácido nucleico y tecnología informática para evaluar el perfil de expresión de ARNm de miles de genes en un solo experimento. (Véase, por ejemplo, el documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; véanse también, por ejemplo, el documento U.S. 5.700.637, la Patente de los Estados Unidos 5.445.934, y la Patente de los Estados Unidos 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21 (Supl):15-19 (1999) para una explicación de la fabricación de la matriz). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos génicos que se sintetizan directamente o se puntea sobre vidrio u otros sustratos. Normalmente están representados miles de genes en una sola matriz. Un experimento de micromatriz típico implica las siguientes etapas: 1) preparación de diana marcada fluorescentemente a partir de ARN aislado de la muestra, 2) hibridación de la diana marcada a la micromatriz, 3) lavado, tinción, y escaneo de la matriz, 4) análisis de la imagen escaneada y 5) generación de los perfiles de expresión génica. Actualmente se usan dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (normalmente de 25 a 70 meros) y matrices de expresión génica que contienen productos de la PCR preparados a partir de ADNc. Al formar una matriz, los oligonucleótidos pueden prefabricarse y puntearse en la superficie o sintetizarse directamente en la superficie (*in situ*).

El sistema GeneChip® de Affymetrix es un sistema de micromatriz comercial que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sonda/gen: Los oligonucleótidos, normalmente 25 meros, se sintetizan directamente sobre una oblea de vidrio mediante una

combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías de síntesis química de fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligos diferentes y cada oligo está presente en millones de copias. Ya que las sondas oligonucleotídicas se sintetizan en ubicaciones conocidas sobre la matriz, pueden interpretarse los patrones de hibridación y las intensidades de señal en términos de identidad génica y de niveles de expresión relativa por el programa informático Affymetrix Microarray Suite. Cada gen se representa sobre la matriz mediante una serie de diferentes sondas oligonucleotídicas. Cada par de sonda consiste en un oligonucleótido perfectamente emparejado y un oligonucleótido desemparejado. La sonda perfectamente coincidente tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y por lo tanto mide la expresión del gen. La sonda desemparejada difiere de la sonda perfectamente emparejada en una sola sustitución de base en la posición de la base central, alterando la unión del transcrito génico diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de fondo y no específica que contribuye a la señal medida para el oligo perfectamente emparejado. El programa informático Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas desemparejadas de aquellas de las sondas perfectamente emparejadas para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se seleccionan basándose en la información actual de GenBank y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas en el extremo 3' del gen. Se usa un Horno de Hibridación GeneChip (horno de "rotiserie") para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación de fluidos lleva a cabo el lavado y la tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizado y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo se controla independientemente mediante el programa informático Microarray Suite usando protocolos de fluidos preprogramados. El escáner es un escáner de fluorescencia láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. La estación de trabajo informática con el programa informático Microarray Suite controla la estación de fluidos y el escáner. El programa informático Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones de fluidos usando protocolos preprogramados de hibridación, lavado, y tinción para la matriz de sondas. El programa también recoge y convierte los datos de hibridación en una llamada de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos adecuados. Finalmente, el programa informático detecta cambios en la expresión génica entre experimentos mediante un análisis de comparación y da formato a la salida en archivos .txt, que pueden usarse con otros programas informáticos para el análisis adicional de los datos.

En algunas realizaciones, también puede evaluarse la expresión de diversos biomarcadores en una muestra examinando la eliminación génica o la amplificación génica. La eliminación o la amplificación génica pueden medirse mediante uno cualquiera de una gran variedad de protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante transferencia de Southern convencional, transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 77:5201-5205 (1980)), transferencia por puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH), usando una sonda marcada de manera adecuada, métodos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (HGC) usando una sonda marcada de manera adecuada. A modo de ejemplo, estos métodos pueden emplearse para detectar la eliminación o amplificación de genes.

En algunas realizaciones, puede evaluarse la expresión de diversos biomarcadores en una muestra media ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementarias (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácido nucleico (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios, tales como cebadores específicos para uno o más genes de UAP 1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B, y otros métodos de detección de tipo amplificación, tales como, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares).

Pueden ensayarse de manera conveniente muestras de tejidos o de células respecto de, *por ejemplo*, ARNm de uno o más de los genes UAP 1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B, usando análisis de Northern, de transferencia por puntos o PCR. En algunas realizaciones, puede ensayarse la expresión de uno o más biomarcadores mediante RT-PCR. En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR en tiempo real. En algunas realizaciones, la RT-PCR es RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se conocen bien en la técnica ensayos de RT-PCR, tales como ensayos de PCR cuantitativos. En una realización ilustrativa de la invención, un método para detectar un ARNm en una muestra biológica comprende producir ADNc a partir de la muestra mediante transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de este modo usando un polinucleótido como cebadores sentido y antisentido para amplificar los ADNc en la misma; y detectando la presencia del ADNc amplificado de interés. En algunas realizaciones, la RT-PCR en tiempo real es RT-PCR cuantitativa. En algunas realizaciones, la RT-PCR en tiempo real puede llevarse a cabo usando química TaqMan® (Applied Biosystems). En algunas realizaciones, la RT-PCR en tiempo real puede llevarse a cabo usando química TaqMan® (Applied Biosystems) y el sistema de detección de secuencias ABI Prism® 7700 (Applied Biosystems). La RT-PCR en tiempo real combina los principios de que la polimerasa Taq tiene una actividad exonucleasa 5'-3' y se han creado sondas oligonucleotídicas fluorogénicas marcadas dualmente que emiten una señal fluorescente únicamente tras la escisión, basándose en el principio de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia. Véase, *por ejemplo*, Overbergh, L. et al., J. Biomolecular Techniques 14(1): 33-43 (2003). Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permitan determinar los niveles de ARNm en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativa de un gen "constitutivo", tal como un miembro de la familia de actina y/o uno o más genes listados en las tablas 8 y 9 en el documento WO 2009/062125). Los ejemplos de cebadores y sondas que pueden usarse para llevar a cabo la qRT-PCR se proporcionan en la tabla 1.

En algunas realizaciones, la expresión de proteínas codificadas por UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B en una muestra se examina usando protocolos de inmunohistoquímica y de tinción. La tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido ha demostrado ser un método fiable para evaluar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas inmunohistoquímicas ("IHC") utilizan un anticuerpo para sondear y visualizar antígenos celulares *in situ*, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes.

Para la preparación de la muestra, puede usarse una muestra de tejido o células de un mamífero (normalmente un paciente humano). Los ejemplos de muestras incluyen, pero sin limitación, biopsia de tejido, sangre, aspirado de pulmón, esputo, fluido linfático, etc. La muestra puede obtenerse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero sin limitación, extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede estar fresco o congelado. En algunas realizaciones, la muestra se fija y se incluye en parafina o similares.

La muestra de tejido puede fijarse (*es decir*, conservarse) mediante metodologías convencionales (véase, *por ejemplo*, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, Nueva York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la materia apreciará que la elección de un fijativo se determina según el fin para el cual se va a teñir histológicamente la muestra o analizada de otro modo. Un experto en la materia también apreciará que la duración de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y del fijativo empleado. A modo de ejemplo, puede usarse formalina neutra tamponada, Bouin o paraformaldehído para fijar una muestra.

En general, en primer lugar se fija la muestra y después se deshidrata mediante una serie ascendente de alcoholes, se infiltra y se incluye en parafina u otro medio de corte de tal forma que puede seccionarse la muestra de tejido. Como alternativa, se puede seccionar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido puede incluirse y procesarse en parafina mediante metodologías convencionales (véase, *por ejemplo*, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", *anteriormente citado*). Los ejemplos de la parafina que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, Paraplast, Broloid, y Tissuemay. Una vez se ha incluido la muestra de tejido, puede seccionarse la muestra con un microtomo o similares (véase, *por ejemplo*, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", *anteriormente citado*). A modo de ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden estar comprendidas entre aproximadamente tres micrómetros a aproximadamente cinco micrómetros de espesor. Una vez seccionadas, las secciones pueden unirse a portaobjetos mediante varios métodos convencionales. Los ejemplos de adhesivos de portaobjetos incluyen, pero sin limitación, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, las secciones incluidas en parafina pueden unirse a portaobjetos cargados positivamente y/o a portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina.

Si se ha usado parafina como material de inclusión, las secciones de tejido generalmente se desparafinan y se rehidratan con agua. Las secciones de tejido pueden desparafinarse mediante diversas metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, pueden usarse xilenos y una serie descendente gradual de alcoholes (véase, *por ejemplo*, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", *anteriormente citado*). Como alternativa, pueden usarse agentes desparafinantes no orgánicos, tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

En algunas realizaciones, después de la preparación de la muestra, puede analizarse una sección de tejido usando IHC. Puede llevarse a cabo IHC en combinación con técnicas adicionales, tales como tinción morfológica y/o hibridación *in situ* de fluorescencia. Hay disponibles dos métodos de IHC generales; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana (*por ejemplo*, una proteína o fragmento de la misma codificada por cualquiera de UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R and CD79B) se determina de manera directa. Este ensayo directo usa un reactivo marcado, tal como un anticuerpo primario marcado con un marcador fluorescente o con una enzima, que puede visualizarse sin interacciones de anticuerpo adicionales. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y después un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. En los casos donde el anticuerpo secundario se conjuga a un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario empleado para inmunohistoquímica se marcará normalmente con un resto detectable. Hay disponibles numerosos marcadores que pueden agruparse generalmente en las siguientes categorías:

- (a) Radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I. El anticuerpo puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en Current Protocols in Immunology, Volúmenes 1 y 2, Coligen et al., Ed. Wiley-Interscience, Nueva York, Nueva York, pub. (1991) por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando conteo de centelleo.
- (b) Partículas de oro coloidal.

(c) Marcadores fluorescentes incluyendo, pero sin limitación, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), rojo Texas, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina, o fluoróforos disponibles comercialmente, tales como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los anteriores. Los marcadores fluorescentes pueden conjugarse al anticuerpo usando las técnicas divulgadas en *Current Protocols in Immunology*, anteriormente citado, por ejemplo. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(d) Hay disponibles diversos marcadores de sustrato enzimático y la Patente de los Estados Unidos n.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunos de estos. La enzima cataliza generalmente una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas. Por ejemplo, la enzima puede catalizar un cambio de color en un sustrato, que puede medirse espectrofotométricamente. Como alternativa, la enzima puede alterar la fluorescencia o quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen anteriormente. El sustrato quimioluminiscente se excita electrónicamente mediante una reacción química y entonces puede emitir luz que puede medirse (usando un quimioluminómetro, por ejemplo) o dona energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; la patente de los Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazindionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa, tal como peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tales como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares. Las técnicas para conjugar enzimas a anticuerpos se describen en O'Sullivan *et al.*, *Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay*, en *Methods in Enzym.* (ed. J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, Nueva York, 73:147-166 (1981).

Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

(i) peroxidasa de rábano picante (HRPO) con peroxidasa de hidrógeno como sustrato, en la que la peroxidasa de hidrógeno oxida un precursor de colorante (por ejemplo, ortogenilén diamina (OPD) o clorhidrato de 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (TMB));

(ii) fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-nitrofenilo como sustrato cromogénico; y

(iii) β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa).

Hay disponibles otras numerosas combinaciones de enzima-sustrato para los expertos en la materia. Para una revisión general de estas, véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.275.149 y 4.318.980. En ocasiones, el marcador se conjuga indirectamente con el anticuerpo. El experto en la materia será consciente de diversas técnicas para lograr esto. Por ejemplo, el anticuerpo puede conjugarse con biotina y cualquiera de las cuatro amplias categorías de marcadores mencionados anteriormente puede conjugarse con avidina, o *vice versa*. La biotina se une selectivamente a avidina y por tanto, el marcador puede conjugarse con el anticuerpo de esta manera indirecta. Como alternativa, para lograr la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo, el anticuerpo se conjuga con un pequeño hapteno y uno de los diferentes tipos de marcadores mencionados anteriormente se conjuga con un anticuerpo anti-hapteno. Por lo tanto, puede lograrse la conjugación indirecta del marcador con el anticuerpo.

Aparte de los procedimientos de preparación de muestras discutidos anteriormente, puede desearse un tratamiento adicional de la sección de tejido antes de, durante o después de la IHC. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo métodos de recuperación de epitopos, tales como el calentamiento de la muestra de tejido en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong *et al.* *Appl. Immunohistochem.* 4(3):201 (1996)).

Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y en condiciones adecuadas de tal forma que el anticuerpo primario se une al antígeno de la proteína diana en la muestra de tejido. Las condiciones adecuadas para lograr eso pueden determinarse mediante experimentación rutinaria. El alcance de la unión del anticuerpo a la muestra se determina usando cualquiera de los marcadores detectables discutidos anteriormente. Preferentemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico, tal como cromógeno de 3,3'-diaminobenzina. Preferentemente, el marcador enzimático se conjuga a anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es un anticuerpo de cabra anti-conejo).

En algunas realizaciones, los anticuerpos empleados en el análisis IHC para detectar la expresión de uno o más biomarcadores son anticuerpos generados para unirse principalmente a los uno o más biomarcadores de interés, tales como una o más proteínas codificadas por UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Los anticuerpos están fácilmente disponibles en la técnica, incluyendo de diversas fuentes comerciales, y también pueden generarse usando técnicas rutinarias conocidas en la materia.

Los especímenes preparados de este modo pueden montarse y cubrirse. Entonces se determina la evaluación del portaobjetos, *por ejemplo*, usando un microscopio, y pueden emplearse criterios de intensidad de la tinción, usados rutinariamente en la técnica. Como ejemplo, los criterios de intensidad de tinción pueden evaluarse del modo siguiente:

5

Tabla A

Patrón de tinción	Puntuación
No se observa tinción en las células.	0
Se detecta una tinción débil/casi imperceptible en más de un 10 % de las células.	1 +
Se observa una tinción de débil a moderada en más de un 10 % de las células.	2+
Se observa una tinción de moderada a fuerte en más de un 10 % de las células.	3+

10

En métodos alternativos, puede ponerse en contacto la muestra con un anticuerpo específico para dicho biomarcador en condiciones suficientes para que se forme un complejo anticuerpo-biomarcador, y después detectar dicho complejo. La presencia del biomarcador puede detectarse mediante una serie de modos, tales como procedimientos de transferencia de Western y ELISA para ensayar una gran variedad de tejidos y muestras, incluyendo plasma o suero. Hay disponible una amplia variedad de técnicas que usan dicho formato de ensayo, véase, *por ejemplo*, las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estos incluyen ensayos en un solo sitio y en dos sitios o en "sándwich" de los tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitivos tradicionales. Estos ensayos incluyen también la unión directa de un anticuerpo marcado a un biomarcador diana.

15

20

Los ensayos en sándwich se encuentran entre los ensayos más útiles y comúnmente usados. Existe una serie de variaciones de la técnica de ensayo en sándwich, y se pretende que todas estén abarcadas por la presente invención. En resumen, en un ensayo directo típico, se inmoviliza anticuerpo no marcado sobre un sustrato sólido, y la muestra que se va a ensayar se pone en contacto con la molécula unida. Después de un periodo de incubación adecuado, durante un periodo de tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo anticuerpo-antígeno, se añade un segundo anticuerpo específico para el antígeno, marcado con una molécula indicadora capaz de producir una señal detectable, y se incuba, dejando pasar un tiempo suficiente para la formación de otro complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado. Cualquier material que no haya reaccionado se elimina por lavado, y se determina la presencia del antígeno mediante la observación de una señal producida por la molécula indicadora. Los resultados pueden ser cualitativos, mediante la simple observación de la señal visible, o pueden cuantificarse comparando con una muestra de control que contiene cantidades conocidas de biomarcador.

25

30

Las variaciones del ensayo directo incluyen un ensayo simultáneo, en el que tanto la muestra como el anticuerpo marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo marcado. Estas técnicas se conocen bien por los expertos en la materia, incluyendo cualquier variación menor que será fácilmente evidente. En un ensayo en sándwich directo típico, se une covalente o pasivamente un primer anticuerpo que tiene especificidad por el biomarcador a una superficie sólida. La superficie sólida es normalmente de vidrio o de un polímero, siendo los polímeros de uso más común celulosa, poliácridamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno. Los soportes sólidos pueden estar en forma de tubos, perlas, discos o microplacas, o cualquier otra superficie adecuada para llevar a cabo un inmunoensayo. Los procesos de unión se conocen bien en la técnica y consisten generalmente en reticulación, unión covalente o adsorción física, el complejo polímero-anticuerpo se lava para preparar la muestra de ensayo. Entonces se añade una alícuota de la muestra que se va a ensayar al complejo de fase sólida y se incuba durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, 2-40 minutos o durante una noche si es más conveniente) y en las condiciones adecuadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 40°C, tal como entre 25°C y 32°C, inclusive) para permitir la unión de cualquier subunidad presente en el anticuerpo. Después del periodo de incubación, la fase sólida de la subunidad de anticuerpo se lava y seca e incuba con un segundo anticuerpo específico para una porción del biomarcador. El segundo anticuerpo se une a una molécula indicadora que se usa para indicar la unión del segundo anticuerpo al marcador molecular.

40

45

En algunas realizaciones, los métodos implican inmovilizar los biomarcadores diana en la muestra y después exponer la diana inmovilizada a un anticuerpo específico que puede estar o no marcado con una molécula indicadora. Dependiendo de la cantidad de diana y de la fuerza de la señal de la molécula indicadora, puede ser detectable una diana unida mediante marcado directo con el anticuerpo. Como alternativa, se expone un segundo anticuerpo marcado, específico para el primer anticuerpo, al complejo de diana-primer anticuerpo para formar un complejo terciario de diana-primer anticuerpo-segundo anticuerpo. El complejo se detecta por medio de la señal emitida por la molécula indicadora. Por "molécula indicadora", tal como se usa en la presente memoria descriptiva, se entiende una molécula que, debido a su naturaleza química, proporciona una señal identificable analíticamente que permite la detección de anticuerpo unido a antígeno. Las moléculas indicadoras más comúnmente usadas en este tipo de ensayo son enzimas, fluoróforos o moléculas que contienen radionúclidos (es decir, radioisótopos) y moléculas quimioluminiscentes.

50

55

En el caso de un inmunoensayo enzimático, se conjuga la enzima al segundo anticuerpo, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. Tal como se reconocerá fácilmente, sin embargo, existen una gran variedad de diferentes técnicas de conjugación, que están fácilmente disponibles para el experto en la materia. Las enzimas usadas comúnmente incluyen peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, galactosidasa y fosfatasa alcalina, entre otras.

Los sustratos para su uso con las enzimas específicas se seleccionan generalmente para la producción, tras la hidrólisis por la enzima correspondiente, de un cambio de color detectable. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen fosfatasa alcalina y peroxidasa. También es posible emplear sustratos fluorogénicos, que proporcionan un producto fluorescente en lugar de los sustratos cromogénicos indicados anteriormente. En todos los casos, el anticuerpo marcado con enzima se añade al primer complejo de anticuerpo-marcador molecular, se deja unir, y después se elimina por lavado el exceso de reactivo. Entonces se añade una solución que contiene el sustrato adecuado al complejo de anticuerpo-antígeno-anticuerpo. El sustrato reaccionará con la enzima unida al segundo anticuerpo, proporcionando una señal visual cualitativa, que puede además cuantificarse, normalmente espectrofotométricamente, para proporcionar una indicación de la cantidad de biomarcador que estaba presente en la muestra. Como alternativa, pueden acoplarse compuestos fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, a los anticuerpos sin alterar su capacidad de unión. Cuando se activan mediante iluminación con luz de una longitud de onda determinada, el anticuerpo marcado con fluorocromo adsorbe la energía lumínica, induciendo un estado de excitabilidad en la molécula, seguido de la emisión de la luz con un color característico detectable visualmente usando un microscopio óptico. Como en el EIA, se deja unir el anticuerpo marcado fluorescente al primer complejo de anticuerpo-marcador molecular. Después de eliminar por lavado el reactivo no unido, se expone el complejo terciario restante a luz de una longitud de onda adecuada, indicando la fluorescencia observada la presencia del marcador molecular de interés. Las técnicas de inmunofluorescencia y de EIA están bien establecidas en la técnica. Sin embargo, también pueden emplearse otras moléculas indicadoras, tales como radioisótopos, moléculas quimioluminiscentes o bioluminiscentes.

En algunas realizaciones, la expresión de un biomarcador seleccionado en una muestra de tejidos o de células puede examinarse mediante ensayos funcionales o basados en la actividad. Por ejemplo, si el biomarcador es una enzima, se pueden llevar a cabo ensayos conocidos en la técnica para determinar o detectar la presencia de la actividad enzimática concreta en la muestra de tejido o de células.

En cualquiera de los métodos anteriores para evaluar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores, puede obtenerse una muestra que comprende una molécula diana mediante métodos bien conocidos en la técnica, y que son adecuados para el tipo y la ubicación particular de la enfermedad de interés. A menudo se usa la biopsia de tejido para obtener una pieza representativa del tejido enfermo. Como alternativa, pueden obtenerse células de manera indirecta en forma de tejidos/fluidos que se sabe o se considera que contienen las células enfermas de interés. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de lesiones de la enfermedad mediante resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, raspado bronquial, o de esputo, fluido pleural o sangre. Los genes o productos génicos pueden detectarse a partir de tejido enfermo o de otras muestras corporales, tales como orina, esputo o suero. Pueden aplicarse las mismas técnicas discutidas anteriormente para la detección de genes diana o de productos génicos en muestras de enfermedades a otras muestras corporales. Al explorar dichas muestras corporales, puede lograrse un diagnóstico temprano simple para estas enfermedades. Además, puede controlarse el progreso de la terapia fácilmente ensayando dichas muestras corporales respecto de genes diana o productos génicos.

Los medios para enriquecer una preparación de tejido respecto de células enfermas se conocen en la técnica. Por ejemplo, el tejido puede aislarse a partir de parafina o secciones criostáticas. Las células de interés también pueden separarse de las células normales mediante citometría de flujo o microdissección de captura láser. Estas, así como otras técnicas para separar las células enfermas de las normales, se conocen bien en la técnica. Si el tejido enfermo está altamente contaminado por células normales, puede ser más difícil la detección del perfil de la firma de expresión génica, aunque se conocen técnicas para minimizar la contaminación y/o los resultados falsos positivos/negativos, algunos de los cuales se describen más adelante en el presente documento. Por ejemplo, también puede evaluarse una muestra respecto de la presencia de un biomarcador (incluyendo una mutación) que se sabe que está asociado con una célula enferma de interés pero no con una célula normal correspondiente, o viceversa.

Después de la determinación de que la muestra de tejido o de células expresa uno o más de los biomarcadores que indican que la muestra de tejido o de células será sensible al tratamiento con anticuerpos anti-CD40, se contempla que puede administrarse una cantidad eficaz del anticuerpo anti-CD40 al mamífero, tal como un ser humano, para tratar un trastorno, tal como un linfoma de células B que afecta al mamífero. El diagnóstico en mamíferos, tales como seres humanos, de las diversas patologías descritas en el presente documento puede efectuarse por un médico experto.

Comparación de los niveles de expresión y predicción, evaluación o ayuda a la evaluación de la sensibilidad del linfoma de células B a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40

Los métodos descritos en el presente documento comprenden un proceso de comparar un nivel de expresión medido de un gen marcador y un nivel de referencia. El nivel de referencia puede ser un nivel de expresión medido de un gen de referencia distinto al gen marcador o un nivel de expresión medido del mismo gen marcador en una muestra diferente.

En algunas realizaciones, se compara un nivel de expresión medido de un gen marcador en una muestra de linfoma de células B con un nivel de expresión medido de un gen de referencia en la muestra. En algunas realizaciones, el nivel de expresión del gen de referencia no cambia sustancialmente entre diversos tipos de células de linfoma de células B, incluyendo células sensibles y resistentes a un anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, se calcula la relación del nivel de expresión medido del gen marcador con el nivel de expresión medido del gen de referencia, y puede usarse la relación para evaluar o ayudar en la evaluación de la sensibilidad del linfoma de células B a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40.

En algunas realizaciones, se compara un nivel de expresión medido de un gen marcador en una muestra de linfoma de células B con un nivel de expresión medido del gen marcador en una muestra de referencia. En algunas realizaciones, la muestra de referencia comprende células de linfoma de células B que son resistentes o que no responden a un anticuerpo anti-CD40. Por ejemplo, se lleva a cabo la comparación para determinar la magnitud de la diferencia entre los niveles de expresión medidos del gen marcador en la muestra del sujeto y en la muestra de referencia (por ejemplo, comparar el múltiplo o porcentaje de diferencia entre los niveles de expresión del gen marcador en la muestra del sujeto y la muestra de referencia). En algunas realizaciones, una expresión aumentada o reducida de un gen marcador en la muestra del sujeto en comparación con la expresión del gen marcador en la muestra de referencia que comprende células de linfoma de células B que son resistentes o que no responden a un anticuerpo anti-CD40 sugiere o indica la sensibilidad del linfoma de células B al tratamiento con un anticuerpo anti-CD40. En algunas realizaciones, un aumento múltiplo en el nivel de expresión de la muestra del sujeto puede ser de al menos aproximadamente cualquiera de 1,5X, 1.75X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, o 10X el nivel de expresión de la muestra de referencia. En algunas realizaciones, una reducción múltiplo en el nivel de expresión de la muestra del sujeto puede ser menor de aproximadamente cualquiera de 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8 el nivel de expresión de la muestra de referencia.

En algunas realizaciones, los niveles de expresión de uno o más genes marcadores seleccionados entre el grupo que consiste en IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1, y PUS7 se comparan con un nivel de referencia.

En algunas realizaciones, un nivel de expresión aumentado de uno o más de IFITM1, CD79B, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, y PUS7 en comparación con un nivel de referencia indica que dicho sujeto tiene menos probabilidades de responder a un tratamiento con anticuerpo agonista anti-CD40. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un valor o un intervalo determinado mediante los niveles de expresión del gen marcador correspondiente en muestras que comprenden células de linfoma de células B de sujetos que tienen un volumen tumoral aumentado después de un tratamiento con anticuerpo agonista anti-CD40.

En algunas realizaciones, un nivel de expresión aumentado de uno o más de CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD22, BTG2, y UAP1 en comparación con un nivel de referencia indica que dicho sujeto tiene probabilidades de responder al tratamiento con anticuerpo agonista anti-CD40. En algunas realizaciones, el nivel de referencia es un valor o un intervalo determinado mediante los niveles de expresión del gen marcador correspondiente en muestras que comprenden células de linfoma de células B de sujetos que tienen un volumen tumoral reducido después de un tratamiento con anticuerpo agonista anti-CD40.

En algunas realizaciones, se mide el nivel de expresión de BCL6 y se compara con un nivel de referencia. El nivel de expresión de BCL6 se usa para la predicción, evaluación, o ayuda a la evaluación de la sensibilidad del sujeto a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40. Tal como se muestra en el ejemplo 1, la expresión de BCL6 tiende a ser menor en aquellos sujetos con aumentos del tumor después de un tratamiento con anticuerpo agonista anti-CD40. En algunas realizaciones, un nivel de expresión aumentado de BCL6 en comparación con un nivel de referencia determinado mediante el nivel de expresión de BCL6 en muestras de sujetos que tienen un volumen tumoral reducido después de un tratamiento con anticuerpo agonista anti-CD40 puede indicar que el sujeto tiene probabilidades de responder al tratamiento con anticuerpo agonista anti-CD40.

En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de uno o más de IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1, PUS7 y BCL6, y se calcula un índice de sensibilidad basándose en el nivel de expresión medido de los genes marcadores. Por ejemplo, puede usarse la siguiente ecuación para determinar el índice de sensibilidad (SI):

$$SI = \sum_{j=1}^p \beta_j \frac{x_j - \hat{\mu}_j}{\sqrt{\hat{\sigma}_j^2}}$$

en la que se mide el nivel de expresión de al menos un gen marcador que tiene un valor de correlación positiva y al menos un gen marcador que tiene un valor de correlación negativa mostrado en la tabla 4; en la que (i) β_j es el valor de coeficiente para cada gen marcador medido; (ii) p es el número de genes marcadores medidos; (iii) x_j es el nivel de expresión transformado normalizado para la muestra del sujeto por el nivel de expresión de cada marcador medido; e (iv) μ_j y σ_j son las medias y las desviaciones estándar para cada gen marcador medido; en la que β_j , μ_j y σ_j se

determinan a partir de muestras de pacientes que comprenden células de linfoma de células B de un ensayo clínico. En algunas realizaciones, un valor igual o mayor de cero para el índice de sensibilidad indica que el sujeto tiene probabilidades de responder al tratamiento con anticuerpo anti-CD40, o en el que un valor menor de cero para el índice de sensibilidad indica que el sujeto tiene menos probabilidades de responder al tratamiento con anticuerpo anti-CD40.

El ejemplo 1 describe en detalle cómo analizar y determinar parámetros para las muestras de referencia y muestras nuevas. En algunas realizaciones, se miden los niveles de expresión de IFITM1, RGS13, CD79B, CD22, BTG2, CD44, EPDR1, y UAP y se usan para el cálculo del índice de sensibilidad. En algunas realizaciones, se miden números iguales de genes marcadores correlacionados positivamente y genes marcadores correlacionados negativamente y se usan para el cálculo del índice de sensibilidad.

Se conocen en la técnica métodos para determinar el índice de sensibilidad. Véase Zhou H. y Hastie T. (2005) Regularization and variable selection via the elastic net; J. R. Statist. Soc. B. 67(2). págs. 301-320; Friedman J., Hastie T. y Tibshirani R. 2008. Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. Technical Report, Department of Statistics, Stanford University (World Wide Web-stat.stanford.edu/~hastie/Papers/glmnet.pdf) R package glmnet; R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL World Wide Web en R-project.org.

En el ejemplo 2 se describe un método alternativo que usa K-vecinos más próximos ponderados (WKNN) para clasificar una muestra de paciente como sensible a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40. La qRT-PCR se usa para medir la expresión de 15 genes, UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. La reducción del tamaño tumoral de al menos el 10 % se define como sensible al tratamiento con anticuerpo anti-CD40. Las ponderaciones para los 15 genes se determinan usando regresión penalizada (GLMNET).

Tal como se define en las reivindicaciones, los métodos de la invención comprenden clasificar al sujeto como sujeto sensible o no sensible usando un análisis de K-vecinos más próximos basado en el nivel de expresión de diversos genes marcadores de UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B en la muestra del sujeto y las muestras de referencia con clases conocidas. En algunas realizaciones, la clasificación del sujeto usando un análisis de K-vecinos más próximos se lleva a cabo (1) determinando el parámetro K (es decir, el número de vecinos más próximos); (2) calculando la diferencia entre el nivel de expresión medido de los genes marcadores en la nueva muestra que se va a clasificar y el nivel de expresión de los genes marcadores respectivos en cada muestra de referencia; (3) determinando las muestras de referencia más próximas seleccionando aquellas muestras con la menor media ponderada de las diferencias absolutas (WAAD) entre la nueva muestra y la muestra de referencia; y (4) determinando la clase de nueva muestra basándose en las clases conocidas de las K muestras de referencia más próximas. Las ponderaciones y/o el parámetro K se determinan usando validación cruzada con muestras de ensayos clínicos con clases conocidas. Por ejemplo, puede usarse validación cruzada de 5 veces (tal como de 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces) hasta de N veces para minimizar el error de clasificación de K-vecinos más próximos, en el que N es el tamaño de las muestras. En algunas realizaciones, K es un número entero entre 4 y 13 (por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, y 13). En algunas realizaciones, las muestras de referencia más próximas (vecinos más próximos) son aquellas con la menor media ponderada de las diferencias absolutas (WADD) entre el nivel de expresión de la nueva muestra que se va a clasificar y el nivel de expresión de cada muestra de referencia para cada uno de los 15 genes marcadores UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. En algunas realizaciones, las ponderaciones para la WAAD son los valores absolutos de los coeficientes de una regresión penalizada de red elástica del encogimiento de la muestra tumoral de referencia en los niveles de expresión de los 15 genes marcadores. En algunas realizaciones, la magnitud de la penalización se selecciona mediante validación cruzada de 10 veces para minimizar el error de clasificación de WKNN. Las ponderaciones para los 15 genes pueden determinarse usando regresión penalizada (GLMNET). En algunas realizaciones, se usa qRT-PCR para medir los niveles de expresión de los 15 genes, UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. En algunas realizaciones, las K muestras de referencia más próximas contribuyen a la inversa de su WADD (es decir, 1 dividido entre la WAAD) a modo de un voto para su marcador de clase conocido, y se asigna el marcador de clase con las contribuciones totales mayores de la inversa de WAAD a la nueva muestra. En algunas realizaciones, se considera que un paciente es sensible a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40 si el paciente tiene una reducción del tamaño tumoral de al menos el 10 % después del tratamiento con anticuerpo anti-CD40. La reducción del tamaño tumoral puede determinarse mediante la suma del producto de los diámetros (SPD). El ejemplo 2 proporciona una descripción detallada del uso del método de K-vecinos más próximos ponderado con 39 muestras de paciente de DLBCL como muestras de referencia.

Las comparaciones y/o cálculos para predecir, evaluar o ayudar en la evaluación pueden llevarse a cabo de cualquier modo conveniente adecuado para el tipo de valor medido y/o valor de referencia para los marcadores génicos en cuestión. El proceso de comparación o cálculo puede ser manual o puede ser automático (tal como por una máquina, incluyendo una máquina informatizada). En algunas realizaciones, los niveles de expresión medidos son valores normalizados. Por ejemplo, puede normalizarse el nivel de expresión basándose en la ecuación de Valores de ensayo transformados normalizados descrita en el ejemplo 1. Tal como será evidente para los expertos en la materia, pueden tomarse medidas repetidas para los niveles de expresión de genes marcadores y/o genes de referencia. En algunas realizaciones, las mediciones repetidas tienen en cuenta los valores medidos. Las mediciones repetidas pueden

tenerse en cuenta usando la media o la mediana de los valores medidos como el "valor medido". Puede usarse análisis estadístico conocido en la técnica para verificar la significación de la diferencia entre los dos valores comparados.

Tratamiento con anticuerpo anti-CD40

Los genes marcadores identificados en la invención pueden usarse para la predicción, evaluación, o ayuda a la evaluación de la sensibilidad del linfoma de células B al tratamiento con uno o más anticuerpos anti-CD40. Los anticuerpos anti-CD40 pueden ser uno o más anticuerpos agonistas (es decir, que se unen y estimulan a CD40). Los anticuerpos estimuladores pueden ser de diferentes tipos, tales como: (1) aquellos que proporcionan una señal estimuladora a través de CD40 pero que no aumentan la interacción entre CD40 y CD40L (por ejemplo, el anticuerpo G28-5 y los anticuerpos derivados a partir de G28-5 descritos en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.182.368; y el documento PCT WO 96/18413), o reducen la interacción entre CD40 y CD40L (por ejemplo, los anticuerpos HuCD40-M2 y HuCD40-M3 y los anticuerpos humanizados descritos en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.674.492; y (2) aquellos que proporcionan una señal estimuladora a través de CD40 y pueden aumentar la interacción entre CD40 y CD40L, por ejemplo, S2C6 (Francisco et al., 2000, Cancer Res. 60:3225-31) y los anticuerpos derivados a partir de S2C6. También se describen anticuerpos agonistas en la Patente de los Estados Unidos n.º 7.288.251. Los anticuerpos anti-CD40 pueden ser uno o más anticuerpos antagonistas (es decir, se unen a CD40 e inhiben las actividades inducidas por CD40L). Los ejemplos de anticuerpos antagonistas anti-CD40 incluyen el anticuerpo humano CHIR-12.12 descrito en la Publicación de Estados Unidos n.º 2007/0110754, y los anticuerpos anti-CD40 descritos en el documento WO 97/31025. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de SEQ ID NO: 2.

Tal como se define en las reivindicaciones, la invención proporciona además un anticuerpo anti-CD40 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un linfoma de células B después de que se haya identificado al sujeto como candidato para el tratamiento basándose en los ensayos/métodos descritos en el presente documento. Pueden administrarse uno o más anticuerpos anti-CD40. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se administra conjuntamente con otros uno o más agentes terapéuticos. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD40 se administra conjuntamente con uno o más de los siguientes agentes terapéuticos: rituximab, gemzar, e ICE. Por ejemplo, puede administrarse un anticuerpo anti-CD40 al paciente conjuntamente con terapia con rituximab; con rituximab más gemzar; con rituximab más ICE (ifosfamida, carboplatino, etopósido) (R-ICE); o con rituximab más quimioterapia.

Tal como se usa en el presente documento, la administración "conjuntamente con" incluye la administración simultánea y/o la administración en distintos momentos. La administración conjuntamente con también abarca la administración en forma de formulación conjunta (es decir, están presentes diferentes fármacos en la misma composición) o la administración en forma de composiciones separadas, la administración con diferentes frecuencias o intervalos de dosificación, y la administración usando la misma ruta o diferentes rutas.

Los anticuerpos anti-CD40 o sus fragmentos funcionales pueden usarse para el tratamiento de pacientes con NHL que no responden o que tienen una respuesta inadecuada al tratamiento con uno cualquiera de los siguientes fármacos: rituximab (Genentech); ocrelizumab (Genentech, Inc.); ibritumomab tiuxetano (Zevalin™, Biogen Idec); tositumomab (Bexxar™, GlaxoSmithKline); HuMAX-CD20™ (GenMab); IMMU-106 (que es un anticuerpo anti-CD20 humanizado también conocido como hA20 o 90Y-hLL2, Immunomedics); AME-133 (Applied Molecular Evolution/Eli Lilly); gentuzumab ozogamicina (Mylotarg™, un anticuerpo anti-CD33 humanizado, Wyeth/PDL); alemtuzumab (Campath™, un anticuerpo anti-CD52, Schering Plough/Genzyme); epratuzumab (IMMU103™, un anticuerpo anti-CD22 humanizado, Immunomedics), o que tengan una recidiva después del tratamiento con estos fármacos.

Las siguientes referencias describen linfomas y CLL, sus diagnósticos, tratamientos y procedimientos médicos estándar para medir la eficacia del tratamiento. Canellos GP, Lister, TA, Sklar JL: The Lymphomas. W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1998; van Besien K y Cabanillas, F: Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma, Cap. 70, págs. 1293-1338, en: Hematology, Basic Principles and Practice, 3ª ed. Hoffman et al. (editores). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000; y Rai, K y Patel, D: Chronic Lymphocytic Leukemia, Cap. 72, págs. 1350-1362, en: Hematology, Basic Principles and Practice, 3ª ed. Hoffman et al. (editores). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000.

Los anticuerpos anti-CD40 para su uso en el tratamiento incluyen anticuerpos quiméricos, humanizados y humanos. Puede usarse en el tratamiento cualquier anticuerpo agonista o antagonista descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse los anticuerpos humanizados anti-CD40 descritos en el documento WO 2006/128103 para el tratamiento con anticuerpo anti-CD40, y sets anticuerpos y sus secuencias de aminoácidos se incorporan al presente documento por referencia. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 para su uso en el tratamiento descrito en el presente documento se une a CD40 (tal como CD40 humano) expresado en células de linfoma de células B e induce la apoptosis de las células de linfoma de células B. El anticuerpo anti-CD40 también puede tener la característica de eliminación de células de linfoma de células B *in vivo* a través de funciones efectoras inmunitarias, tales como ADCC, CDC, y/o ADCCP. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se une a CD40 con un valor de K_d de no más de aproximadamente 1×10^{-8} o no mayor de 1×10^{-9} . En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 se une a CD40 y estimula a CD40 (es decir, un anticuerpo agonista). En algunas realizaciones, el

anticuerpo anti-CD40 aumenta la unión del ligando de CD40 a CD40, por ejemplo, en al menos un 45 %, en al menos un 50 %, en al menos un 60 %, o en al menos un 75 %. Se divulga un método para determinar los aumentos en la unión del ligando de CD40 a CD40 en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.838.261. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 es un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal murino S2C6 descrito en el documento WO 00/75348 (incluyendo los anticuerpos proporcionados en las tablas 3 y 4 del documento WO 00/75348). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-CD40 comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 2, por ejemplo, Ab.1 anti-CD40.

10 D. Kits

También se divulgan kits o artículos de fabricación para su uso en las aplicaciones descritas o sugeridas anteriormente. Dichos kits pueden comprender al menos un reactivo específico para detectar el nivel de expresión de un gen marcador descrito en el presente documento, y puede incluir además instrucciones para llevar a cabo un método descrito en el presente documento.

Se divulgan composiciones y kits que comprenden cebadores y pares de cebadores, que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que se hibridan de manera selectiva o específica a moléculas de ácido nucleico de la invención o a cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden marcarse con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, un quelante de metales o una enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos, tales como los polinucleótidos correspondientes a los genes UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B, en una muestra y como medio para detectar células que expresan proteínas codificadas por los polinucleótidos correspondientes a los genes UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. Tal como entenderá el experto en la materia, pueden prepararse una gran cantidad de cebadores y sondas diferentes basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento y usarse de manera eficaz para amplificar, clonar y/o determinar la presencia y/o los niveles de los ARNm.

En algunas realizaciones, los kits comprenden reactivos para detectar el nivel de expresión de al menos dos, al menos tres, al menos cinco, al menos diez, o quince genes marcadores seleccionados entre el grupo que consiste en UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. Los kits también pueden comprender muestras de referencia que son útiles para generar valores de referencia. Los genes marcadores incluyen, pero sin limitación, UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B. Los reactivos para detectar el nivel de expresión de ARNm de un gen marcador pueden comprender al menos un par de cebadores específicos para amplificar los productos de ARNm de un gen marcador. En algunas realizaciones, el par de cebadores puede dirigirse al extremo 3' de la secuencia de ARNm (*por ejemplo*, dirigirse al ARNm en el 3' UTR que normalmente se comparte con todas las variantes de transcrito). En algunas realizaciones, los kits pueden comprender además una superficie o sustrato (tal como una micromatriz) para las sondas de captura para la detección de los ácidos nucleicos amplificados.

En algunas realizaciones, los kits comprenden al menos un par de cebadores y una sonda específica para detectar el nivel de expresión de un gen marcador usando qRT-PCR. Los ejemplos de conjuntos de cebadores y sondas que pueden usarse en la qRT-PCR se muestran en la tabla 1. Para detectar IFITM1, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 27, 28 y 29, las SEQ ID NO: 60, 61, y 62, y las SEQ ID NO: 93, 94, y 95. Para detectar CD40, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 24, 25, y 26, las SEQ ID NO: 57, 58, y 59, las SEQ ID NO: 90, 91 y 92. Para detectar RGS13, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 114, 115, y 116, y las SEQ ID NO: 126, 127, y 128. Para detectar VNN2, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 30, 31, y 32, las SEQ ID NO: 63, 64, y 65, y las SEQ ID NO: 96, 97, y 98. Para detectar LMO2, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 12, 13, y 14, las SEQ ID NO: 45, 46, y 47, y las SEQ ID NO: 78, 79, y 80. Para detectar CD79B, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 141, 142, y 143, las SEQ ID NO: 150, 151, y 152, y las SEQ ID NO: 159, 160, y 161. Para detectar CD22, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 15, 16, y 17, las SEQ ID NO: 48, 49, y 50, y las SEQ ID NO: 81, 82, y 83. Para detectar BTG2, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 9, 10, y 11, las SEQ ID NO: 42, 43, y 44, y las SEQ ID NO: 75, 76, y 77. Para detectar IGF1R, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 6, 7, y 8, las SEQ ID NO: 39, 40, y 41, y las SEQ ID NO: 72, 73, y 74. Para detectar CD44, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 174, 175, y 176, las SEQ ID NO: 180, 181, y 182, y las SEQ ID NO: 186, 187, y 188. Para detectar CTSC, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 165, 166, y 167, las SEQ ID NO: 168, 169, y 170, y las SEQ ID NO: 171, 172, y 173. Para detectar EPDR1, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 21, 22, y 23, las SEQ ID NO: 54, 55, y 56, las SEQ ID NO: 87, 88, y 89, las SEQ ID NO: 129, 130, y 131, las SEQ ID NO: 132, 133, y 134, las SEQ ID NO: 135, 136, y 137. Para detectar UAP1, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 138, 139, y 140, las SEQ ID NO: 147, 148, y 149, y las SEQ ID NO: 156, 157, y 158. Para detectar PUS7, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID

NO: 177, 178, y 179, las SEQ ID NO: 183, 184, y 185, y las SEQ ID NO: 189, 190, y 191. Para detectar BCL6, pueden usarse los conjuntos de cebadores y sonda mostrados en las SEQ ID NO: 102, 103, y 104, y las SEQ ID NO: 108, 109, y 110.

- 5 Los reactivos para detectar el nivel de expresión de proteína de un gen marcador pueden comprender un anticuerpo que se une específicamente a la proteína codificada por el gen marcador.

10 Los kits pueden comprender además medios de transporte que están separados en compartimentos para recibir en confinamiento cerrado uno o más medios de envase, tales como viales, tubos, y similares, comprendiendo cada uno de los medios de envase uno de los elementos separados para su uso en el método. Por ejemplo, uno de los medios de envase pueden comprender una sonda que está o puede estar marcada de manera detectable. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para un gen marcador. En los casos donde el kit utiliza hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener envases que contienen nucleótidos para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y/o un envase que comprende un medio indicador, tal como una proteína de unión a biotina, tal como avidina o estreptavidina, unida a una molécula indicadora, tal como un marcador enzimático, fluorescente o un radioisótopo.

20 El kit comprenderá normalmente el envase descrito anteriormente y otros uno o más envases que comprenden materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones de uso. Puede estar presente una etiqueta en el envase para indicar que la composición se usa para una terapia específica o una aplicación no terapéutica, y también puede indicar instrucciones para su uso *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas anteriormente.

25 El kit puede comprender además un conjunto de instrucciones y materiales para preparar una muestra de tejido o de células y preparar ácidos nucleicos (tales como ARNm) a partir de la muestra.

Se divulgan diversas composiciones adecuadas para su uso en la ejecución de los métodos de la invención, que pueden usarse en kits. Por ejemplo, pueden usarse superficies, tales como matrices, en dichos métodos.

30 Se conocen bien en la técnica varias técnicas para unir ácidos nucleicos a un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio. Un método es incorporar bases modificadas o análogos que contienen un resto que es capaz de unirse a un sustrato sólido, tal como un grupo amina, un derivado de un grupo amina u otro grupo con una carga positiva, en moléculas de ácido nucleico que se sintetizan. Entonces se pone en contacto el producto sintetizado con un sustrato sólido, tal como un portaobjetos de vidrio, que se recubre con un aldehído u otro grupo reactivo que formará un enlace covalente con el grupo reactivo que se encuentra en el producto amplificado y queda unido covalentemente al portaobjetos de vidrio. Otros métodos, tales como aquellos que usan química de superficie de aminopropil sílice, se conocen en la técnica, tal como se divulga en la world wide web en cmt.coming.com y cmgm.stanford.edu/pbrown1.

40 La unión de grupos a oligonucleótidos que podrían convertirse posteriormente a grupos reactivos también es posible usando métodos conocidos en la técnica. Cualquier unión a los nucleótidos de los oligonucleótidos se convertirá en parte del oligonucleótido, que después podría unirse a la superficie sólida de la micromatriz. Los aminoácidos amplificados pueden modificarse adicionalmente, tal como mediante la escisión en fragmentos o mediante la unión de marcadores detectables, antes de o después de la unión al sustrato sólido, según sea necesario o se permita por las técnicas usadas.

45 Lo siguiente son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica otras varias realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplos

50 **Ejemplo 1. Identificación de marcadores asociados con la sensibilidad al tratamiento con Ab.1 anti-CD40 en ensayos clínicos**

Ensayo clínico 001 (Fase II)

55 Un estudio sin enmascaramiento, multicéntrico de fase II para determinar la tasa de respuesta general y el perfil de toxicidad de Ab.1 anti-CD40 en pacientes con DLBCL recidivante. Las muestras tumorales se evaluaron por un laboratorio central para la confirmación patológica y la expresión de CD40. Los pacientes elegibles tenían DLBCL *de novo* o transformado en el momento del diagnóstico y se excluyeron en caso de que hubiese antecedentes de linfoma indolente. La terapia previa requerida consistía en quimioterapia combinada con rituximab y, en caso de que sea adecuado, trasplante de células madre autólogas. Los pacientes reciben 6 infusiones IV de Ab.1 anti-CD40 durante 5 semanas (ciclo 1) con dosis de carga intra-paciente (1 mg/kg en el día 1; 2 mg/kg en el día 4; 4 mg/kg en el día 8) y 8 mg/kg/semana posteriormente. Los pacientes que responden y aquellos con SD (enfermedad estable) fueron elegibles para continuar la terapia hasta la progresión de la enfermedad o hasta un máximo de 12 ciclos. Se extrajeron tejidos tumorales de los pacientes antes de recibir el tratamiento con Ab.1 anti-CD40. Por ejemplo, se tomaron muestras como parte rutinaria del diagnóstico del linfoma.

El Ab.1 anti-CD40 es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado contra CD40. Se produce en y se secreta por una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) modificada genéticamente. El Ab.1 anti-CD40 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

- 5 *Cadena pesada* (SEQ ID NO: 1). El resto en cursiva y subrayado ASN 294 identifica la localización del resto de carbohidrato.

EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGYSFT	GYIHWVRQA	PGKGLEWVAR	50
VIPNAGGTSY	NQKFKGRFTL	SVDNSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCAREG	100
IYWWGQGTLV	TVSSASTKGP	SVFPLAPSSK	STSGGTAALG	CLVKDYFPEP	150
VTVSWNSGAL	TSGVHTFPAV	LQSSGLYSL	SVVTPSSSL	GTQTYICNVN	200
HKPSNTKVDK	KVEPKSCDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	250
SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	300
SVLTVLHQDW	LNGKEYCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	350
SREEMTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	400
FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMEALH	NHYTQKSLSL	SPG	443

- 10 *Cadena ligera* (SEQ ID NO: 2).

DIQMTQSPSS	LSASVGDRTV	ITCRSSQSLV	HSNGNTFLHW	YQQKPGKAPK	50
LLIYTVSNRF	SGVPSRFSGS	GGGTDFTLTI	SSLQPEDFAT	YFCSQTTHVP	100
WTFGQGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	150
VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKSTYSL	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	200
VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC				219

Ensayo clínico 002 (Fase I)

- 15 Se llevó a cabo un estudio de fase I multidoses en múltiples instituciones para evaluar la seguridad, propiedades farmacocinéticas, inmunogenicidad y actividad antitumoral de Ab.1 anti-CD40 por vía intravenosa en pacientes con NHL recidivante. Se reclutaron para este estudio pacientes con múltiples subtipos histológicos de NHL, incluyendo linfoma difuso de células B grandes (DLBCL; 14), folicular (FCL; 9), de células del manto (MCL; 9), de zona marginal (MZL; 2) y linfocítico de células pequeñas (SLL; 1). Se trató a los pacientes con una pauta de dosis de carga: 1 mg/kg
- 20 de Ab.1 anti-CD40 en el día 1 y el día 4 y posterior escalada de la dosis intra.paciente durante las semanas 2-5 hasta una dosis máxima de 3, 4, 6, u 8 mg/kg en cuatro cohortes. Posteriormente, se ensayó una pauta de dosis de carga rápida en una cohorte (aumento del 40 % en el Ab.1 anti-CD40 total administrado durante el ciclo 1). Los pacientes que responden o aquellos con enfermedad estable fueron elegibles para un segundo ciclo, que consistía en cuatro infusiones semanales consecutivas a la dosis máxima específica de cohorte de Ab.1 anti-CD40. Ocho pacientes con
- 25 DLBCL completaron el ciclo 1 y recibieron una dosis máxima de al menos 3 mg/kg de Ab.1 anti-CD40 con una tasa de respuesta objetiva del 37,5 % (es decir, 1 CR y 2 PR) y 2 SD. Se observaron respuestas objetivas adicionales en un paciente con MCL (CR) y un paciente con MZL (PR). La mediana de la duración de la respuesta para estos 5 pacientes no se ha alcanzado (intervalo de 8-37 semanas). Se extrajeron tejidos tumorales de los pacientes antes de recibir el tratamiento con Ab.1 anti-CD40. Por ejemplo, se tomaron muestras como parte rutinaria del diagnóstico del linfoma.

- 30 *Preparación de muestras clínicas y qRT-PCR*

- Se obtuvieron tejidos tumorales de archivo fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE) de los ensayos clínicos de Fase I y de Fase II descritos anteriormente de los centros de investigación clínica con la aprobación apropiada del
- 35 IRB y consentimiento por parte del paciente. Se montaron secciones de 4-6 micrómetros procedentes del tejido tumoral sobre portaobjetos de vidrio y se sometió un portaobjetos para cada caso a tinción de H&E usando un protocolo de laboratorio de patología convencional. Un patólogo certificado por la junta marcó el portaobjetos de H&E respecto del contenido tumoral y se usó como guía para macrodisecar el resto de la región que contenía tumor para la extracción de ARN usando el kit de aislamiento de ácidos nucleicos totales Ambion RecoverAll™ para tejidos
- 40 FFPE (n.º de Cat. AM1975; Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX).

- Se retrotranscribieron un total de 450 ng de ARN en un volumen total de reactivo de 20 µl usando el kit de síntesis de retrotranscripción de ADNC de alta capacidad de Applied Biosystems (n.º de Cat. 4368814; Applied Biosystems, Foster City, CA). Se siguieron las recomendaciones del fabricante salvo por una reacción de RT acortada de 60min a 37 °C.
- 45 Se mezclaron 5 ng de producto de ADNC equivalente de ARN total (asumiendo una eficacia de síntesis de ADNC del 100 %) con Universal Master Mix 2X de Applied Biosystems (sin UNG) en un volumen de 15 µl para cada pocillo de ensayo de PCR. Todas las amplificaciones se realizaron por triplicado en placas de 384 pocillos usando un procedimiento de amplificación PCR en 2 etapas (95 °C, 15 segundos, 60 °C, 1 min). Las reacciones se llevaron a cabo hasta 40 ciclos en un sistema de PCR en tiempo real validado ABI 7900. Las secuencias de los cebadores y sondas

usados se muestran en la tabla 1

Tabla 1. Cebadores y sondas

Gen Locus	N.º de referencia de GenBank.	Sonda Solape	Cebador directo	Cebador inverso	Sonda
PRKCA	NM_002737.2	1	TGACAAATGTAGAGGCCATTCA (SEQ ID NO: 3)	CATCCGTCTCCTCTGCGATATAA (SEQ ID NO: 4)	CCGTCAACACACCATTT (SEQ ID NO: 5)
IGFIR	NM_000875.3	1	TTGCAAGGAAAGAAATTCAAACAC (SEQ ID NO: 6)	TGCTTGAATCCATTGACTGCTT (SEQ ID NO: 7)	ACAACAGCAGTAAGAAGA (SEQ ID NO: 8)
BTG2	NM_006763.2	1	CAGGTCCTGCCTTTTITAGAAG (SEQ ID NO: 9)	ATCATAAAGAGAGAGACAGATTAAAG (SEQ ID NO: 10)	AGCCTCATGGTCTCAT (SEQ ID NO: 11)
LMO 2	NM_005574.2	1	GGCACAGCCCATCCA (SEQ ID NO: 12)	CTGCCCTAAATGTTCCCTTTCT (SEQ ID NO: 13)	AGTAACGTACATGATTAGC (SEQ ID NO: 14)
CD22	NM_001771.2	1	TTTGGAGGTGAGGCATTGCA (SEQ ID NO: 15)	CCGGAGTCCCCAGAGTCAA (SEQ ID NO: 16)	AGACGTACGTATCAGCG (SEQ ID NO: 17)
SMNI	NM_000344.2	1	CTGGAATGTGAAGCGTTATAGAAGAT (SEQ ID NO: 18)	CCCTTTTCTTTCCCAACACTTGA (SEQ ID NO: 19)	CTGGCCTCATTTCT (SEQ ID NO: 20)
EPDRI	NM_017549.3	1	CAGCCTCTCTTGTCCCTGGTT (SEQ ID NO: 21)	TCCCTAGCAATGGACAAACTCA (SEQ ID NO: 22)	CCTTATGTGTTGAATGTGG (SEQ ID NO: 23)
CD40	NM_001250.4	1	GGGATCCTGTTTGCCATCCT (SEQ ID NO: 24)	GCTTCTTGCCACCTTTTGTG (SEQ ID NO: 25)	TTGGTCTGGTCTTT (SEQ ID NO: 26)
IFITM1	NM_003641.3	1	GGCTTCATAGCATTGCGCTACT (SEQ ID NO: 27)	TCACGTGCGCAACCACTCTT (SEQ ID NO: 28)	CGTGAAGTCTAGGGACAG (SEQ ID NO: 29)
VNN 2	NM_004665.2	1	GACTTGATGTATGGAGTGAGGAGTT (SEQ ID NO: 30)	TCTCTCAAGGGCACAGCTATG (SEQ ID NO: 31)	CAGGCCATTGCAA (SEQ ID NO: 32)
PRPSAP 2	NM_002767.2	1	GCCAAACTGGAACATAAGAGTGA (SEQ ID NO: 33)	GCATGACGGTTCCTGTGAAA (SEQ ID NO: 34)	TGCTCGGTGGGATGG (SEQ ID NO: 35)
PRKCA	NM_002737.2	1	CGGAGGTGAGGTTTTTCCTT (SEQ ID NO: 36)	GACGGTTGAATGGCCTCTACA (SEQ ID NO: 37)	TGTATAAGCACCTACTGACAAA (SEQ ID NO: 38)
IGFIR	NM_000875.3	1	AGGACTTCTTCATGGGTCCTTACAGTT (SEQ ID NO: 39)	AAGTGACATTAAAGACGATGTGTATGC (SEQ ID NO: 40)	TGTTAGACCATGAAACATT (SEQ ID NO: 41)
BTG2	NM_006763.2	1	CAGGCTGTGTTCTTGCATCTTG (SEQ ID NO: 42)	GACCATGAGGCTGCTTCTAAAAA (SEQ ID NO: 43)	CTGCAACACAGGTCCTT (SEQ ID NO: 44)
LMO 2	NM_005574.2	1	TTGGACCCCAAGGGAAAACTG (SEQ ID NO: 45)	GGTTAAAAGTTGTGGTTTCCATTCTC (SEQ ID NO: 46)	TGGAGACGCATTTTCG (SEQ ID NO: 47)
CD22	NM_001771.2	1	GACATCCCCACTCAGGAATATTATG (SEQ ID NO: 48)	CTGTCTTTTCTGGGCTTTCC (SEQ ID NO: 49)	CCAGTTTCTGCCTCTGA (SEQ ID NO: 50)
SMNI	NM_000344.2	1	GGCATAGAGCAGCACTAAATGACA (SEQ ID NO: 51)	TTCATAACGCTTACATTCCAGATC (SEQ ID NO: 52)	CACATAAAGAAACGATCAGAC (SEQ ID NO: 53)
EPDRI	NM_017549.3	0	CGCAGTTTGGCCTTCTCTAGA (SEQ ID NO: 54)	TGGAAGGAGATGCAGAAAGTCAGA (SEQ ID NO: 55)	CAGTCTTCATAACCTC (SEQ ID NO: 56)

CD40	NM_001250.4	1	CCTGCCAGTCGGCTTCT (SEQ ID NO: 57)	GTCCAAGGGTGACATTTTTCG (SEQ ID NO: 58)	CTCCAATGTGTATCTG (SEQ ID NO: 59)
IFITM1	NM_003641.3	1	GGGTACTAGTAGCCGCCATA (SEQ ID NO: 60)	GCAGGGCCAGCATTCG (SEQ ID NO: 61)	CAACCTTTGCACTCCAC (SEQ ID NO: 62)
VNN 2	NM_004 665.2	1	TGTCATTTTGGTACTCTGA (SEQ ID NO: 63)	CCCAACACCCAGGCTCTT (SEQ ID NO: 64)	CAGTGTGAACAATG (SEQ ID NO: 65)
PRPSAP 2	NM_0027 67.2	0	GCTCCAGTGCCCCAAGATT (SEQ ID NO: 66)	CGACGGATCGCCTCTGAA (SEQ ID NO: 67)	AACTGTGGATATCAGCATGA (SEQ ID NO: 68)
PRKCA	NM_0 027 37.2	0	TGGGCAACTCAGAAATACCTCGA (SEQ ID NO: 69)	ACGTCATAGGCAGTTTGCT (SEQ ID NO: 70)	CTCCCAAGATATAAGAGGC (SEQ ID NO: 71)
IGFIR	NM_000875.3	0	GTCCACCCTCTCCCCTTTCT (SEQ ID NO: 72)	CACGCACTCTAGTACAAAGCATAAGA (SEQ ID NO: 73)	CTCACTCCAAGAAAC (SEQ ID NO: 74)
BTG2	NM_006763.2	0	CCCAACCGAATCACCTTAAGA (SEQ ID NO: 75)	CAGGAGGTGGCCATCCT (SEQ ID NO: 76)	ACAGGGCTAGGGCAT (SEQ ID NO: 77)
LMO 2	NM_005574.2	0	TCTCCATGGCATCTTCGCTTT (SEQ ID NO: 78)	ATCCCTTACCCACCCCTCAA (SEQ ID NO: 79)	ACTCTAGGCACCTTTGG (SEQ ID NO: 80)
CD22	NM_0 01771.2	0	CGGCTCAGGCACAAGAA (SEQ ID NO: 81)	GCAGCCCATCCAGTGTCAAT (SEQ ID NO: 82)	ATGTGCACTATGTATCCT (SEQ ID NO: 83)
SMNI	NM_000344.2	0	CATGGTACATGAGTGGCTATCATACTG (SEQ ID NO: 84)	GTGAGCACCTTCTCTTTTGA (SEQ ID NO: 85)	CTATTATATGGTTTCAGACAAA (SEQ ID NO: 86)
EPDR1	NM_017549.3	0	GACTATTGTCTCTAAACCCAGGACTA (SEQ ID NO: 87)	CCCAGTGCAATTTAATGACCAAA (SEQ ID NO: 88)	AGTTCCCTCGTACTGTC (SEQ ID NO: 89)
CD4 0	NM_0 01250.4	1	ATCAATTTCCCGACGATCTTC (SEQ ID NO: 90)	CGGTTGGCATCCATGTAAAGT (SEQ ID NO: 91)	TGGTCCAACACTG (SEQ ID NO: 92)
IFITM1	NM_003641.3	0	AGGTCCACCGTGATCAACATC (SEQ ID NO: 93)	CAGGGACCAGACGACATGGT (SEQ ID NO: 94)	ACAGCGAGACCTCCGT (SEQ ID NO: 95)
VNN 2	NM_004 665.2	0	CAACTTGTGGACGGCCAGTA (SEQ ID NO: 96)	GTGCCACTGAGGGAGAACATTT (SEQ ID NO: 97)	AACTGCTTCTACAAGATT (SEQ ID NO: 98)
PRPSAP 2	NM_002767.2	0	CAGCAGAGACCCTGAAGGAAA (SEQ ID NO: 99)	CAAGCCATGAGTTGCCATCA (SEQ ID NO: 100)	AGGTGCATATAAGATCTT (SEQ ID NO: 101)
BCL6	NM_0 0170 6.2	1	CCCATTCGCGTCATGCTT (SEQ ID NO: 102)	AATGCAGTTTAGACACAGCCAAAC (SEQ ID NO: 103)	TGTTATAACTACTCCGGAGACAG (SEQ ID NO: 104)
LRRC8A	NMJ319594.2	1	AGTTCAGCCCAAGTGAAGGT (SEQ ID NO: 105)	GCGGCATCGCTAAATAAGGA (SEQ ID NO: 106)	TTCAGGAAAGGTGGGC (SEQ ID NO: 107)

BCL6	NM_001706.2	1	CACAGGGACTTGAAGTTGTTACTAACTA (SEQ ID NO: 108)	TGACGCAGAAATGGGATGAGA (SEQ ID NO: 109)	CTCTCTTTGGGAATGTT (SEQ ID NO: 110)
LRRCSA	NM_019594.2	0	CAAAGCAGCCAGACGTTGAAC (SEQ ID NO: 111)	CACACCAGATCCGGAGAGACA (SEQ ID NO: 112)	TTCCCTGGGCGCAGG (SEQ ID NO: 113)
RGS13	NM_144766.1	0	GGATTCTCTACCCAGATTCTA (SEQ ID NO: 114)	CAGAAACTGTTGTTGGACTGCATAG (SEQ ID NO: 115)	AGTCAGAAATGTACCAAAA (SEQ ID NO: 116)
YIPF3	NM_015388.2	1	TGAGCTGTAGCTGCGTAAGTACCT (SEQ ID NO: 117)	GGCCTGTGCGCTTTTCAAGAG (SEQ ID NO: 118)	CTTGATGCCTGTGCGC (SEQ ID NO: 119)
YIPF3	NM_015388.2	1	TGGCTGCCCTACACATGCT (SEQ ID NO: 120)	CAGGATCCCTCTTACCACCTTG (SEQ ID NO: 121)	CCTGCTCTATCTGCATTT (SEQ ID NO: 122)
YIPF3	NM_015388.2	0	GAGGCTCAGCTGTGATTGACAT (SEQ ID NO: 123)	CACCCATATCCTCGAAGCTAGAG (SEQ ID NO: 124)	AGAACATGGATGATACCTC (SEQ ID NO: 125)
RGS13	NM_144766.1	0	TCCAGCCACAGTCCCTCTAGA (SEQ ID NO: 126)	TCCTGAATGTTCTCTGATGATAGTCTCT (SEQ ID NO: 127)	AGATTAACATTGACAGTTGACACA (SEQ ID NO: 128)
EPDRI	NM_017549.3	0	CGAGAGGAAGGCGCTGATC (SEQ ID NO: 129)	ACATCACTCCATCCTTATACAGCAA (SEQ ID NO: 130)	CCTGCAAGAGATTATTT (SEQ ID NO: 131)
EPDRI	NM_017 54 9.3	0	GGATCCTCTTGACATTCCTCAAA (SEQ ID NO: 132)	GGCCCCCGATGGA (SEQ ID NO: 133)	CTCCACCTTTGAAGACC (SEQ ID NO: 134)
EPDRI	NM_017 5 4 9.3	0	CGAGGTGTGGCCATATGA (SEQ ID NO: 135)	GAACAGGCATTAGAAATACCCAAAG (SEQ ID NO: 136)	TGACTAGATGGCTAATATG (SEQ ID NO: 137)
UAPI	NM_003115.4	0	CTACTGCAAGGCATGCTTTGAT (SEQ ID NO: 138)	TGGCCCCCTGCATTGA (SEQ ID NO: 139)	TCCCTTCATCATTTGCTG (SEQ ID NO: 140)
CD79B	NM_000626.2	0	GCCGGTGCAGTTACAGTT (SEQ ID NO: 141)	CCCCAAACCCGTGACAAC (SEQ ID NO: 142)	CCTCCAAAGGAGCCTC (SEQ ID NO: 143)
CLPTMI	NM_001294 . 1	1	CAAGGCCCTCAACACATTCA (SEQ ID NO: 144)	GGTACATAACGGGCATCTTGATG (SEQ ID NO: 145)	ACCTGTTGCGCCTTTG (SEQ ID NO: 146)
UAPI	NM_0 03115.4	1	CCTATGCTGGAGAAGGATTAGAAAGT (SEQ ID NO: 147)	CGATGATTAGAGGTGCATGGAA (SEQ ID NO: 148)	ATGTGGCAGATAAAG (SEQ ID NO: 149)
CD7 9B	NM_000626.2	0	TCTGCCACCCCTCACCAT (SEQ ID NO: 150)	GCTGACAGAAGTAGATGCCATTGT (SEQ ID NO: 151)	CAAGGCATCCGGTTTG (SEQ ID NO: 152)
CLPTMI	NM_001294.1	0	AAGTCGCCCTGGAACCTCCT (SEQ ID NO: 153)	CACCGAGTCCTGCTCCTCAT (SEQ ID NO: 154)	ATGAGTTGTACGAGCAGTC (SEQ ID NO: 155)
UAPI	NM_003115.4	1	CATGAGCTGGTGATAAATGGTATTT (SEQ ID NO: 156)	AAAGCTATTCCTATCGTGGCAAA (SEQ ID NO: 157)	AACAGATACCAAGTTTT (SEQ ID NO: 158)

CD79B	NM_000626.2	1	TCCCCAGCTCTTGCCAAAG (SEQ ID NO: 159)	CAGAGAACTCCCTCCAAGTTGCT (SEQ ID NO: 160)	CTGGAGTAGAAGGACAACAG (SEQ ID NO: 161)
CLPTMI	NM_0_012 94.1	0	GGCAGGCCAGGGTTTGT (SEQ ID NO: 162)	CGAGATGGCTGGAAACACAGA (SEQ ID NO: 163)	AGGCGCTGTCTGTC (SEQ ID NO: 164)
CTSC	NM_0_01814.3	1	GACTCAGCCTCTGGGATGGA (SEQ ID NO: 165)	GGATCCGGAAGTAGCCATTCT (SEQ ID NO: 166)	TGGATTGTTAAAAACAGCTGG (SEQ ID NO: 167)
CTSC	NM_001814.3	0	AGCGGCTTCCCATACCT (SEQ ID NO: 168)	CTTCTCCACGAGCCCAAAA (SEQ ID NO: 169)	ATTGAGGAAAGTACGCC (SEQ ID NO: 170)
CTSC	NM_001814.3	0	CCCAAACCTGCACCACTGA (SEQ ID NO: 171)	CAAGATGTTGGCAAAATGCAAA (SEQ ID NO: 172)	CTGAAATACAGCAAAAAGA (SEQ ID NO: 173)
CD4 4	NM_000610.3	0	CCTTGTGGCATTTATTCATCAGT (SEQ ID NO: 174)	GCTTCTATGACAAGCAGCCTTTG (SEQ ID NO: 175)	AGGGTGCCGATTGG (SEQ ID NO: 176)
PUS7	NM_019042.3	0	CTCTGTAGCACAGGCTGGATTG (SEQ ID NO: 177)	AGGCTGCAGTGCAAGATTGA (SEQ ID NO: 178)	AGTGCAATCCTGCAATT (SEQ ID NO: 179)
CD44	NM_000610.3	0	CCACTTGGAGGCCCTTTCATC (SEQ ID NO: 180)	AGTTGGCGATCAGGAATACA (SEQ ID NO: 181)	TCGGGTGTCTATGGA (SEQ ID NO: 182)
PUS7	NM_019042.3	0	CCTTGCCTGGTTTCGATGTT (SEQ ID NO: 183)	GAGCATTTCCCTGTAGGCTTCTT (SEQ ID NO: 184)	CCCAAAGCATAAAATT (SEQ ID NO: 185)
CD4 4	NM_000610.3	0	CAACCGTTGAAACATAACCAATT (SEQ ID NO: 186)	AACAATCAGTAGCACATTGCATCTG (SEQ ID NO: 187)	AGGAGCTGGGACACT (SEQ ID NO: 188)
PUS7	NM_019042.3	0	TGGACTCACTGAGGCTGACGTA (SEQ ID NO: 189)	GATCCCGAGAACCCCTTGATG (SEQ ID NO: 190)	TCACCAAGTTTGTGAGTTC (SEQ ID NO: 191)
RPL22	NM_000983.3	1	GCTGCCAATTTTGAGCAGTTT (SEQ ID NO: 192)	GTTCCAGCTTTTCCGTTCA (SEQ ID NO: 193)	TGCAAGAAAGGATCAAA (SEQ ID NO: 194)
LOC728 179	XR_01534 8.1	1	TC TTGCCTGCCCTGTGTTG (SEQ ID NO: 195)	TGCCTTCCCCTTAATAATGCA (SEQ ID NO: 196)	AAATGCGGGTCCCTT (SEQ ID NO: 197)
SERBPI	NM_001018067.1	1	CTCCCGCTACACAGAAAGTAACAAA (SEQ ID NO: 198)	AAAACATCCCTGCTACCAATACATT (SEQ ID NO: 199)	ATGGTAGTCAGTTTTGTATTAG (SEQ ID NO: 200)
RPL9	NM_000661.4	1	TCCGTTACAAGATGAGGTCTGTGT (SEQ ID NO: 201)	CATTCTCTGGATAACAACGTTGA (SEQ ID NO: 202)	TGCTCACTTCCCC (SEQ ID NO: 203)
CFLI	NM_005507.2	1	TCCATCCCCTTGACGGTTCTG (SEQ ID NO: 204)	AGCCCAAGAGGAATCAAAAGATC (SEQ ID NO: 205)	CCTTCCCAAACTGCTTT (SEQ ID NO: 206)
RPL13	NM_000977.2	1	GAGTCATCACTGAGGAAGAGAAGAATT (SEQ ID NO: 207)	TGGCAGGGGCCATACG (SEQ ID NO: 208)	CAAAGCCTTCGCTAGTC (SEQ ID NO: 209)

FLJ160 25	NM_198505.1	1	CCTACACCCCTTATCCCCATACT (SEQ ID NO: 210)	CCAGGGCTATTGGTTGAATGA (SEQ ID NO: 211)	TTATTATCGAAACCATCAGCC (SEQ ID NO: 212)
RPSIO	NM_001014.3	1	CGACCTGCGAGACTCACAAG (SEQ ID NO: 213)	GGCACAGCACTCCGTCTGT (SEQ ID NO: 214)	AAGCTGACAGAGATAACC (SEQ ID NO: 215)
NPHI	NM_002520.5	1	TCTGGCTGTCTTTTATAATGCA (SEQ ID NO: 216)	CTTGGAATAGAACCTGGACAAC (SEQ ID NO: 217)	AGTGAGAACTTTCCC (SEQ ID NO: 218)
CCDC72	NM_015933.3	1	GCAAGAAGAAGCCACTGAAACA (SEQ ID NO: 219)	GAAAGCCTTATCTTCTCGTCCAT (SEQ ID NO: 220)	CCCAAGAAAGCAGGCCA (SEQ ID NO: 221)
RPSI9	NM_001022.3	1	GGCTGAAAATGGTGAAAAAGG (SEQ ID NO: 222)	CTTTGTCCCTGAGGTGTCAGTTT (SEQ ID NO: 223)	CCAAGATGGCGGCCG (SEQ ID NO: 224)
RPSI6	NM_001020.4	1	TGTGGATGAGGCTTCCAAAGAA (SEQ ID NO: 225)	CAGCAGGTCCGGTCATACAT (SEQ ID NO: 226)	AGATCAAAGACATCCTCATC (SEQ ID NO: 227)
EEFIG	NM_001404.4	1	GGCAGGTGGACTACGAGTCATAC (SEQ ID NO: 228)	GTCTCCTCGCTGCCAGGAT (SEQ ID NO: 229)	CATGGCGGAAACTG (SEQ ID NO: 230)
RPS5	NM_001009.3	1	CCGGAACATTAAAGACCATTCG (SEQ ID NO: 231)	CCCTTGGCAGCATTGATGA (SEQ ID NO: 232)	AGTGCCTGGCAGATG (SEQ ID NO: 233)
EEFIAI	NM_0 014 02.5	1	CTGCCACCCCACTCTTAATCA (SEQ ID NO: 234)	GGCCAATTGAAACAAACAGTTCT (SEQ ID NO: 235)	TGGTGAAGAACGGTC (SEQ ID NO: 236)
RPL28	NM_000991.3	1	GGAGCCTGCCACCTCCTAT (SEQ ID NO: 237)	TGGCGCAGCAATTCCTTG (SEQ ID NO: 238)	TGGGACCACCATC (SEQ ID NO: 239)
ACTGI	NM_0 01614.2	1	TGTCCTTGAAGCTTGATCTGATATCA (SEQ ID NO: 240)	TTCAATACAAAGGTCAAAATCAGCAA (SEQ ID NO: 241)	CACTGGATTGTAGAACTT (SEQ ID NO: 242)
BTF3	NM_001037637.1	1	AGCCTCAGATGAAAGAAACAATCA (SEQ ID NO: 243)	CACCTGTGCCTGCAGTTTGG (SEQ ID NO: 244)	AACCAGGAAAAACTC (SEQ ID NO: 245)
TMSB4X	NM_021109.2	1	AAGCAGGCGAATCGTAATGAG (SEQ ID NO: 246)	TGCTTGTGGAATGTACAGTGCAT (SEQ ID NO: 247)	CGTGCGCCGCCAA (SEQ ID NO: 248)
TPM3	NM_153649.3	1	CCCCTTTCTGGGTTTGAAGCT (SEQ ID NO: 249)	CTGACTGATACAAAAGCACAAATTGAGA (SEQ ID NO: 250)	CTGTCTCTAGAAAGTGCC (SEQ ID NO: 251)
USMG5	NM_032747.2	1	GCTGTGAAAGCAACATAAATGGAT (SEQ ID NO: 252)	GGCATGGGAACCTTAACAGATGAG (SEQ ID NO: 253)	TTAAACTGTCTACGGTTCTT (SEQ ID NO: 254)
EIFI	NM_0 058 01.3	1	CGCTATCCAGAACCTCCACTCT (SEQ ID NO: 255)	CAGGTCATCACCCCTTACTTGCA (SEQ ID NO: 256)	TCGACCCCTTTGCTG (SEQ ID NO: 257)

Procesamiento de datos

Se preprocesaron los resultados en bruto de la qRT-PCR de acuerdo con la descripción a continuación en Normalización, transformación, e imputación y se calculó el índice de sensibilidad tal como se ha descrito en Índice y clasificador de sensibilidad. Se usaron las correlaciones de rango de Spearman para correlacionar estimaciones y los correspondientes valores de P. Para el Índice de sensibilidad multivariable, se seleccionaron las sondas y se estimaron los coeficientes usando la regresión penalizada de mezcla neta elástica de lazo (L1) y cresta (L2), como se describe en Zhou et al., Statist. Soc. B. 67:301-320, 2005 e implementado por Friedman, Hastie y Tibshirani, Regularization Paths for Generalized Linear Models via Coordinate Descent. Technical Report, Dept. of Statistics, Stanford University en www-stat.stanford.edu/~hastie/Papers/glmnet.pdf. Las pruebas de X^2 se usaron para probar asociaciones entre variables categóricas.

Normalización, transformación e imputación

Lo siguiente son definiciones para datos de ensayo y modelar parámetros:

Definiciones

Datos de ensayo

ℓ = un conjunto de muestras de referencia (por ejemplo, líneas celulares de NHL)

N_ℓ = tamaño de la muestra

p = número de sonda (sin incluir las normalizadoras)

$N_{\ell j}^{(Obs)}$ = tamaño de la muestra detectado para la sonda j

$N_{\ell j}^{(ND)}$ = tamaño de la muestra no detectado para la sonda j

$y_{ij}^{(Obs)}$ = valor de ensayo en bruto para la muestra i , sonda j

$p_i^{(norm.Obs)}$ = número de valores normalizadores detectados para la muestra i

$y_{ij}^{(norm.Obs)}$ = valor normalizador detectado para la muestra i , sonda j

Parámetros del modelo

$\hat{\mu}_{\ell j}^{(Obs.raw)}$ = conjunto de media de ℓ del $\log_2$ de los valores de ensayo detectados para la sonda j (no normalizada)

$\hat{\sigma}_{\ell j}^{(Obs)}$ = conjunto de desviación estándar de ℓ del $\log_2$ de los valores de ensayo detectados para la sonda j

$\gamma_\ell^{(ND)}$ = conjunto de número de ℓ de desviaciones estándar por encima de la media

Para un conjunto de muestras de referencia, tales como las usadas para ajustar los coeficientes del índice y los cortes del clasificador, los parámetros de media y desviación estándar del modelo se calculan usando el conjunto de datos de referencia (hágase referencia a las fórmulas para el Conjunto de parámetros de referencia del modelo a continuación). Para nuevas muestras, por ejemplo, una sola muestra nueva para la que se van a calcular el índice y la clase, los parámetros del modelo deben extraerse de un conjunto de referencia, ℓ , que se selecciona para que sea el más representativo de la población de la que se extrae la nueva muestra. Por ejemplo, puede mantenerse un conjunto clínico de referencia para cada indicación y línea de terapia en el que se usa el ensayo. Las fórmulas para calcular los parámetros del conjunto de modelo de referencia y los valores de ensayo transformados, normalizados se muestran a continuación.

Fórmulas

Parámetros del conjunto de modelo de referencia

Valores intermedios

$$\hat{\mu}_i^{(norm.Obs)} = \frac{1}{p_i^{(norm.Obs)}} \sum_{j=1}^{p_i^{(norm.Obs)}} y_{ij}^{(norm.Obs)} \text{ (factor de normalización de muestra)}$$

$$\hat{\mu}_{\ell j}^{(Obs)} = \frac{1}{N_{\ell j}^{(Obs)}} \sum_{i=1}^{N_{\ell j}^{(Obs)}} \left[\log_2 \left(y_{ij}^{(Obs)} \right) - \log_2 \left(\hat{\mu}_i^{(norm.Obs)} \right) \right] \text{ (media normalizada)}$$

Parámetros del modelo

$$\hat{\sigma}_{\ell j}^{(Obs)} = \sqrt{\frac{1}{N_{\ell j}^{(Obs)}} \sum_{i=1}^{N_{\ell j}^{(Obs)}} \left(\log_2 \left(y_{ij}^{(Obs)} \right) - \log_2 \left(\hat{\mu}_i^{(nrm. Obs)} \right) - \hat{\mu}_{\ell j}^{(Obs)} \right)^2}$$

$$\hat{\mu}_{\ell j}^{(Obs. raw)} = \frac{1}{N_{\ell j}^{(Obs)}} \sum_{i=1}^{N_{\ell j}^{(Obs)}} \log_2 \left(y_{ij}^{(Obs)} \right)$$

5

Valores de ensayo transformados, normalizados

Valores intermedios

10

$$\hat{\mu}_i^{(nrm. Obs)} = \frac{1}{p_i^{(nrm. Obs)}} \sum_{j=1}^{p_i^{(nrm. Obs)}} y_{ij}^{(nrm. Obs)} \quad (\text{factor de normalización de muestra})$$

Valores de ensayo transformados, normalizados e introducidos

$$x_{ij}^{(Obs)} = - \left[\log_2 \left(y_{ij}^{(Obs)} \right) - \log_2 \left(\hat{\mu}_i^{(nrm. Obs)} \right) \right], \quad i = 1, \dots, N_{\ell j}^{(Obs)}$$

$$x_{ij}^{(ND)} = - \left[\hat{\mu}_{\ell j}^{(Obs. raw)} - \log_2 \left(\hat{\mu}_i^{(nrm. Obs)} \right) + \gamma_{\ell}^{(ND)} \hat{\sigma}_{\ell j}^{(Obs)} \right], \quad i = 1, \dots, N_{\ell j}^{(ND)}$$

15

La matriz de valores completada de $N_t \times p$, $\begin{bmatrix} \mathbf{x}_1^{(Obs)} & \dots & \mathbf{x}_p^{(Obs)} \\ \mathbf{x}_1^{(ND)} & \dots & \mathbf{x}_p^{(ND)} \end{bmatrix}$, se introduce en el índice de sensibilidad y los cálculos del clasificador.

20 *Índice de sensibilidad y clasificador*

Lo siguiente son definiciones para datos de ensayo y modelar parámetros:

Definiciones

25

Datos de ensayo

ℓ = un conjunto de muestras de referencia (por ejemplo, líneas celulares de NHL)

N_t = tamaño de la muestra

30 p = número de pares de sondas

X_{ij} = valor de ensayo transformado y normalizado para la muestra i , sonda j

$X_{ij'}$ = como en el caso anterior con j' el par de sonda anti-correlacionado para la sonda j

Parámetros del modelo

35

$\beta_{\ell j}$ = conjunto de coeficiente de ℓ para la sonda j

$\hat{\mu}_{\ell j}$ = conjunto de media de ℓ de los valores de ensayo normalizados y transformados para la sonda j

$\hat{\sigma}_{\ell j}^2$ = conjunto de media de ℓ de los valores de ensayo normalizados y transformados para la sonda j

C_t = punto de corte de la clasificación

40

Las fórmulas para calcular los conjuntos de parámetros del modelo y el índice de sensibilidad y el clasificador se muestran a continuación.

Fórmulas

45

Parámetros del conjunto de modelo de referencia

Medias y desviaciones estándar de la sonda

$$\hat{\mu}_{\ell j} = \frac{1}{N_{\ell}} \sum_{i=1}^{N_{\ell}} x_{ij}$$

$$\hat{\sigma}_{\ell j}^2 = \frac{1}{N_{\ell}} \sum_{i=1}^{N_{\ell}} (x_{ij} - \hat{\mu}_{\ell j})^2$$

5 Índice y clasificador

Índice de sensibilidad

$$S_{\ell i} = \sum_{j=1}^p \beta_{\ell j} \frac{x_{ij} - \hat{\mu}_{\ell j}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{\ell j}^2}} - \beta_{\ell j'} \frac{x_{ij'} - \hat{\mu}_{\ell j'}}{\sqrt{\hat{\sigma}_{\ell j'}^2}}$$

10 Clase de sensibilidad

$$T_{\ell i} = \begin{cases} 1 \equiv \text{sensible} & \text{en caso } S_{\ell i} \geq C_{\ell} \\ 0 \equiv \text{resistente} & \text{contrario} \end{cases}$$

Resultados del Ensayo Clínico 001

La tabla 2 a continuación proporciona un resumen de muestra de los especímenes ensayados y las muestras clínicas del Ensayo Clínico 001. Se remitieron veintinueve especímenes de tumor FFPE archivados de 24 pacientes con DLBCL para su procesamiento mediante qRT-PCR. Tres pacientes tenían múltiples especímenes y los 24 pacientes tenían resultados de qRT-PCR usables para al menos un espécimen. De estos 24, 21 tuvieron mediciones de la suma del producto de diámetros (SPD) comunicados tanto inicialmente y al menos una vez después de la visita inicial.

Tabla 2: Recuento de muestras del Ensayo Clínico 001

Ensayo diagnóstico			Base de datos clínica	
Especímenes FFPE archivados	29	Análisis del tamaño de la muestra (disponible tanto qRT-PCR como SPD)		
n.º de pacientes (3 con múltiples especímenes)	24			
Especímenes reportados para qRT-PCR	27			
Resultados de qRT-PCR usables (1 insuficiente)	26		46	Pacientes en la base de datos clínica
qRT-PCR para pacientes únicos (2 pares de especímenes de pacientes promediados juntos)	24	21	39	Reportado cambio respecto del inicial de SPD

La tabla 3 resume las correlaciones de la clasificación de Spearman por pares entre los genes principales y pares que contribuyen al índice de sensibilidad. Basándose en las muestras de desarrollo de la línea celular, debería esperarse que los genes con baja expresión en grupos particulares de pacientes tengan una expresión relativamente elevada del par correspondiente, de media, posibilitando la autonormalización y la interpretación del Índice de sensibilidad como una relación de vías de expresión de reguladas positivamente a negativamente (es decir, en una escala logarítmica de base 2). La magnitud de las correlaciones entre pares en la primera muestra clínica es estadísticamente significativa y destacablemente de alto rendimiento, siendo la estimación de correlación mínima de -0,67 (P = 0,0004). Estas pruebas por sí mismas constituyen una confirmación independiente de que los ensayos se dirigen a secuencias expresadas en muestras de tumor de esta población clínica *in vitro* y de que el ensayo detecta la expresión en las muestras de tejido FFPE archivadas.

Tabla 3: Anti-correlaciones génicas principales y de pares (N = 21)

Gen principal*	Vínculo del locus	Gen de correlación	Par
IFITM1	8519	-0.85	BTG2
CD40	958	-0.84	IGF1R

RGS13	6003	-0,70	CD44
VNN2	8875	-0,87	CTSC
LMO2	4005	-0,67	EPDR1
CD79B	974	-0,75	UAP1
CD22	933	-0,83	PUS7
*CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD22, BTG2, y UAP1 son genes con mayor expresión en líneas celulares sensibles.			

La tabla 4 resume las asociaciones entre las mediciones para cada sonda individualmente y la reducción mayor (o menor aumento) en el SPD del tumor después del inicial. Ya que los rangos de correlación se basan en la diferencia (o proporción) de las mediciones después de las iniciales con las iniciales, las correlaciones positivas significan que se asocia una mayor expresión de la sonda con aumentos de tumores, de media; y las correlaciones negativas significan que una mayor expresión de la sonda se asocia con reducciones tumorales, de media. De manera notable, todos los pares de sonda Principal-par tienen asociaciones en direcciones opuestas con SPD. Los valores de P son coherentes con una tendencia prometedora en esta muestra. Todos los valores de P son menores de 0,5 (se espera un 50 % cuando no hay una auténtica asociación). Todos los intervalos se calculan como *bootstrap* de intervalos de confianza del percentil 95°, basándose en 5.000 replicados muestreados con reemplazo a partir de la muestra de paciente de DLBCL, N = 21. Habrá disponibles intervalos más estrechos a medida que aumente el tamaño de la muestra. Ya que no se requirió la construcción o comprobación del modelo para producir estos resultados, estos comprenden una tendencia robusta, que confirma que estas mediciones de sondas de qRT-PCR se asocian, en general, con la reducción en el SPD tumoral en pacientes tratados con Ab.1 anti-CD40.

Tabla 4: Asociaciones entre SPD y mediciones de sonda individuales (N = 21)

Gen principal	Rho.	P	Intervalo	Par de gen	Rho.	P	Intervalo
IFITM1	+0,29	0,20	(-0,13,0,68)	BTG2	-0,27	0,23	(-0,70,0,19)
CD40	-0,16	0,49	(-0,58, 0,30)	IGF1R	+0,33	0,15	(-0,17, 0,73)
RGS13	-0,32	0,16	(-0,66, 0,13)	CD44	+0,34	0,14	(-0,11,0,70)
VNN2	-0,26	0,26	(-0,67, 0,21)	CTSC	+0,31	0,17	(-0,17, 0,68)
LMO2	-0,25	0,27	(-0,69, 0,25)	EPDR1	+0,27	0,23	(-0,22, 0,67)
CD79B	+0,22	0,34	(-0,22, 0,61)	UAP1	-0,22	0,35	(-0,59, 0,22)
CD22	-0,25	0,28	(-0,66, 0,21)	PUS7	+0,20	0,39	(-0,26, 0,66)

El índice de sensibilidad multivariable es una media ponderada de las sondas en las tablas 3 y 4. Ya que no se esperaba que las ponderaciones en las líneas celulares reflejasen las ponderaciones óptimas en los especímenes de tumores de pacientes, las ponderaciones en las líneas celulares se restringieron a 1 y -1, con la media firmada ponderada por igual, donde los signos correspondían a la asociación entre cada sonda y la resistencia a Ab.1 anti-CD40 mediante la CI25 en las líneas celulares. Para las poblaciones clínicas, se requieren nuevas ponderaciones. Como el análisis preliminar se basa únicamente en 21 muestras, los presentes inventores optaron por usar un procedimiento de regresión penalizado multivariable para seleccionar y estimar las ponderaciones para las 8 mejores de las 14 sondas. Estas ponderaciones (coeficientes) se muestran en la tabla 5, y la asociación entre el índice de sensibilidad resultante y el cambio del SPD respecto del inicial se ilustran en la figura 2. Los mayores valores del índice de sensibilidad multivariable se asocian con reducciones de SPD después del inicio (Rho de Sperman = -0,58, P = 0,006). Todos los intervalos en las tablas 4, 5, y 6 se calcularon como *bootstrap* de intervalos de confianza del percentil 95°, basándose en 5.000 replicados muestreados con reemplazo a partir de la muestra de paciente de DLBCL, N = 21. Habrá disponibles intervalos más estrechos a medida que aumente el tamaño de la muestra.

Tabla 5: Ponderaciones para el índice de sensibilidad multivariable (N = 21)

Gen principal	Coef.	Intervalo	Par de gen	Coef.	Intervalo
IFITM1	-0,08	(-11,7, 3,7)	BTG2	-0,62	(-11,6, 0,0)
CD40	0	(-9,5, 8,2)	IGF1R	0	(-9,0, 5,6)
RGS13	+ 1,13	(-1,9, 8,0)	CD44	-3,39	(-11,9, 0,0)
VNN2	0	(-4,1, 4,1)	CTSC	0	(-8,8, 2,1)
LMO2	0	(-8,5, 2,1)	EPDR1	-0,74	(-4,7, 3,6)
CD79B	+0,04	(-3,2, 9,0)	UAP1	-2,45	(-15,1, 0,0)
CD22	+0,63	(-0,0, 12,7)	PUS7	0	(-7,7, 7,3)

Usando 26 muestras del Ensayo Clínico 001, los intervalos para μ_j y σ_j obtenidos son como se muestran en la tabla 6.

Tabla 6: intervalos de μ_j y σ_j basándose en datos del Ensayo Clínico 001

μ_j	IFITM1	LMO2	CD40	VNN2	IGF1R	BTG2	CD22	BCL6
inferior	-4,89	-5,09	-5,09	-5,10	-5,12	-5,02	-5,03	-5,07
superior	-4,79	-5,00	-5,02	-5,02	-5,06	-4,92	-4,93	-4,99
μ_j	RGS13	EPDR1	CD79B	UAP1	CTSC	CD44	PUS7	
inferior	-5,14	-5,19	-5,10	-5,26	-5,04	-4,97	-5,24	

superior	-5,00	-5,12	-5,04	-5,18	-4,95	-4,87	-5,16	
σ_j	IFITM1	LMO2	CD40	VNN2	IGF1R	BTG2	CD22	BCL6
inferior	0,10	0,09	0,07	0,08	0,06	0,09	0,09	0,08
j	IFITM1	LMO2	CD40	VNN2	IGF1R	BTG2	CD22	BCL6
superior	0,17	0,14	0,12	0,13	0,10	0,15	0,14	0,12
σ_j	RGS13	EPDR1	CD79B	UAP1	CTSC	CD44	PUS7	
inferior	0,14	0,07	0,06	0,08	0,09	0,09	0,08	
superior	0,22	0,11	0,10	0,12	0,14	0,16	0,12	

Resultados del Ensayo Clínico 002

Los resultados en bruto de la qRT-PCR se generaron satisfactoriamente para 10 pacientes con especímenes de archivo. Para esos 10 pacientes, se muestran el diagnóstico, grupo de tratamiento, índice de sensibilidad multivariable y cambio del SPD respecto del inicial en la tabla 7. Las ponderaciones del índice de sensibilidad multivariable se extrajeron de 21 pacientes del Ensayo Clínico 001 (tabla 5), de tal forma que estos pacientes constituyen un conjunto de validación muy pequeño. 2 de 4 pacientes con un índice de sensibilidad ≥ 0 mostraron cierta reducción del tumor después de la exposición a Ab.1 anti-CD40 y 4 de 6 pacientes con un índice de sensibilidad < 0 mostraron aumento tumoral o una mejor respuesta de PD (el SPD no estaba disponible para 2 pacientes, pero había disponible un resultado de mejor respuesta clínica para este paciente).

Tabla 7. Resumen del diagnóstico, grupo de tratamiento, índice de sensibilidad multivariable, respuesta clínica y cambio de SPD para 6 pacientes en el Ensayo Clínico 002.

Muestras	Dx.	Grupo de tratamiento	Índice de sensibilidad	Mejor respuesta	Cambio porcentual de SPD
066-0001	MCL	Pre-2	+0,01	PD	+72,48
066-0015	MCL	V	-0,87	PD	+64,07
066-0009	DLBCL	III	+ 1,06	PR	-78,02
066-0006	DLBCL	I	-2,31	PR	-66,44
066-0011	LBCL de células T	IV	-0,46	SD (PR)	-10,34
066-0005	DLBCL	I	-2,99	PD	+ 1.208,94
066-0013	MCL	IV	-3,67	PD	+94,59
066-0019	DLBCL	V	+0,15	SD	-32,64
066-0004	DLBCL	I	-0,46	PD	?
066-0002	DLBCL	Pre-2	+0,99	PD	?

BCL6. El ensayo de qRT-PCR contiene una 15ª sonda para el gen de BCL6. Aunque no se usa actualmente en el índice de sensibilidad multivariable, se identificó previamente como un predictor potencial de la respuesta a Ab.1 anti-CD40. Tal como se muestra en la figura 3, aunque no está asociado significativamente con el cambio del SPD en la muestra de paciente combinada de DLBCL ($P = 0,25$, $N=26$), BCL6 tiende a ser menor en aquellos con aumentos tumorales ($Rho = -0,23$).

Ejemplo 2. Uso de 15 marcadores génicos para determinar la sensibilidad de pacientes de DLBCL al tratamiento con Ab.1 anti-CD40

Usando muestras de pacientes de DLBCL de ensayos clínicos de Fase I (11 muestras) y de Fase II (28 muestras) descritos en el ejemplo 1, se desarrolló un clasificador basado en la qRT-PCR para una reducción del tamaño tumoral de al menos el 10 %, definida en el presente documento como sensible a Ab.1 anti-CD40, usando K-vecinos más próximos ponderados (KNN), con ponderaciones para los 15 marcadores (UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B) determinadas usando regresión penalizada (GLMNET). Los parámetros del modelo se determinaron mediante validación cruzada y se calcularon valores de p robustos mediante pruebas de permutación.

Usando K-vecinos más próximos ponderados (WKNN), se asignó una clase para una nueva muestra usando las clases conocidas de las K muestras de referencia más próximas, donde K es un número entero entre 4 y 13. Las muestras de referencia más próximas (vecinos más próximos) son aquellas con la menor media ponderada de las diferencias absolutas (WAAD) entre cada una de las 15 mediciones de sonda para UAP1, BTG2, CD40, VNN2, RGS13, CD22, LMO2, IFITM1, CTSC, CD44, PUS7, BCL6, EPDR1, IGF1R y CD79B, en donde las diferencias son entre las mediciones de la sonda de la nueva muestra que se va a clasificar y aquellas de cada muestra de referencia. Las ponderaciones para la WAAD son los valores absolutos de los coeficientes de una regresión penalizada de red elástica del encogimiento de la muestra tumoral de referencia en las 15 mediciones de la sonda. La magnitud de la

penalización se selecciona mediante validación cruzada de 10 veces para minimizar el error de clasificación de WKNN. La K óptima se determinó como 5 en la validación cruzada 10 veces en el conjunto de datos de entrenamiento. Nótese que la ponderación para algunas mediciones de la sonda pueden ser 0 (cero), de tal forma que no todas las mediciones de la sonda contribuyen necesariamente a la clasificación, y las contribuciones relativas depende de las mediciones de la sonda de la muestra de referencia y de sus clases conocidas. Para determinar la clase predicha de una nueva muestra, las K muestras de referencia más próximas contribuyen con la inversa de su WAAD (es decir, 1 dividido entre la WAAD) en forma de un voto para sus marcadores de clase conocidos. Se asigna el marcador de clase con las contribuciones totales mayores de la inversa de WAAD a la nueva muestra. Una clase anterior se pondera entre 0 y 1, pudiendo usarse las ponderaciones de todas las clases que suman hasta 1 (uno) como multiplicador de las contribuciones de la inversa de WAAD normalizada para aumentar o reducir la proporción de nuevas muestras clasificadas en cada clase. Se obtuvieron resultados similares usando KNN no ponderados.

Se llevó a cabo la qRT-PCR para todos los 15 genes usando cebadores y sondas descritas en el ejemplo 1 para las muestras de pacientes. Para una muestra específica de 39 pacientes de DLBCL, se determinaron las ponderaciones para cada uno de los 15 genes marcadores (tabla 8).

Tabla 8. Ponderaciones para los genes marcadores

BCL6	IFITM1	CD40	RGS13	VNN2	LMO2	CD79B
1,98010348	1,75845322	0,00000000	0,00000000	0,00000000	0,00000000	0,00000000
CD22	BTG2	IGF1R	CD44	CTSC	EPDR1	UAP1
0,05014746	0,00000000	0,35155187	5,33314459	0,00000000	1,55417748	7,13145292
PUS7						
0,00000000						

Basándose en el método descrito anteriormente, se determinó una muestra de 39 pacientes como Dx negativo (que no responde al tratamiento con Ab.1 anti-CD40) o Dx positivo (una reducción tumoral de al menos el 10 % en respuesta al tratamiento con Ab.1 anti-CD40). Los datos mostrados en la figura 4 indican que la precisión general para predecir la sensibilidad al tratamiento con Ab.1 anti-CD40 es del 79,5 % ($P = 0,004$). Veintiuno de los 24 pacientes con firma negativa (88 %) mostraron una reducción tumoral no medible en respuesta al tratamiento con Ab.1 anti-CD40. Diez de los 15 pacientes con firma positiva (67 %) mostraron una reducción tumoral significativa en respuesta al tratamiento con Ab.1 anti-CD40. Además, tal como se muestra en la figura 5, los pacientes Dx positivos tenían una supervivencia libre de progresión aumentada. Esto es coherente con la reducción tumoral observada. La supervivencia libre de progresión (PFS) de los pacientes con firma positiva (con predicción de respuesta) se prolongó significativamente en comparación con los pacientes de firma negativa, con una mediana de PFS de 169 días frente a 40 días, respectivamente ($p = 0,001$). Estos datos indican que una firma tumoral de 15 genes de DLBCL mediante qRT-PCR fue eficaz para predecir los resultados después de la estimulación de la vía de CD40 con Ab.1 anti-CD40.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para propósitos de claridad de comprensión, las descripciones y ejemplos no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir la sensibilidad de un sujeto que tiene linfoma de células B a un tratamiento con anticuerpo anti-CD40, que comprende las etapas de:

(a) medir el nivel de expresión de los genes marcadores BCL6, IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1 y PUS7 en una muestra que comprende células de linfoma de células B obtenidas de dicho sujeto;

(b) clasificar al sujeto como un sujeto sensible o no sensible usando un análisis de K-vecinos más próximos basado en el nivel de expresión de dichos genes marcadores en la muestra del sujeto y muestras de referencia con clases conocidas.

2. El método de la reivindicación 1, en el que la clasificación usa un análisis de K-vecinos más próximos ponderado.

3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se normaliza el nivel de expresión medido.

4. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que las muestras de referencia son muestras que comprenden células de linfoma B obtenidas de sujetos cuya sensibilidad al tratamiento con anticuerpo anti-CD40 se ha:

- (i) ensayado; o
- (ii) predicho.

5. El método de cualquier reivindicación anterior, en el que la clasificación del sujeto en la etapa (b) se lleva a cabo (1) determinando el parámetro K; (2) calculando la diferencia entre el nivel de expresión medido de los genes marcadores en la muestra del sujeto y el nivel de expresión de los genes marcadores respectivos en cada muestra de referencia; (3) determinando las muestras de referencia más próximas seleccionando aquellas muestras con la menor media ponderada de las diferencias absolutas (WAAD) entre la muestra del sujeto y la muestra de referencia; y (4) determinando la clase de sujeto basándose en las clases conocidos de las K-muestras de referencias más próximas.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el parámetro K es 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o 13 en el análisis de K-vecinos más próximos.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho tratamiento con anticuerpo anti-CD40 es un tratamiento con un anticuerpo anti-CD40 agonista.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el anticuerpo agonista anti-CD40:

- (i) estimula a CD40 y potencia la interacción entre CD40 y el ligando de CD40; o
- (ii) comprende la secuencia de aminoácidos de cadena pesada mostrada en la SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera mostrada en la SEQ ID NO: 2; o
- (iii) estimula a CD40 y no potencia o inhibe la interacción entre CD40 y el ligando de CD40.

9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho linfoma de células B es:

- (i) linfoma difuso de células B grandes (DLBCL); o
- (ii) linfoma no de Hodgkin, siendo dicho linfoma no de Hodgkin opcionalmente linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de la zona marginal o linfoma linfocítico de células pequeñas.

10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la muestra es una muestra de biopsia fijada en formalina e incluida en parafina.

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que se mide el nivel de expresión de uno o más genes marcadores mediante el nivel de un transcrito de ARN de los uno o más genes marcadores, en el que el transcrito de ARN se mide opcionalmente mediante:

- (i) qRT-PCR; o
- (ii) micromatriz.

12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que se mide el nivel de expresión de uno o más genes marcadores mediante el nivel de expresión de proteínas de los uno o más genes marcadores.

13. Un anticuerpo anti-CD40 para su uso en un método de tratamiento para el linfoma de células B, comprendiendo el método administrar el anticuerpo a un sujeto para el que se ha predicho la sensibilidad mediante el método de acuerdo con cualquier reivindicación anterior.

14. El anticuerpo anti-CD40 para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, que es un anticuerpo anti-CD40 agonista.

VNN2

LOCUS NM_004665 2034 pb ARNm lineal PRI 03-SEP-2007
 DEFINICIÓN Vanina 2 (VNN2) de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1, ARNm
 REFERENCIA NM_004665
 VERSIÓN NM_004665.2 GI:17865813

```

1 aaaccttggc catggtcact tctctttttc caatctctgt ggcagttttt gccctaataa
61 cctgcagggt tggtaactcag gacagttttt tagctgcagt gtatgaacat gctgtcattt
121 tgcacaaataa aacagaaaaca ccagttttctc aggaggatgc cttgaatctc atgaacgaga
181 atatagacat tctggagaca gcgatcaagc aggcagctga gcaggggtgc cgaatcattg
241 tgactccaga agatgcactt tatggatgga aattttaccag ggaaactgtt ttcctttatc
301 tggaggatat cccagaccct cagggtgaact ggattccgtg tcaagaaccc cccagatttg
361 gtcacacacc agtacaagca agactcagct gcctggccaa ggacaactct atctatgtct
421 tggcaaatgtt gggggacaaa aagccatgta attcccggtg ctccacatgt cctcctaattg
481 gctacttttca atacaatacc aatgtggtgt ataatacaga aggaaaaactc gtggcacgtt
541 accataagta ccacctgtac tctgagcctc agttttaatgt cctgaaaag cggagtttg
601 tgactttcaa caccgcattt ggaagggttg gcattttcac gtgctttgat atattcttct
661 atgatectgg tgttaccctg gtgaaagatt tccatgtgga caccatactg tttcccacag
721 cttgggatgaa cgttttgccc cttttgacag ctattgaatt ccattcagct tgggcaatgg
781 gaatgggagt taatcttctt gtggccaaca cacatcatgt cagcctaaat atgacaggaa
841 gtggtatttta tgcaccaaag ggtcccaaag tgtatcatta tgacatgaag acagagttgg
901 gaaaacttct cttttcagag gtggattcac atccctatc ctogcttgcc taaccaacag
961 ctgttaattg gaatgcctac gccaccacca tcaaaccatt tccagtacag aaaaacactt
1021 tcaggggatt tatttccagg gatgggttca acttcacaga actttttgaa aatgcaggaa
1081 accttacagt ctgtcaaaag gagctttgct gtcattttaag ctacagaatg ttacaaaaag
1141 aagagaatga agtatacgtt ctaggagctt ttacaggatt acatggccga aggagaagag
1201 agtactggca ggtctgcaca atgctgaagt gcaaaaactac taatttgaca acttgtggac
1261 ggccagtaga aactgcttct acaagatttg aaatgttctc cctcagtggc acatttggaa
1321 cagagtatgt ttttccctgaa gtgctactta ccgaaattca totgtcactt ggaaaatttg
1381 aggtgctgaa agatggggct ttggtaaaca agaattggatc atctgggctt atactaacag
1441 tgtcactctt tgggaggtgg tacacaaagg actcacttta cagctcatgt gggaccagca
1501 attcagcaat aacttacctg ctaatatcca tattattaat gatcatagct ttgcaaaata
1561 ttgtaattgt atagggcgct tctttatcac tcagcttctg catcatatgc ttggctgaat
1621 gtgttttatcg gcttcccaag tttactaaga aactttgaag ggctatttca gtagtataga
1681 ccagtgaagc ctaaatattt tttctcatca ataattattt ttttaagtatt atgataatgt
1741 tgtccatttt tttggctact ctgaaatgtt gcagtgtgga acaatggaaa gagcctgggt
1801 gtttgggtca gataaatgaa gatcaaaactc cagctccagc ctcatctgtc tgagactttg
1861 tgtgtatggg ggacttgtat gtatgggagt gaggagtttc agggccattg caaacatagc
1921 tgtgcccttg aagagaatag taatgatggg aatttagagg tttatgactg aattcccttt
1981 gacattaaag actatttgaa ttcaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa

```

Figura 1-1

RGS13

LOCUS NM_002927 1498 pb ARNm lineal PRI 24-AGO-2007
 DEFINICIÓN Regulador de la señalización de proteína G 13 (RGS13) de
Homo sapiens, variante de transcrito 1, ARNm.
 REFERENCIA NM_002927
 VERSIÓN NM_002927.3 GI:21464137
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 gaggccagag tgccatcgaa ggtaattata gagacagtaa aatcctttta ctctgggaaa
61 aataaaatgc tgggtgtctc acaaaatttc agaacctgat ttcaaacgga tcataacaaa
121 gaggagatca aatttagcat ggtggactgc tcgacaggat atatttgtca atggaatggt
181 tccacatatt ataccaccaa catgagaaaa aaatgatcat tgtttatttg aagcttgatg
241 atattctaac gctgcctttt ctcttctcat tttagagaaa aatgagcagg cggaattggt
301 ggatttgtaa gatgtgcaga gatgaatcta agaggccccc ttcaaacctt actttggagg
361 aagtattaca gtgggcccag tcttttgaaa atttaattggc tacaaaatat ggtccagtag
421 tctatgcagc atatttaaaa atggagcaca gtgacgagaa tattcaattc tggatggcat
481 gtgaaacctc taagaaaatt gcctcacggg ggagcagaaat ttctagggca aagaagcttt
541 ataagattta catccagcca cagtcacctc gagagattaa cattgacagt tcgacaagag
601 agactatcat caggaacatt caggaaccca ctgaaacatg ttttgaagaa gctcagaaaa
661 tagtctatat gcatatggaa agggattcct accccagatt tctaaagtca gaaatgtacc
721 aaaaactttt gaaaactatg cagtccaaca acagttttctg actacaactc aaaagtttaa
781 atagaaaaca gtatattgaa agtgggtgggt ttgatctttt tatttagaaa ccacaaaaat
841 cagaaacaca gtacaaataa aacagaaaatc aaactataag ttgactttta gttcctaaaa
901 agaaacatat ttcaaagca atggaatcta gaattcttat aacatgaata acaaaatgta
961 cagcaagcct atgtagttca attaatatat aaggaaaagg aaggctcttc ttcattgatac
1021 aagcattata aagttttttac tgtagtagtc aattaatgga tatttccttg ttaataaaaat
1081 tttgtgtcat aatttacaaa ttagttcttt aaaaattggt gttatatgaa ttgtgtttct
1141 agcatgaatg ttctatagag tactctaaat aacttgaatt tatagacaaa tgctactcac
1201 agtacaatca attgtattat accatgagaa aatcaaaaag gtgttcttca gagacatttt
1261 atctataaaa ttttctactc attatgttca ttaacaaact tctttatcac atgtatcttc
1321 tacatgtaaa acatttctga tgatttttta acaaaaaata tatgaatttc ttcatttgct
1381 cttgcatcta cattgctata aggatataaa atgtgggttc tatattttga gatgtttttt
1441 cettacaatg tgaactcac gtgatcttgg aaatcaataa agtcaaatat caactaaa

```

Figura 1-2

CD22

LOCUS NM_001771 3260 pb ARNm lineal PRI 03-SEP-2007
 DEFINICIÓN Molécula CD22 (CD22) de *Homo sapiens*, ARNm.
 REFERENCIA NM_001771
 VERSIÓN NM_001771.1 GI:4502650
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 ccatcccata gtgaggggaag acacgcggaa acagggcttgc acccagacac gacaccatgc
61 atctctctcg cccctggctc ctgctcctgg ttctagaata cttggcttct tctgactcaa
121 gtaaatgggt ttttgagcac cctgaaaccc tctacgcctg ggaggggggc tgcgtctgga
181 tccctgcac ctacagagcc ctatagtggtg acctggaaag cttcatcctg ttccacaatc
241 ctgagtataa caagaacacc tcgaagtttg atgggacaag actctatgaa agcacaaagg
301 atgggaaggt tcttctctgag cagaaaaggg tgcaattcct gggagacaag aataagaact
361 gcacactgag tatccaccgg gtgcacctca atgacagtgg tcagctgggg ctgaggatgg
421 agtccaagac tgagaaatgg atggaacgaa tacacctcaa tgtctctgaa aggccttttc
481 cacctcatat ccagctccct ccagaaatto aagagtccca ggaagtccct ctgacctgct
541 tgcctgaattt ctctgctat gggtatccga tccaattgca gtggtccta gagggggttc
601 caatgaggca ggcctgctgc acctgacct ccttgacct caagtctgtc ttcacccgga
661 gcgagctcaa gttctcccca cagtggagtc acctgggaa gattgtgacc tgcagcttc
721 aggatgcaga tgggaagttc ctctccaatg acacggtgca gctgaacgtg aagcacacc
781 cgaagtggga gatcaaggtc actccagtg atgcatagt gagggagggg gactctgtga
841 ccatgacctg cgaggtcagc agcagcaacc cggagtacac gacggtatcc tggctcaagg
901 atgggacctc gctgaagaag cagaatacat tcacgctaaa cctgcgcgaa gtgaccaagg
961 accagagtgg gaagtactgc tgtcaggtct ccaatgacgt gggcccgga aggtcggaag
1021 aagtgttct gcaagtgcag tatgccccgg aaccttccac ggttcagatc ctccactcac
1081 cggctgtgga gggaaagtcaa gtogagtttc tttgcatgtc actggccaat cctcttccaa
1141 caaattacac gtggtaccac aatgggaaag aaatgcaggg aaggacagag gagaaagtcc
1201 acatcccaaa gatcctcccc tggcacgctg ggacttattc ctgtgtggca gaaaacatcc
1261 ttggtactgg acagaggggc ccgggagctg agctggatgt ccagtatcct cccaagaagg
1321 tgaccacagt gattcaaaac cccatgcga ttcgagaagg agacacagt acccttctct
1381 gtaactacaa ttccagtaac ccagtggtta ccgggtatga atggaaaccc catggcgctc
1441 gggaggagcc atcgcttggg gtgctgaaga tccaaaacgt tggctgggac aacacaacca
1501 tcgctgcgc acgttgtaat agttggtgct cgtgggcctc cctgtgcgc ctgaatgtcc
1561 agtatgcccc ccgagacgtg agggctccga aaatcaagcc cctttccgag attcactctg
1621 gaaactcggc cagcctccaa tgtgacttct caagcagcca ccccaaagaa gtccagttct
1681 tctgggagaa aaatggcagg cttctgggga aagaaagcca gctgaatttt gactccatct
1741 cccagaaga tgctgggagt tacagctgct gggatgaaca ctccatagga cagacagcgt
1801 ccaaggcctg gacacttgaa gtgctgtatg cccccaggag gctgcgtgtg tccatgagcc
1861 cgggggacca agtgatggag gggagagtg caacctgac ctgtgagagt gacgccaac
1921 ctcccgctc cactacacc tggtttgact ggaataacca aagcctccc caccacagcc
1981 agaagctgag attggagccg gtgaaggctc agcactggg tgctactgg tgccagggga
2041 ccaacagtgt gggcaagggc cgttcgcctc tcagcaccct tactgtctac tatagcccg
2101 agaccatcgg caggcgagtg gctgtgggac tgggtcctg cctcgccac ctctccttg
2161 caatctgtgg gctcaagctc cagcgagctt ggaagaggac acagagccag caggggcttc
2221 aggagaattc cagcgccag agctctcttg tgaggaataa aaagggttaga agggccccc
2281 tctctgaagg ccccaactcc ctgggatgct acaatccaat gatggaagat ggcattagct
2341 acaccacct gcgctttccc gagatgaaca taccacgaac tggagatgca ggtcctcag

```

Figura 1-3

```

2401 agatgcagag acctccccgg acctgcgatg acacgggtcac ttattcagca ttgcacaagc
2461 gccaaagtggg cgactatgag aacgtcattc cagattttcc agaagatgag gggattcatt
2521 actcagagct gatccagttt ggggtcgggg agcggcctca ggcacaagaa aatgtggaat
2581 atgtgatcct caaacattga cactggatgg gctgcagcag aggcactggg ggcagcgggg
2641 gccaggggaag tccccgagtt tccccagaca ccgccacatg gcttctctct gctgcatgt
2701 gcgcacacac acacacacac gcacacacac acacacacac tcaactgcga gaaccttgtg
2761 cctggctcag agccagtctt ttgggtgagg gtaaccccaa acctccaaaa ctctgcccc
2821 tgttctcttc cactctctct gctaccaga aatcatctaa atacctgccc tgacatgcac
2881 acctccctg cccaccagc ccaactggca tctccaccg gagctgctgt gtcctctgga
2941 tctgctcgtc attttctct ccttctccat ctctctggc ctctacctt gatctgacat
3001 cccactcac gaatattatg ccagtttct gctctgagg gaaagcccag aaaaggacag
3061 aaacgaagta gaaaggggccc cagtctggc ctggcttct ctttggaagt gaggcattgc
3121 acggggagac gtacgtatca gcggccctt gactctggg actccgggt tgagatggac
3181 aactgggtgt ggattaacct gccagggaga cagagctcac aataaaaatg gctcagatgc
3241 cacttcaaag aaaaaaaaaa

```

Figura 1-4

CD40

LOCUS NM_001250 1616 pb ARNm lineal PRI 30-SEP-2007
 DEFINICIÓN Molécula CD40 de *Homo sapiens*, miembro 5 de la superfamilia de receptor de TNF (CD40), variante de transcrito 1, ARNm
 REFERENCIA NM_001250
 VERSIÓN NM_001250.4 GI:91105420
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 gccaaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgccccagt ggtcctgcog
61 cctgggtctca cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctcttg ggctgcttgc
121 tgaccgctgt ccattccagaa ccacccactg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca
181 gtcagtgtctg ttctttgtgc cagccaggac agaaaactgg gagtgactgc acagagttca
241 ctgaaacgga atgccttctt tgcggtgaaa gccaattcct agacacctgg aacagagaga
301 cactctgcca ccagcacaaa tactgcgacc ccaacctagg gcttcggggtc cagcagaagg
361 gcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg
421 cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat gctcgcccg ctttgggggtc aagcagattg
481 ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc cctgccccagt cggttctctc tccaatgtgt
541 catctgcttt cgaaaaatgt cacccttgga caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc
601 aacaggcagg cacaaaacaag actgatgttg totgtgggtc ccaggatcgg ctgagagccc
661 tgggtggtgat ccccatcacc ttccgggatcc tgtttgcat cctcttggtg ctggtcttta
721 tcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata agggccccc ccccaagcag gaaccccagg
781 agatcaattt tcccgacgat ctctctggct ccaacactgc tgcctcagtg caggagactt
841 tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcacaaga gactcgcatc tcagtgcagg
901 agagacagtg aggtgcacc caccaggagg tgtggccaog tgggcaaaca ggcagttggc
961 cagagagcct ggtgctgctg ctgctgtggc gtgaggggtga ggggctggca ctgactgggc
1021 atagctcccc gcttctgctt gcacccctgc agtttgagac aggagacctg gcactggatg
1081 cagaaacagt tcaccttgaa gaacctctca ctccacctg gagcccatcc agtctcccaa
1141 cttgtattaa agacagaggc agaagtttgg tgggtggtgg gttgggggtat ggttttagtaa
1201 tatccaccag accttcgat ccagcagttt ggtgcccaga gaggcacatc ggtggcttcc
1261 ctgcgcccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca
1321 actggaagct gcttaactgt ccattcagcag gagactggct aaataaaatt agaatatatt
1381 tatacaacag aatctcaaaa acactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgcgtgaatga
1441 tgggtatgga acttttttaa aaagtacatg cttttatgta tgtatattgc ctatggatat
1501 atgtataaat acaatatgca tcatatattg atataacaag ggttctggaa ggggtacacag
1561 aaaaccacac gctcgaagag tgggtgacgtc tggggtgggg aagaagggtc tggggg

```

Figura 1-5

IFITM1

LOCUS NM_003641 733 pb ARNm lineal PRI 03-SEP-2007
 DEFINICIÓN Proteína 1 transmembrana inducida por interferón (9-27)
 (IFITM1)
 de *Homo sapiens*, ARNm.
 REFERENCIA NM_003641
 VERSIÓN NM_003641.3 GI:150010588
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 aaacagcagg aaatagaaac ttaagagaaa tacacacttc tgagaaactg aaacgacagg
61 ggaaaggagg tctcactgag caccgtccca gcatccggac accacagcgg cccttcgctc
121 cagcagaaa accacacttc tcaaaccttc actcaacact tccttcccca aagccagaag
181 atgcacaagg aggaacatga ggtggctgtg ctgggggcac ccccagcac catccttcca
241 aggtccaccg tgatcaacat ccacagcgag acctccgtgc cggaccatgt cgtctgggtcc
301 ctgttcaaca cctctcttctt gaactgggtgc tgtctgggct tcatagcatt cgcctactcc
361 gtgaagtcta gggacaggaa gatggttggc gacgtgaccg gggcccaggc ctatgcctcc
421 accgccaagt gcctgaacat ctggggccctg attctgggca tctcatgac cattggattc
481 atcctgttac tgggtattcggt ctctgtgaca gtctaccata ttatgttaca gataatacag
541 gaaaaacggg gttactagta gcgcgccata gcctgcaacc tttgcactcc actgtgcaat
601 gctggccctg cagctgggg ctggtgcccc tgcccccttg gtcttgcccc tagatacagc
661 agttttatacc cacacacctg tctacagtgt cattcaataa agtgcacgtg cttgtgaaaa
721 aaaaaaaaaa aaa

```

Figura 1-6

BCL6

LOCUS NM_001706 3537 pb ARNm lineal PRI 30-SEP-2007
 DEFINICIÓN CLL de células B/linfoma 6 de *Homo sapiens* (proteína de dedo de zinc 51) (BCL6), variante de transcrito 1, ARNm.
 REFERENCIA NM_001706
 VERSIÓN NM_001706.2 GI:21040323
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1  ggccctcgga gctcgaacc ggaacctcca aatccgagac gctctgetta tgaggacctc
61  gaaatatgcc ggccagtga aaaaatttgt ggctttgagg gcttttggtt ggccaggggc
121 agtaaaaatc tcggagagct gacaccaagt cctccctgc cactagcag tggtaaagtc
181 cgaagctcaa attccgagaa ttgagctctg ttgattotta gaactggggt tcttagaagt
241 ggtgatgcaa gaagtttcta ggaaaggcgg gacaccaggt tttgagcaaa attttggaact
301 gtgaagcaag gcattgggtga agacaaaatg gctcgcggg ctgacagctg tatccagttc
361 acccgccatg ccagtgatgt tcttctcaac cttaatcgtc tccggagtcg agacatcttg
421 actgatgttg tcattgttgt gagccgtgag cagtttagag cccataaaac ggtcctcatg
481 gctgcagtg gctgttcta tagcatcttt acagaccagt tgaaatgcaa ccttagtgtg
541 atcaatctag atcctgagat caacctgag ggattctgca tctcctgga ctcatgtac
601 acatctcggc tcaatttgcg ggaggccaac atcatggctg tgatggccac ggctatgtac
661 ctgcagatgg agcatgttgt ggacacttgc cggaaagttta ttaaggccag tgaagcagag
721 atggtttctg ccatcaagcc tctcgtgaa gagttctca acagccggat gctgatgcc
781 caagacatca tggcctatcg gggtcgtgag gtggtggaga acaacctgcc actgaggagc
841 gccctgggt gtgagagcag agcctttgac ccagcctgt acagtggcct gtccacaccg
901 ccagcctctt attccatgta cagccacctc cctgtcagca gctcctctt ctccgatgag
961 gagtttcggg atgtccggat gcctgtggcc aacctcttc ccaaggagcg ggcactcca
1021 tgtgatagtg ccaggccagt cctgggtgag tacagccggc cgactttgga ggtgtcccc
1081 aatgtgtgac acagcaatat ctattcacc aaggaaaaca tcccagaaga ggcaogaagt
1141 gatagcact acagtgtggc tgagggcctc aaacctgtg cccctcagc ccgaaatgcc
1201 ccctacttcc cttgtgacaa ggccagcaaa gaagaagaga gacctctc ggaagatgag
1261 attgccctgc atttcagacc cccaatgca cccctgaacc ggaaggtct ggttagtcca
1321 cagagcccc agaaatctga ctgccagccc aactcgccc cagagtcctg cagcagtaag
1381 aatgcctgca tctccaggc ttctggctcc cctccagcca agagcccac tgacccaaa
1441 gcctgcaact ggaagaaata caagttoatc gtgctcaaca gcctcaacca gaatgccaaa
1501 ccagaggggc ctgagcaggc tgagctgggc cgcctttccc cagagccta cagggcccca
1561 cctgcctgcc agccacccat ggagcctgag aaccttgacc tccagtcctc aaccaagctg
1621 agtgccagcg gggaggactc caccatccc caagccagcc ggctcaataa catcgtaac
1681 aggtccatga cgggctctcc ccgcagcagc agcgagagcc actcaccact ctacatgcac
1741 ccccggaagt gcacgtcttg cggtctcag tcccacagc atgcagagat gtgcctcac
1801 accgctggcc ccacgttccc tgaggagatg ggagagacc agtctgagta ctacagattc
1861 agctgtgaga acggggcctt cttctgcaat gactgtgact gccgtctctc tgaggaggcc
1921 tcactcaaga ggcacaagct gcagacccac agtgacaaa cctacaagtg tgaccgctgc
1981 caggcctcct tccgtacaa gggcaacctc gccagccaca agaccgtcca taccggtgag
2041 aaacctatc gttgcaacat ctgtggggcc cagttcaacc ggccagccaa cctgaaaacc
2101 cacactcgaa ttcactctgg agagaagccc tacaaatgag aaacctgcgg agccagattt
2161 gtacaggtgg cccacctcgg tgccatgtg cttatccaca ctggtgagaa gccctatccc
2221 tgtgaaatct gtggcaccgg ttccggcac cttcagaact tgaagagcca cctgcgaatc
2281 cacacaggag agaaacctta ccattgtgag aagtgtaac tgcatttcgg tcacaaaagc
2341 cagctgcgac ttcacttgcg ccagaagcat ggcgccaatc ccaacaccaa ggtgcaatac

```

Figura 1-7

```

2401 cgogtgtoag ccaactgacot gcotcoggag ctccccaaaag cctgctgaag catggagtgt
2461 tgatgctttc gtctccagcc ccttctcaga atctacccaa aggatactgt aacactttac
2521 aatgttccatc ccatgatgta gtgcctcttt catccactag tgcaaatcat agctgggggt
2581 tgggggtggt ggggggtcggg gcctggggga ctgggagccg cagcagctcc cctccccc
2641 ctgccataaa acattaagaa aatcatattg cttcttctcc tatgtgtaag gtgaacctg
2701 tcagcaaaaa gcaaaatcat tttatatgtc aaagcagggg agtatgcaaa agttctgact
2761 tgacttttagt ctgcaaaatg aggaatgtat atgttttgtg ggaacagatg tttcttttgt
2821 atgtaaatgt gcattctttt aaaagacaag acttcagtat gttgtcaaag agagggcttt
2881 aattttttta accaaagggtg aaggaatata tggcagagtt gtaaatatat aaatatatat
2941 atatataaaa taaatatata taaacctaac aaagatatat taaaaatata aaactgcgtt
3001 aaaggctoga ttttgtatct gcaggcagac acggatctga gaatctttat tgagaaagag
3061 cacttaagag aatattttta gtattgcac tgtataagta agaaaatatt ttgtctaaaa
3121 tgctcagtg tatttgtatt tttttgcaag tgaaggttta caatttaca agtgtgtatt
3181 aaaaaaaaca aaaagaacaa aaaaatctgc agaaggaaaa atgtgtaatt ttgtctagt
3241 tttcagtttg tatatacccg tacaacgtgt cctcacggtg ccttttttca cggaagtttt
3301 caatgatggg cgagcgtgca ccatcccttt ttgaagtgtg ggcagacaca gggacttgaa
3361 gttgttaact actaaaactc ctttggaat gtttgtctca tccattctg cgtcatgctt
3421 gtgttataac tactccggag acagggtttg gctgtgtcta aactgcatta ccgcttgta
3481 aaatatagct gtacaaatat aagaataaaa tgttgaaaag tcaaaactgga aaaaaaa

```

Figura 1-8

EPDR1

LOCUS NM_017549 2613 pb ARNm lineal PRI 26-JUN-2007
 DEFINICIÓN Proteína 1 relacionada con endimina (pez cebra)
 (EPDR1) de *Homo sapiens*, ARNm.
 REFERENCIA NM_017549
 VERSIÓN NM_017549.3 GI:116008437
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1  tccccctct taaaacacga tgcctcccag gatgctagtg gcaccactgc cactgcattt
61  cctgttgcca gcagtgcgca gtgaaaaccg aagcggcaga aggcagtggc agcaggcagt
121  ggcagcaggc agtggcccag gcagaaatag ctcccgcgag attcactgga gccttccccg
181  ggcctctggt ccggtaccg ggaactcgcc gtccggatct caaaagcggc agaggccacc
241  gaaggacag gaagcacttt ggtccagacc aactcccg cagagtgcgg aaagagccgg
301  cgggagccac tctgatcccg gaogcctcag cgcctcttg ggttgggt tgccctcggg
361  cgggggaagg ctgaccgcca tgcaggagc cgtccctc cgcaccgtcc cggggccct
421  ggggtgctgg ctgctggcg gcctctgggc ctggacctg tgggctgt gcagcctggg
481  ggcggtggga gcccgcgcc cgtgccaggc gccgcagcag tgggaggggc gccaggttat
541  gtaccagcaa agtagcgggc gcaacagccg cgcctgctc tctacgacg ggtccaacca
601  gcgcgtgcgg gtgctggacg agaggaaggc gctgatcccc tgcaagagat tatttgaata
661  tatttctctg tataaggatg gagtgatgtt tcagattgac caagccacca agcagtgtct
721  aaagatgacc ctgacacagc cctgggatcc tcttgacatt cctcaaaact ccacctttga
781  agaccagtac tccatcgggg ggcctcagga gcagatcacc gtccaggagt ggtcggacag
841  aaagtcatgt agatcctatg aaacctggat tggcatctat acagtcaagg attgctatcc
901  tgtccaggaa acctttacca taaactacag tgtgatattg tctacgctgt tttttgacat
961  ccagctgggt attaaagacc cctcggtgtt taccctcca agcacgtgcc agatggccca
1021  actggagaag atgagcgaag actgctctct gtgagcctgt gcatagggaa ggggcagcat
1081  cggatgtcag cccctgcgg cccagctgg agatggatat gagactagtc aagatgtgaa
1141  tgctaatttg agagaaatat aatttttaga agatgcacat tgatgtgggg ttttgatgtg
1201  tctgattttg actactcaag ctctgtttac agaagaaaat tgaatggcga ggggtgtggc
1261  atatgaactg actagatggc taatatggac actttgggta tttctaagtc ctgttcaggc
1321  ctggttttct gcatgcacgg gtatacacat aatgcagtgc catgcacata ggggaagggtc
1381  agtaagagaa gtttgccctg gcagcaagta tttattgttg acattattca gaattagtga
1441  taataaaaag cagagtgtat ttgggtcaat ttattattaa ttctaaatt cctgcagag
1501  aatgccccct ttattgtctc accagggttg gcattgtctc cactgagccc tactccccc
1561  tgtccctgca ctcccttggt tgccaaaaaa atgataactt aaatcccttc cagacttaag
1621  aatttttatgg catggcccaa ttgatataaa catttagaag gaaatgaaaa gctaaaatag
1681  gaagtaatta ttctctataa gaaacatttt gagcaaggca gtttagagaa tctaatgtc
1741  tacactggca tagcagcagc catgtaagct tcttttttt ctatgcaaga gtattgatgt
1801  atgtgtgaa tcttcacaga cttgtcaata cacaggcagt attctaaaat agcactgaac
1861  agggagtccag gagactattg tctcctaaac ccaggactag agttccctcg tactgtcact
1921  ccttttggtca ttaaatgcac tgggcttgcc cgcactttgg ccttctaga acactgtctc
1981  ataacctctc tgtctgactt ctgcatctcc ttccaggtea gctcattcac aagagtgtgt
2041  cccaagcctg gatgagttgc accttgcatc ttgagcatgc atttctcaca ataattatta
2101  agctgtgtga taatttctgc ttccaggaca ctcatccatt atcttggtg tgagctcctt
2161  gggtagcggg acctgtatg tttactttta tacccttagc acaaagcaag tgcctggcac
2221  atagtcatgt cctaagtat togtagatg agaagtgcca gcctctcttc tccctgggtt
2281  ccttatgtgt tgaatgtgtg tgagtttgtc cattgctagg gagagacttc cagtaataaa
2341  atttactatt ctagatgctt ctactgttat gttttatctg cccatttctc tttcttagtt
2401  accaggagaa atgtgtgaca cctatattat aatgaaaaca atctcattac ttatagttta
2461  tctatattaa acaaatttta ttgcatttta aagcattctt tgatactgtt gcttttgcaa
2521  taaatatgga taatcttggt tataaggag ttaaaacaat gctgtaataa ataaagtgtc
2581  tcatgtgatc aaaatcaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

Figura 1-9

IGF1R

LOCUS NM_000875 11242 pb ARNm lineal PRI 22-OCT-2007
 DEFINICIÓN Receptor de factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1R) de *Homo sapiens*, ARNm.
 REFERENCIA NM_000875 NM_015883
 VERSIÓN NM_000875.3 GI:119220593
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 tttttttttt ttttttttga gaaaggggaa tttcatccca aataaaagga atgaagtctg
61 gctccggagg agggcccccg acctcgctgt gggggctcct gtttctctcc gccgcgctct
121 cgtctctggc gacgagtggg gaaatctgcg ggccaggcat cgacatccgc aacgactatc
181 agcagctgaa gcgcctggag aactgcacgg tgatcgaggg ctacctccac atcctgctca
241 tctccaaggc cgaggactac cgcagctacc gcttccccaa gctcaaggte attaccgagt
301 acttgctgct gttccgagtg gctggcctcg agagcctcgg agacctcttc cccaacctca
361 cggtcacccg cggctggaaa ctcttctaca actacgccct ggtcatcttc gagatgacca
421 atctcaagga tattgggctt tacaacctga ggaacattac tcgggggggc atcaggattg
481 agaaaaatgc tgacctctgt tactctctca ctgtggactg gtccctgate ctggatgcgg
541 tgtccaataa ctacattgtg gggaataagc ccccaaagga atgtggggac ctgtgtccag
601 ggaccatgga ggagaagccg atgtgtgaga agaccaccat caacaatgag tacaactacc
661 gctgctggac caaaaaccgc tgcagaaaaa tgtgcccaag cacgtgtggg aagcggggct
721 gcaccgagaa caatgagtgc tgcaccccg agtgctggg cagctgcagc gcgcctgaca
781 acgacacggc ctgtgtagct tgcgcgcaact actactatgc cgggtgtctgt gtgcctgctt
841 gccgcgcccc cactacaggt tttgagggct ggcgctgtgt ggaccgtgac ttctgcgcca
901 acatcctcag cgcgagagac agcgactccg aggggtttgt gatccacgac ggcgagtgca
961 tgcaggagtg cccctcgggc ttcacccgca acggcagcca gagcatgtac tgcacccctt
1021 gtgaaggctc ttgcccgaag gtctgtgagg aagaaaagaa aacaaagacc attgattctg
1081 ttacttctgc tcagatgctc caaggatgca ccactctcaa gggcaatttg ctcatataca
1141 tccgacgggg gaataacatt gcttcagagc tggagaactt catggggctc atcgaggtgg
1201 tgacgggcta cgtgaagatc cgcattcttc atgccttggg ctcttgtctc ttctaaaaaa
1261 accttgcct catcctagga gaggagcagc tagaagggaa ttaactcttc taactcctcg
1321 acaaccagaa cttgcagcaa ctgtgggact gggaccaccg caacctgacc atcaaagcag
1381 ggaaaatgta ctttgccttc aatcccaaat tatgtgttct cgaaatttac cgcattggag
1441 aagtgcgggg gactaaaggg cgcacaagca aaggggacat aaacaccagg aacaacgggg
1501 agagagcctc ctgtgaaagt gacgtcctgc atttcacctc caccaccacg tcgaagaatc
1561 gcacatcatc aacctggcac cggtaaccgc cccctgacta cagggatctc atcagcttca
1621 ccgtttacta caaggaagca ccccttaaga atgtcacaga gtatgatggg caggatgcct
1681 cgggctccaa cagctggaac atggtggacg tggacctccc gcccaacaag gacgtggagc
1741 cgggcatctt actacatggg ctgaagccct ggactcagta cgcggtttac gtcaaggctg
1801 tgacctcac catggtggag aacgaccata tccgtggggc caagagttag atcttgtaca
1861 ttgcaccaa tgcctcagtt ccttcatttc ccttgacgt tctttcagca tcgaactcct
1921 cttctcagtt aatcgtgaag tggaaacctc cctctctgcc caacggcaac ctgagttact
1981 acattgtgcg ctggcagcgg cagcctcagg acggctacct ttaccggcac aattactgct
2041 ccaaagacaa aatcccatc aggaagtatg ccgacggcac catcgacatt gaggaggtca
2101 cagagaacct caagactgag gtgtgtggtg gggagaaagg gccttgetgc gcctgcccc
2161 aaactgaagc cgagaagcag gccgagaagg aggaggtgta ataccgcaaa gtctttgaga
2221 atttctgca caactccatc ttctgtccca gacctgaaag gaagcggaga gatgtcatgc
2281 aagtggccaa caccaccatg tccagccgaa gcaggaacac caccggcgca gacactaca
2341 acatcaccca cccggaagag ctggagacag agtacccttt ctttgagagc agagtggata
2401 acaaggagag aactgtcatt tctaaccttc ggcccttcac attgtaccgc atcgatatcc

```

Figura 1-10

```

2461 acagctgcaa ccacgaggct gagaagctgg gctgcagcgc ctccaacttc gtctttgcaa
2521 ggaatgatgc cgcagaagga gcagatgaca ttcttggggc agtgacctgg gagccaaggc
2581 ctgaaaaact catcttttta aagtggccgg aacctgagaa tcccaatgga ttgattctaa
2641 tgtatgaaat aaaatacggg tcacaagttg aggatcagcg agaattgtgtg tcacagacagg
2701 aatacaggaa gtatggaggg gccaaagctaa accgggctaaa cccgggggaac tacacagccc
2761 ggattcaggc cacatctctc tctgggaatg ggtcgtggac agatcctgtg ttcttctatg
2821 tccaggccaa aacaggatat gaaaacttca tccatctgat catcgtcttg cccgtcgtg
2881 tctgttgat cgtgggaggg ttggtgatta tctgtacgt ctccataga aagagaaata
2941 acagcaggct ggggaatgga gtgctgtatg cctctgtgaa cccggagtac ttcagcgtg
3001 ctgatgtgta agttctgat gagtgggagg ttgctcggga gaagatcacc atgagccggg
3061 aacttgggca ggggtcgttt gggatggtct atgaaggagt tgccaagggg gtggtgaaag
3121 atgaacctga aaccagagtg gccattaaaa cagtgaacga ggccgcaagc atgctgaga
3181 ggattgagtt tctcaaagaa gcttctgtga tgaaggagtt caattgtcac catgtggtgc
3241 gattgctggg tgtggtgtcc caaggccagc caacactggc catcatggaa ctgatgacac
3301 ggggogatct caaaagttat ctccggtctc tgaggccaga aatggagaat aatccagtc
3361 tagcaacctc aagcctgagc aagatgattc agatggccgg agagattgca gacggcatgg
3421 catacctcaa cgcacaataa ttctgtccaca gagaccttgc tgcccggaat tgcattgtag
3481 ccgaagattt ccacgtcaaa atcggagatt ttggtatgac gcgagatata tatgagacag
3541 actattaccg gaaaggaggg aaagggtgc tgcccggtgc ctggatgtct cctgagtc
3601 tcaaggatgg agtcttcaac acttaactcg acgtctggtc ctccgggtgc gtctctggg
3661 agatgccac actggccgag cagccctacc agggcttgtc caacgagcaa gtctctgct
3721 tctcatgga gggcggcctt ctggacaagc cagacaactg tctgacatg ctgtttgaac
3781 tgatgogcat gtgctggcag tataacccca agatgaggcc ttcttctctg gagatcatca
3841 gcagcatcaa agaggagatg gagcctggct tccgggaggt ctcttctac tacagcgagg
3901 agaacaagct gcccgagccg gaggagctgg acctggagcc agagaacatg agagcgtcc
3961 cctgggaccc ctggcctcc tctgtctccc tgccactgcc cgcagacac tcaggacaca
4021 aggcgagaaa cggcccccgg cctggggtgc ttgctctccg cgcagcttc gacgagagac
4081 agccttaagc ccacatgaac gggggccgca agaaccgagc ggcttgcgc ctgccccagt
4141 cttegacctg ctgaccttg gatcctgaat ctgtgcaaac agtaacgtgt gcgcacgcgc
4201 agcggggtgg ggggggagag agagttttta caatccattc acaagcctcc tgtacctcag
4261 tggatcttca gaaactgccc tctgtcccgc gggagacagc ttctctgcag taaaacacat
4321 ttgggatggt ccttttttca atatgcaagc agctttttat tccctgccc aaccttaac
4381 tgacatgggc ctttaagaac cttaatgaca acacttaata gcaacagagc acttgagaac
4441 cagtctctc actctgtccc tgtcttccc tgttctccct ttctctctcc tctctgcttc
4501 ataacggaaa aataattgcc acaagtccag ctgggaagcc ctttttatca gtttgaggaa
4561 gtggtgtccc ctgtggcccc atccaaaccac tgtacacacc cgcctgacac cgtgggtcat
4621 tacaaaaaaa caagtggaga tggaaatttt taactttatc ttccaccttt ctaggacat
4681 gaaattttaca aagggccatc gttcatccaa ggtgttacc attttaagc tgctaattt
4741 tgccaaaatc ctgaaacttc tccctcatcg gcccgccgct gatctctgt gtccggaggc
4801 atgggtgagc atggcagctg gttgctccat ttgagagaca cgtggcgac acactccgtc
4861 catecgactg cccctgctgt gctgctcaag gccacaggca cacaggcttc attgcttctg
4921 actagattat tatttggggg aactggacac aataggctct tctctcagtg aagtgggga
4981 gaagctgaac cggcttccct gccctgctc cccagcccc tgcccaacc ccaagaatct
5041 ggtggocatg ggccccgaag cagcctggcg gccaggttg gagtcaaggg gccccatgcc
5101 tcttctctc ccagccccag ctcccccgcc cgccccaag gacacagatg ggaaggggtt
5161 tccagggaat cagccccact gttgatgcag gtttgcaagg aaagaaatc aaacaccaca
5221 acagcagtaa gaagaaaagc agtcaatgga ttcaagcatt ctaagctttg ttgacatttt
5281 ctctgttct aggaacttct catgggtctt acagttctat gttagaccat gaaacatttg
5341 catacacatc gtctttaatg tcaactttat aactttttta cggttcagat attcatctat
5401 acgtctgtac agaaaaaaa aagctgctat ttttttgggt ctgtatcttt gtggatttaa
5461 tctatgaaaa ccttcaggtc caccctctcc cctttctgct cactccaaga aacttcttat
5521 gctttgtaac agagtgcgtg actttcttcc tcttttcccg gtaatggata cttctatcac
5581 ataatttgcc atgaactgtt ggatgccttt ttataaatac atccccatc cctgctccca

```

Figura 1-11

```

5641 cctgccccctt tagttgtttt ctaaccocgta ggctctcttg gcacgaggca gaaagcaggc
5701 cgggcaccca tcoctgagagg gcgcgcctcc tctccccagc ctgcccctcac agcattggag
5761 cctgttacag tgoaagacat gatacaaaot caggtcagaa aaacaaaggc taaatatctc
5821 acacgtcttt gttcagtggt tccactcacc gtggttgaga agcctcacc cctctttccc
5881 ttgcctttgc ttaggttggt acacacatat atatatattt ttttaattct tgggtacaac
5941 agcagtggtta accgcagaca ctaggcattt ggattactat tttctttaat ggctatttaa
6001 tctttccatc ccacgaaaaa cagctgctga gtccaaggga gcagcagagc gtggtcgggc
6061 agggcctggt gtggccctcg ccacccccc caccggaccg actgaacctg ctttggaaac
6121 agaacatccc aagggaactc ctctgcactg gcgttgagtg ggaccccggg atccaggctg
6181 gccaggggcg gcacccctcag ggctgtgccc gctggagtgc taggtggagg cagcacagac
6241 gccagggtgg cccaagagcc cctttgcttc ttgctggggg accagggtcg tgggtctggc
6301 ccactttccc tggccaggga atccaggctc ttggggccca ggggtcttgt cttgtttcat
6361 ttttagcact tctcaccaga gagatgacag cacaagagtt gottctggga tagaaatggt
6421 taggagtaag aacaaagctg ggatacgggtg attgctagtt gtgactgaag attcaacaca
6481 gaaaagaaag tttatacggc ttttttgctg gtcagcagtt tgtcccactg cttctcttag
6541 tctctatccc atagcgtggt ccccttaaaa aaaaaaaaaa ggtattatat gtaggagttt
6601 tcttttaatt tattttgtga taaattacca gtttcaatca ctgtagaaaa gccccattat
6661 gaatttaaat ttcaaggaaa ggggtgtgtg gtgtgtatgt gtgggggtgtg tgtgtgtgag
6721 agtgatggga cagttcttga ttttttgggt tttttttccc ccaaacattt atctacctca
6781 ctcttatttt ttatatgtgt atatagacaa aagaatacat ctacaccttc tcagcacctg
6841 acaataggcc gttgatactg gtaacctcat ccacgccaca ggcgccacac ccagggtgatg
6901 caggggggaag ccaggctgta ttccgggggc aaagcaacac taactcacct ctctgctcat
6961 ttccagacagc ttgccttttt ctgagatgct ctggtttgtg ttgctttttt tgttttgggt
7021 tctatcttgg tttccaccaa ggtgttagat ttctctctct cctagccagg tggccctgtg
7081 aggccaacga gggcaccaga gcacacctgg gggagccacc aggcctgtcc tgggtgggtg
7141 tctttggaac aaactgcttc tgtgcagatg gaatgaccaa cacatttctg ccttaagaga
7201 gcagtggttc ctcaggttct gaggagagga aggtgtccag gcagcaccat ctctgtgcga
7261 atccccaggg taaaggcgtg gggcattggg tttgtctccc ttgtctgtgc tccatccctg
7321 caggaggctc gcgctgaggc aggaacctgc ggccatggtg gctgcattca ttgagcacaa
7381 aggtgcagct gcagcagcag ctggagagca agagtccacc agcctgtgcg ccagaatgca
7441 gaggtcctcg acctcacagc cagtccctga tagaacacac gcaggagcag agtccctcc
7501 cctccagggc tgcctctcca acttctccct cactcccttc cctaggggta gacagagatg
7561 taccaaacct tccggctgga aagcccagtg gccggcgccg aggcctgtgg cgtcacgccc
7621 cccccgccag ggtgttacct ccgtctccct ggtcctgctg ctacacaggc agacggctcg
7681 ctccctctct ccagcagctg ctcttacagg cactgatgat ttccgtggga agtggtggcg
7741 gcagctttgc ctaagcgtgg atggctcctc ggcaattcca gcttaagtga aggcgctcag
7801 gagcctcctg ctggaacggc acctatctct cccaggaccc cggggatott aaggtcattg
7861 agaaatactg ttggatcagg gttttgttct tccacactgt aggtgacccc ttggaataac
7921 ggctctctct ctggtgcaca tacctacogg tttccacaa cggatttota cagatcatte
7981 agctggttat aagggttttg tttaaactgt ccgagttact gatgtcattt tgtttttgtt
8041 ttatgtaggt agcttttaag tagaaaacac taacagtgtg gtgcccacac tagcaaatgc
8101 ttccagaaaca cctcaataaa agagaaaaact tggcttgtgt gatggtgcag tcaactttact
8161 ggaccaaccc acctaccttg actataccaa ggcacatct atccacagtt ctagcctaac
8221 ttcatgctga tttctctgcc tcttgatttt ttctgtgtgt ttccaaataa tcttaagctg
8281 agttgtggca ttttccatgc aacctccttc tgcagcagc tcacactgct tgaagtcata
8341 tgaaccactg aggcacatca tggaaattgat gtgagcatta agacgttctc ccacacagcc
8401 ctcccttgag gcagcaggag ctggtgtgta ctggagacac tgttgaaott gatcaagacc
8461 cagaccaccc caggctctct tctgggatg tcatgacgtt tgacatacct ttggaacgag
8521 cctcctcctt ggaagatgga agacctgtt cgtggccgac ctggcctctc ctggcctggt
8581 tcttaagatg cggagtcaca tttcaatggt acgaaaagtg gcttcgtaaa atagaagagc
8641 agtcactgtg gaactaccaa atggcgagat gctcgggtgc cattgggggtg ctttgggata
8701 aaagatttat gagccaacta ttctctggca ccagattcta ggccagtttg ttccactgaa
8761 gcttttccca cagcagtcac cctctgcagg ctggcagccg aatggcttgc cagtggctct

```

Figura 1-12

```

8821 gtggcaagat cacaactgaga tcgatgggtg agaaggctag gatgcttgto tagtgttctt
8881 agctgtcacg ttggctcctt ccagggtggc cagacgggtg tggccactcc cttctaaaac
8941 acaggcgccc tcttggtgac agtgaccgc cgtggtatgc cttggcccat tccagcagtc
9001 ccagttatgc atttcaagtt tggggtttgt tcttttcgtt aatgttcttc tgtgttgta
9061 gctgtcttca tttcctgggc taagcagcat tgggagatgt ggaccagaga tccactcctt
9121 aagaaccagt ggcgaaagac actttctttc ttcactctga agtagctggt ggtacaaatg
9181 agaacttcaa gagaggatgt tattttagact gaacctctgt tgccagagat gctgaagata
9241 cagaccttgg acaggtcaga gggtttcatt tttggccttc atcttagatg actgggtgcg
9301 tcatttggag aagtgagtgc tcttgatgg tggaatgacc ggggtggtggg tacagaacca
9361 ttgtcacagg gatcctggca cagagaagag ttacgagcag cagggtgcag ggcttggaag
9421 gaatgtgggc aagggttttg acttgattgt tcttgaagct atcagaccac atcgaggctc
9481 agcagtcato cgtgggcatt tggtttcaac aaagaaacct aacatcctac tctggaaact
9541 gatctcggag ttaaggcgaa ttgttcaaga acacaaacta catcgactc gtcagttgtc
9601 agttctgggg catgacttta gcgttttgtt tctgcgagaa cataacgata actcattttt
9661 atgtccacag tgtgtgtgtc cgcactcttc tggccaacat tgttttaact agtcactcat
9721 tagcgttttc aatagggtc ttaagtccag tagattacgg gtagtcagtt gacgaagatc
9781 tggtttacaa gaactaatta aatgtttcat tgcatttttg taagaacaga ataattttat
9841 aaaatgtttg tagtttataa ttgccgaaaa taatttaaag acactttttt tttctctgtg
9901 tgtgcaaatg tgtgtttgtg atccattttt tttttttttt tttaggacac ctgtttacta
9961 gctagcttta caatatgcca aaaaaggatt tctcctgac cccatccgtg gttcacctc
10021 ttttcccccc atgctttttg ccttagttta taacaaagga atgatgatga tttaaaaagt
10081 agttctgtat cttcagttat ttggtcttcc agaaccctct ggttgggaag gggcatttt
10141 tttactgggc atttcccttt ggagtgtagc tactttaaca gatggaaaag acctcattgg
10201 ccattggaaac agccgaggtg ttggagccca gcagtgcag gcaccgttcg gcatctggct
10261 tgattgggtc ggttgccgtc attgtcagca cagtgccatg gacatgggaa gacttgactg
10321 cacagccaat ggttttcatg atgattacag catacacagt gatcacataa acgatgacag
10381 ctatggggca cacaggccat ttgcttacat gctcgtatc atgactgatt actgctttgt
10441 tagaacacag aagagaccct attttattta aggcagaacc ccgaagatac gtatttccaa
10501 tacagaaaag aatttttaat aaaaaactata acatacacaa aaattgggtt taaagttgac
10561 tccacttctt ctaactccag tggattgttg gccatgtct cccaactcca caatatctct
10621 atcatgggaa acacctgggg tttttgcgct acataggaga aagatctgga aactatttgg
10681 gttttgtttt caacttttca tttggatgtt tggcgttgca cacacacatc caccggtgga
10741 agagaogccc ggtgaaaaaa cctgtctgct ttctaagcca gtgaggttga ggtgagaggt
10801 ttgccagagt ttgtctacct ctgggtatcc ctttgtctgg gataaaaaaa atcaaaccag
10861 aaggcgggat ggaatggatg caccgcaaat aatgcatttt ctgagttttc ttgttaaaaa
10921 aaaatttttt taagtaagaa aaaaaagggt aataacatgg ccaatttgtt acataaaatg
10981 actttctgtg tataaattat tcttaaaaaa tctgttttat ataaaaaatc agtagatgaa
11041 aaaaatttca aaatgttttt gtatatctct ttgtaagaat ttattcctgt tattgcgata
11101 tactctggat tctttacata atggaaaaaa gaaactgtct attttgaatg gctgaagcta
11161 aggcaacggt agtttctctt actctgcttt tttctagtaa agtactacat ggtttaagtt
11221 aaataaaata attctgtatg ca

```

Figura 1-13

BTG2

LOCUS NM_006763 2718 pb ARNm lineal PRI 25-SEP-2007
 DEFINICIÓN Familia de BTG de *Homo sapiens*, miembro 2 (BTG2), ARNm.
 REFERENCIA NM_006763
 VERSIÓN NM_006763.2 GI:28872718
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 cagggttaacg ctgtcttgtg gacccgcact tcccaccoga gacctctcac tgagcccgag
61 ccgcgcgcga catgagccac gggaagggaa ccgacatget ccgcgcgcgc gccgcgcgcg
121 tgggcttccct ctcagccctc ctgaggaccc ggggctgcgt gagcgcgcag aggccttaagg
181 tcttcagcgg ggcgcctccag gaggcactca cagagcacta caaacaccac tgggttcccg
241 aaaagccgtc caagggctcc ggctaccgct gcattcgcat caaccacaag atggacccca
301 tcatcagcag ggtggccagc cagatcggac tcagccagcc ccagctgcac cagctgctgc
361 ccagcgagct gacctgtgg gtggacccct atgaggtgtc ctaccgcatt ggggaggacg
421 gctccatctg cgtcttgtac gagggagccc cactggccgc ctctgtggg ctctcacct
481 gcaagaacca agtgctgctg ggccggagca gcccctccaa gaactacgtg atggcagctc
541 ccagctaggg ccttcgcgcc ccgcctggg cgcgcgcgtg ctcatgctgc cgtgacaaca
601 ggccaccaca taectcaacc tggggaactg tatttttaaa tgaagagcta tttatatata
661 ttattttttt ttaagaaagg aggaaaagaa accaaaagtt ttttttaaga aaaaaaatcc
721 ttcaagggag ctgcttggaa gtggcctccc caggtgcctt tggagagAAC tgttgcgtgc
781 ttgagctgtg gagccagtgt ctgcctatag gagggggagc tgttagggg tagacctagc
841 caaggagaag tgggagacgt ttggctagca cccaggaag atgtgagagg gagcaagcaa
901 ggtagcaac tgtgaacaga gaggtcggga tttgcctgg gggaggaaga gaggccaagt
961 tcagagctct ctgtctcccc cagccagaca cctgcctccc tggctcctct attactcagg
1021 ggcattcatg cctggactta aacaatacta tgttatcttt tcttttattt ttctaattgag
1081 gtccctggga gagagtgaag aggcctctcc tgattcctac tgtcctaagc tgcctttctt
1141 gaaatcatga cttgtttcta attctacct caggggcctg tagatgttgc tttccagcca
1201 ggaatctaaa gctttgggtt ttctgagggg ggggaggagg gaactggagg ttattggggg
1261 taggatggaa ggggaactct cacaataact ttgctttgct agtgcctgt tttgtgtatg
1321 tgtggcaaat aatttggggg tgatttgcaa tgaaattttg ggacccaaag agtatccact
1381 ggggatgttt tttggccaaa actcttccct ttggaaccac atgaaagtct tgatgctgct
1441 gccatgatcc ctttgagagg ttgctcaaaa gctacaggga actccaggtc ctttattact
1501 gccttctttt caaaagcaca actctcctct aaccctcccc tccccctcc cttctggctg
1561 ggcatagag ctaccgtatt ttctaggaca agagtctctc gtcactgtgc aatatgcccc
1621 ctgggtccca ggagggtctg gaggaaaact ggctatcaga aacctctgat gccctgggtg
1681 gcttagggaa ccctctctcc tgcctcctct gggatgatgg ctggctagtc agccttgcat
1741 gtattccttg gctgaatggg agagtgcctc atgttctgca agactacttg gtattcttgt
1801 agggccgaca ctaaataaaa gccaaaacct gggcactgtt tttctcctt ggtgctcaga
1861 gcacctgtgg gaaaggttgc tgtctgtctc agtacaatcc aaatttgtcg tagacttgtg
1921 caatatatac tgttgtgggt tggagaaaag tggaaagcta cactgggaag aaactccctt
1981 ccttcaattt ctcaagtaca ttgatgaggg gtcccaaaa gacctcgagt ttcccaaac
2041 gaatcaactt aagaaggaca gggctagggc atttggccag gatggccacc ctctgctgtg
2101 tgcctcttag tgaggaatct tcacccccact tctctacccc ccagggtctc ctccccacag
2161 ccagtcctct tctctggatt tctaaaactgc tcaattttga ctcaaagggt ctattttacca
2221 aacactctcc ctaccatctc ctgcccagtc tgcctccttt tcaactctcc acattttgta
2281 ttgccttccc agacctgctt ccagtcttta ttgcttttaa gttaactttg ggccacaga
2341 cccaagagct aattttctgg tttgtgggtt gaaacaaagc tgtgaatcac tgcaggctgt
2401 gttcttgcac cttgtctgca aacaggctcc tgccttttta gaagcagcct catggctcga

```

Figura 1-14

```
2461 tgettaatct tgtctctctt ctctctcttta tgatgttcac tttaaaaaca acaaaacccc
2521 tgagctggac tgttgagcag gcctgtctct cctattaagt aaaaataaat agtagtagta
2581 tgtttgtaag ctattctgac agaaaagaca aaggttacta attgtatgat agtggtttta
2641 tatggaagaa tgtacagctt atggacaaat gtacaccttt ttgttacttt aataaaaatg
2701 tagtaggata aaaaaaaaa
```

Figura 1-15

LMO2

LOCUS NM_005574 2304 pb ARNm lineal PRI 30-SEP-2007
 DEFINICIÓN Solo dominio 2 de LIM (similar a rombotina 1) (LMO2) de *Homo sapiens*, ARNm.
 REFERENCIA NM_005574
 VERSIÓN NM_005574.2 GI:6633806
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 gaattegtcc aaactgagga tcacaagtct ccacattctg agtaggagga tgaggggtctg
61 agttaggatt tgggtcctgc agggcttgc tgaaggaatccc ctgatggcct aggattccac
121 gcagagcaca tctggtgtga gagagctcgc tgcaagggtg aaggctccgc cctatcagat
181 agacaaccag gccaccaaga gggccagccc tccaaaccct ggatttgcaa catcctcaaa
241 gaacagcaac gggccttgag cagaattgag aaggaaatac cccacctgc cctcagccgt
301 taagtgggct ttgctattca caagggcctc tgggtgtcct ggcagagagg ggagatggca
361 caggcaccag gtgctagggt gccagggcct cccgagaagg aacagggtgca aagcaggcaa
421 ttagcccaga aggtatccgt ggggcaggca gcctagatct gatgggggaa gccaccagga
481 ttacatcatc tgctgtaaca actgctctga aaagaagata tttttcaacc tgaacttgca
541 gtagctagtg gagaggcagg aaaaaggaaa tgaaacagag acagagggaa gcctgagcca
601 aaatagacct tcccagaga ggaggaagcc cggagagaga cgcacggctc cctccccgc
661 cctagggcgc cggccctct ctgcctcgg cggcgagcag ggcgcgcga cccggggcgc
721 gaaaggtgcc aggggctccg ggcggccggg cggcgccaca ccatccccgc gggcggcgcg
781 gagccggcga cagcgcgga gagggaccgg gcggtggcgg cggcgggacc gggatggaag
841 ggagcgcggt gactgtcctt gagcgcgga ggcgagctc gccggcgga gccgagcaag
901 cggaggcagg agcggcgcg acggcgcggc cggcgcggc gcccgagcac ccgaggggggt
961 ccgagccccg gcagccggcc agccccgcgc cacaaaggga gcgccccgc cgcggcgcac
1021 cccgctccc tccccaatgt cctcgcccat cgaaaggaa agcctggacc cttcagagga
1081 accagtggat gaggtgctgc agatcccccc atccctgctg acatgcgcg gctgccagca
1141 gaacatggg gaccgctact tcctgaaggc catcgaccag tactggcac aggaactgct
1201 gagctgcgac ctctgtggct gccggctggg tgaggtgggg cggcgctct actacaaact
1261 gggccggaag ctctgccgga gagactatct caggcttttt gggcaagacg gtctctgcgc
1321 atcctgtgac aagcggattc gtgcctatga gatgacaatg cgggtgaaag acaaagtgt
1381 tcacctggaa tgtttcaagt gcgcgcctg tcagaagcat ttctgtgtag gtgacagata
1441 cctcctcatc aactctgaca tagtgtgaga acaggacatc tacgagtgga ctaagatcaa
1501 tgggatgata taggcccag tccccgggca tctttgggga ggtgttact gaagacgcgc
1561 tctccatggc atcttcgtct tcactcttag gcactttggg ggtttgaggg tggggtaagg
1621 gatttcttag gggatggtag acctttattg ggtatcaaga catagcatcc aagtggcata
1681 attcaggggc tgacacttca aggtgacaga aggaccagcc cttgagggag aaotttatggc
1741 cacagcccat ccatagtaac tgacatgatt agcagaagaa aggaacattt aggggcaagc
1801 aggcgctgtg ctatcatgat ggaatttcat atctacagat agagagttgt tgtgtacaga
1861 cttgttgtga ctttgacgct tgcgaactag agatgtgcaa ttgatttctt ttcttctggt
1921 ctttttaact cccctgttct aatcactgtc ctccacacaa ggggaaggaca gaaaggagag
1981 tggccattct tttttcttg gcccccttcc caaggcctta agctttggac ccaagggaaa
2041 actgattgga gacgcatttc ggttgagaat ggaaaccaca acttttaacc aaacaattat
2101 ttaaagcaat gctgatgaat cactgttttt agacaccttc attttgaggg gaggagttcc
2161 acagattggt tctatacaaa tataaatctt aaaaagttgt tcaaotattt tattatccta
2221 gattatatca aagtatttgt cgtgtgtaga aaaaaaaaaa agctctgcag gcttaataaa
2281 aatgacagac tgaaaaaaaaa aaaa

```

Figura 1-16

CD79B

LOCUS NM_000626 1300 pb ARNm lineal PRI 21-SEP-2008
 DEFINICIÓN Molécula CD79b de *Homo sapiens*, variante de transcrito
 1 beta asociado a inmunoglobulina, ARNm.
 REFERENCIA NM_000626
 VERSIÓN NM_000626.2 GI:90193589

```

1 ctgcagccgg tgcagttaca cgttttccct caaggagcct cggacgttgt caccgggttg
61 gggtcgggga cagagcgggt accatggcca ggctggcgtt gtctcctgtg cccagccact
121 ggatggtggc gttgctgctg ctgctctcag ctgagccagt accagcagcc agatcggagg
181 accggtaccg gaatcccaaa ggtagtgcct gttcgcggat ctggcagagc ccacgtttca
241 tagccaggaa acggggcttc acggtgaaaa tgcactgcta catgaacagc gcctccggca
301 atgtgagctg gctctggaag caggagatgg acgagaatcc ccagcagctg aagctggaaa
361 agggcccgcat ggaagagtc cagaacgaat ctctcgccac cctcaccatc caaggcatcc
421 ggtttgagga caatggcacc tacttctgtc agcagaagtg caacaacacc tcggaggtct
481 accagggctg cggcacagag ctgcgagtc tgggattcag caccctggca cagctgaagc
541 agaggaacac gctgaaggat ggtatcatca tgatccagac gctgctgac atcctcttca
601 tcatcgtgac tatcttctct ctgctggaca aggatgacag caaggctggc atggaggaag
661 atcacacctc cgagggcctg gacattgacc agacagccac ctatgaggac atagtgacgc
721 tgccgacagg ggaagtgaag tggctctgtg gtgagcacc aggccaggag tgagagccag
781 gtccgcccat gacctgggtg caggctccct ggcctcagtg actgcttcgg agctgcctgg
841 ctcattggcc aacccttctc ctggaccccc cagctggcct ctgaagctgg cccaccagag
901 ctgccatttg tctccagccc ctggctccca gctcttgcca aagggcctgg agtagaagga
961 caacagggca gcaacttggg gggagttctc tggggatgga cgggacccag ccttctgggg
1021 gtgctatgag gtgatccgtc cccacacatg ggatggggga ggcagagact ggtccagagc
1081 ccgcaaatgg actcggagcc gagggcctcc cagcagagct tgggaagggc catggacca
1141 actgggcccc agaagagcca caggaacatc attcctctcc cgcaaccact cccacccag
1201 ggaggccctg gctccagtg ccttcccccg tggataaac ggtgtgtcct gagaaaccac
1261 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

Figura 1-17

CD44

LOCUS NM_000610 5748 pb ARNm lineal PRI 23-OCT-2008
 DEFINICIÓN Molécula CD44 (grupo sanguíneo Indio) (CD44) de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1, ARNm.
 REFERENCIA NM_000610
 VERSIÓN NM_000610.3 GI:48255934

```

1  gagaagaaag ccagtgcgtc tctgggcgca ggggccagtg gggctcggag gcacaggcac
61  cccgcgacac tccaggttcc ccgacccaag tccctggcag ccccgattat ttacagcctc
121 agcagagcac ggggcggggg cagaggggoc cgcccgaggag ggctgctact tottaaaacc
181 tctgcgggct gcttagtcac agcccccctt gcttgggtgt gtccttgcct cgtccctcc
241 ctccgtctta ggteactggt ttcaacctcg aataaaaact gcagccaact tccgaggeag
301 cctcattgcc cagcggaccc cagcctctgc caggttcggt cggccatcct cgtcccgctc
361 tccgcgggcc cctgccccgc gccagggat cctccagctc ctttcgcccg cgccctcgt
421 tcgctccgga caccatggac aagttttggt ggcacgcagc ctggggactc tgcctcgtgc
481 cgctgagcct ggcgagatc gatttgaata taacctgcgc ctttcaggtt gtattccacg
541 tggagaaaaa tggtcgctac agcatctctc ggaaggaggc cgtgacctc tgcaaggctt
601 tcaatagcac cttgccaca atggcccaga tggagaaagc tetgagcctc ggatttgaga
661 cctgcaggta tgggttcata gaagggcacg tggtgattcc cgggatccac cccaactcca
721 totgtgcagc aaacaacaca ggggtgtaca tctcacatc caacacctcc cagtatgaca
781 catattgctt caatgcttca gctccacctg aagaagattg tacatcagtc acagaacctgc
841 ccaatgcctt tgatggacca attaccataa ctattgttaa cgtgatggc acccgctatg
901 tccagaaagg agaatacaga acgaatcctg aagacatcta cccagcaac cctactgatg
961 atgacgtgag cagcggctcc tccagtgaag ggagcagcac ttcaggaggt tacatctttt
1021 acaccttttc tactgtacac cccatcccag acgaagacag tccctggatc accgacagca
1081 cagacagaat cctgctacc actttgatga gcactagtgc tacagcaact gagacagcaa
1141 ccaagaggca agaaacctgg gattggtttt catggttggt totaccatca gagtcaaaga
1201 atcatcttca cacaacaaca caaatggctg gtacgtcttc aaataccatc tcagcaggct
1261 gggagccaaa tgaagaaaat gaagatgaaa gagacagaca cctcagtttt tctggatcag
1321 gcattgatga tgatgaagat tttatctcca gcaccatttc aaccacacca cgggcttttg
1381 accacacaaa acagaaccag gactggaccc agtggaaacc aagccattca aatcoggaag
1441 tgctacttca gacaaccaca aggatgactg atgtagacag aaatggcacc actgcttatg
1501 aaggaaaactg gaaccagaa gcacacctc cctcattca ccatgagcat catgaggaag
1561 aagagacccc acattctaca agcacaatcc aggcactcc tagtagtaca acggaagaaa
1621 cagctaccca gaaggaacag tggtttggca acagatggca tgagggatat cgccaaacac
1681 ccaaagaaga ctcccattcg acaacaggga cagctgcagc ctgagctcat accagccatc
1741 caatgcaagg aaggacaaca ccaagcccag aggcaggttc ctggactgat ttcttoaacc
1801 caatctcaca ccccatggga cgaggctatc aagcaggaag aaggatggat atggactcca
1861 gtcatagtat aacgcttcag cctactgcaa atccaaacac aggtttgggtg gaagatttgg
1921 acaggacagg acctctttca atgacaacgc agcagagtaa ttctcagagc ttctctacat
1981 cacatgaagg cttggaagaa gataaagacc atccaacaac ttctactctg acatcaagca
2041 ataggaatga tgtcacaggt ggaagaagag acccaaatca ttctgaaggc tcaactactt
2101 tactggaagg ttatacctct cattacccac acacgaagga aagcaggacc ttcattcccag
2161 tgacctcagc taagactggg tcttttggag ttactgcagt tactgttggg gattccaact
2221 ctaatgtcaa tcgttccctt tcaggagacc aagacacatt ccaccccagt ggggggtccc
2281 ataccactca tggatctgaa tcagatggac actcacatgg gagtcaagaa ggtggagcaa
2341 acacaacctc tggctctata aggacacccc aaattccaga atggctgatc atcttggcat
2401 cctctctggc cttggctttg attcttgcag tttgcattgc agtcaacagt cgaagaagggt
2461 gtgggcagaa gaaaaagcta gtgatcaaca gtggcaatgg agctgtggag gacagaaagc
2521 caagtggact caacggagag gccagcaagt ctcaggaaat ggtgcatttg gtgaacaagg
2581 agtcgtcaga aactccagac cagtttatga cagctgatga gacaaggaac ctgcagaatg
2641 tggacatgaa gattgggggt taacaacctc accattatct tggaaagaaa caacogttgg

```

Figura 1-18

```

2701 aaacataacc attacagggg gctggggacac ttaacagatg caatgtgcta ctgattgttt
2761 cattgcgaat ctttttttagc ataaaatttt ctactctttt tgttttttgt gttttgtttc
2821 ttaaagtcag gtccaatttg taaaaacagc attgttttct gaaattaggg cccaattaat
2881 aatcagcaag aatttgatcg ttccagttcc cacttggagg cctttcatcc ctcggtgtg
2941 ctatggatgg cttotaacaa aaactacaca tatgtattcc tgatcgccaa cctttccccc
3001 accagctaag gacatttccc aggggttaata gggcctggtc cctggggagg aatttgaatg
3061 ggtccatttt gcccttccat agcctaattc ctgggcattg ctttccaatg aggttggggg
3121 ttgggggtgta ctagttaaac atottcaaca gacccctctc agaaattttt cagatgcttc
3181 tgggagacac ccaaaggggt agctatttta tctgtagtaa actattttatc tgtgtttttg
3241 aaatattaaa ccttggatca gtcttttgat cagtataatt ttttaaagtt actttgtcag
3301 aggcacaaaa ggggtttaaac tgattcataa taaatatctg tactttctcg atcttcacct
3361 tttgtgctgt gattcttcag tttctaaacc agcactgtct gggtccttac aatgtatcag
3421 gaagagctga gaatggtaag gagactcttc taagtcttca tctcagagac cctgagttcc
3481 cactcagacc cactcagcca aatctcatgg aagaccaagg agggcagcac tgtttttgtt
3541 ttttgttttt tgtttttttt ttttgacact gtocaaaggt tttccatctc gtcttggaa
3601 cagagttgga agctgaggag ctccagcctc ttttatgggt taatggccac ctgttctctc
3661 ctgtgaaagg ctttgcaaaag tcacattaag tttgcatgac ctgttatccc tggggcccta
3721 tttcatagag gctggcccta ttagtgattt ccaaaaacaa tatggaagtg ccttttgatg
3781 tcttacaata agagaagaag ccaatggaaa tgaaagagat tggcaaaggg gaaggatgat
3841 gccatgtaga tctgttttga cttttttatg gctgtatttg taaacttaaa cacaccagt
3901 tctgttcttg atgcagttgc tatttaggat gagttaagtg cctggggagt cctcaaaa
3961 gttaaaggga ttcccatcat tggaaattta tcaccagata ggcaagttta tgaccaaaca
4021 agtaggtaact ggcttttatcc tctaactcca tattttctcc cacttggcaa gtcttttgtg
4081 gcattttatc atcagtcagg gtgtccgatt ggtcctagaa cttccaaagg ctgcttgtca
4141 tagaagccat tgcattctata aagcaacggc tctgtttaa tggtatctcc tttctgaggc
4201 tctactaaa agtcatttgt taactaaact tatgtgetta acaggcaatg cttctcagac
4261 cacaaagcag aaagaagaag aaaagctcct gactaaatca gggctgggct tagacagagt
4321 tgatctgtag aatatcttta aaggagagat gtcaactttc tgcactatcc ccagcctctg
4381 ctctcctctg tctaccctct cccctcctcc tctcctcca cttcccccac caatcttgaa
4441 aaacttccct tctcttctgt gaacatcatt ggccagatcc attttcagtg gtctggattt
4501 ctttttatct tcttttcaac ttgaaagaaa ctggacatta ggccactatg tgttgttact
4561 gccactagtg ttcaagtgc tcttgttttc ccagagattt cctgggtctg ccagaggccc
4621 agacaggctc actcaagctc tttaactgaa aagcaacaag ccactccagg adaaggttca
4681 aaatggttac aacagcctct acctgtgcgc ccaggagaaa aggggtagtg atacaagtct
4741 catagccaga gatggttttc cactccttct agatattccc aaaaagaggc tgagacagga
4801 ggttattttc aattttatct tggaaataaa tactttttc cttttattac tgttgtagtc
4861 cctcacttgg atatacctct gttttcaaga tagaaataag ggaggtctag agcttctatt
4921 ccttggccat tgtcaacgga gagctggcca agtcttcaca aaccttggca acattgcctg
4981 aagtttatgg aataagatgt attctcactc ccttgatctc aagggggtaa ctctggaagc
5041 acagcttgac tacacgtcat ttttaccat gattttcagg tgacctgggc taagtcattt
5101 aaactgggtc tttataaaa taaaaggcca acatttaatt attttgcaaa gcaacctaa
5161 agctaaagat gtaatttttc ttgcaattgt aaatottttg tgtctctga agacttccct
5221 taaaatttagc tctgagtga aaatcaaaa agacaaaaga catcttcgaa tccatatttc
5281 aagcctggta gaattggctt ttotagcaga acccttccaa aagttttata ttgagattca
5341 taacaacacc aagaattgat tttgtagcca acattcattc aatactgtta tatcagagga
5401 gtaggagaga ggaaacattt gacttatctg gaaaagcaaa atgtacttaa gaataagaat
5461 aacatggctc attcaccctt atgttataga tatgtctttg tgtaaactat ttgttttgag
5521 ttttcaaaga atagccattt gtccattctt gtgctgtaca atgaccactg ttattgttac
5581 tttgactttt cagagcacac ccttctctct gtttttgtat atttattgat ggatcaataa
5641 taatgaggaa agcatgatat gtatattgct gagttgaaag cacttatttg aaaaatttaa
5701 aaggctaaca ttaaaagact aaaggaaaca gaaaaaaa aaaaaaaa

```

Figura 1-19

CTSC

LOCUS NM_001814 1924 pb ARNm lineal PRI 06-ABR-2008
 DEFINICIÓN Catepsina C (CTSC) de *Homo sapiens*, variante de transcrito 1, ARNm.
 REFERENCIA NM_001814
 VERSIÓN NM_001814.3 GI:167000478

```

1  cgtagctatt tcaaggcgcg cgccctcgtgg tggactcacc gctagccccc agcgcctcggc
61  ttccctggtaa ttcttcaccc tttttctcag ctccctgcag catgggtgct gggccctcct
121  tgctgctcgc cgccctcctg ctgcttctct cgggcgaagg cgccgtgcgc tgcgacacac
181  ctgccaaactg caccatcttt gacctgctgg gcacctgggt cttccagggt ggctccagcg
241  gttccacagcg cgatgtcaac tgcctcgggta tgggaaccaca agaaaaaaaa gtagtggtgt
301  accttcagaa gctggataca gcatatgatg accttggcaa ttctggccat ttcacatca
361  tttacaacca aggcctttgag attgtgttga atgactacaa gtgggtttgcc ttttttaagt
421  ataaagaaga gggcagcaag gtgaccactt actgcaacga gacaatgact ggggtgggtgc
481  atgatgtgtt gggccggaac tgggcttgtt tcaccggaaa gaagggtggga actgcctctg
541  agaattgtgt tgtcaacata gcacacctta agaattctca ggaaaagtat tctaattaggc
601  tctacaagta tgatcacaac tttgtgaaag ctatcaatgc cattcagaag tcttggactg
661  caactacata catggaatat gagactctta cctggggaga tatgattagg agaagtgggtg
721  gccacagtcg aaaaatccca agggcccaaac ctgcaaccact gactgctgaa atacagcaaa
781  agatttttgca tttgccaaac tcttgggaact ggagaaatgt tcatgggtatc aattttgtca
841  gtccctgttcg aaaccaagca tccgtgtggc gctgctaact atttgcttct atgggtatgc
901  tagaagcgag aatccgtata ctaaccaaca attctcagac cccaatccta agccctcagg
961  aggttgtgtc ttgtagccag tatgctcaag gctgtgaagg cggcttccca taccttattg
1021  caggaaaagta cgcccaagat tttgggctgg tgggaagaagc ttgcttcccc tacacaggca
1081  ctgattctcc atgcaaaatg aagggaagact gctttcgtta ttactctctc gagtaacct
1141  atgtaggagg tttctatgga ggctgcaatg aagccctgat gaagcttgag ttggtccatc
1201  atgggcccac ggcagttgct tttgaagtat atgatgactt cctccactac aaaaagggga
1261  tctaccacca cactgggtct agagaccctt tcaaccctt tgagctgact aatcatgctg
1321  ttctgcttgt gggctatggc actgactcag cctctgggat ggattactgg attgttaaaa
1381  acagctgggg caccggctgg ggtgagaatg gctacttcog gatccgcaga ggaactgatg
1441  agtgtgcaat tgagagcata gcagtggcag ccacaccaat tctaaattg tagggatatg
1501  cttccagtat ttcataatga tctgcacag ttgtaaaggg gaattggtat attcacagac
1561  tgtagacttt cagcagcaat ctccagaagct tacaaataga ttccatgaa gatatttgct
1621  ttcagaatta aaactgccct taattttaat ataccttca atcgccact ggccattttt
1681  ttctaagtat tcaattaagt gggaaatttc tgggaagatg tcagctatga agtaatagag
1741  tttgcttaat catttgtaat tcaaacatgc tatatttttt aaaatcaatg tgaaaacata
1801  gacttatttt taaattgtac caatcacaag aaaataatgg caataattat caaaactttt
1861  aaaatagatg ctcatatttt taaaataaag ttttaaaaat aactgcaaaa aaaaaaaaaa
1921  aaaa

```

Figura 1-20

UAP1

LOCUS NM_003115 2344 pb ARNm lineal PRI 22-OCT-2008
 DEFINICIÓN UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1 (UAP1),
 ARNm.
 REFERENCIA NM_003115
 VERSIÓN NM_003115.4 GI:156627574

```

1  cggcgcgcctc cgcgtccgcg tcgtcgtctg tgetccccgc gctgacgtgt ctgggcgggtc
61  ggcttccact ccttcaggcg tcggcagcca ctagtctgtg cgagaggggc ggggtggccg
121  gggctggcgc tccacttggc ccccgctccc ggcccgcccc gccgcgcgg gcccccggat
181  gagggatat attcggagcg agcgcgggac gccgatgagt ggccgcgcgg aaggagctgg
241  agacggtcgt agctgcggtc gcgccgagaa aggtttacag gtacatacat tacacccta
301  tttctacaaa gotttggtat tagagcatta tgaacattaa tgacctaaa ctcaegtgt
361  ccaaagctgg gcaagagcac ctactacgtt tctggaatga gottgaagaa gcccaacagg
421  tagaacttta tgcagagctc caggccatga actttgagga gctgaacttc tttttccaaa
481  aggccattga aggttttaac cagtcttctc accaaaagaa tgtggatgca cgaatggaac
541  ctgtgcctcg agaggtatta ggcagtgtca caagggatca agatcagctc caggcctggg
601  aaagtgaagg acttttccag atttctcaga ataaagtgc agttcttctt ctagtctgtg
661  ggcaggggac aagactcggc gttgcatact ctaaggggat gtatgatgtt ggtttgccat
721  cccgtaagac actttttcag attcaagcag agcgtatcct gaagctacag caggttgetg
781  aaaaatatta tggcaacaaa tgcattatct catggtatat aatgaccagt ggcagaacaa
841  tggaaatctac aaaggagttc ttcaccaagc acaagtactt tggtttaaaa aaagagaatg
901  taatcttttt tcagcaagga atgctccccg ccattgagttt tgatgggaaa attattttgg
961  aagagaagaa caaagtttct atggctccag atgggaatgg tggcttttat cgggcacttg
1021  cagccocagaa tattgtggag gatattggag aaagaggcat ttggagcatt catgtctatt
1081  gtgttgacaa catattagta aaagtggcag acccacggtt cattggattt tgcattcaga
1141  aaggagcaga ctgtggagca aaggtggtag agaaaacgaa cctacagaa ccagttggag
1201  tggtttgcgc agtggatgga gtttaccagg tggtagaata tagtgagatt tccctggcaa
1261  cagctcaaaa acgaagctca gacggacgac tgctgttcaa tgcggggaac attgccacc
1321  atttcttcac tgtaccattt ctgagagatg ttgtcaatgt ttatgaacct cagttgcagc
1381  accatgtggc tcaaaagaag attccttatg tggataccca aggacagtta attaagccag
1441  acaaacccaa tggataaag atggaaaaat ttgtctttga catcttccag tttgcaaaga
1501  agtttgtggt atatgaagta ttgcgagaag atgagtttcc cccactaaag aatgctgata
1561  gtcagaatgg gaaagacaac cctactactg caaggcatgc tttgatgtcc ctccatcatt
1621  gotgggtcct caatgcaggg ggccatttca tagatgaaaa tggctctcgc ctccagcaa
1681  ttccccgott gaaggatgoc aatgatgtac caatccaatg tgaaatctct cctcttatct
1741  cctatgctgg agaaggatta gaaagttagt tggcagataa agaattccat gcacctctaa
1801  tcctcgatga gaatggagtt catgagctgg tgaaaaatgg tatttgaacc agataccaag
1861  ttttgtttgc cagcatagga atagctttta tttttgatag accaactgtg aacctacaag
1921  acgtcttggc caactgaagt ttaaataacc acagggtttt attttgcctg ttgaactctt
1981  agagctattg caaacttccc aagatccaga tgactgaatt tcagatagca tttttatgat
2041  tcccaactca ttgaaggtct tatttatata attttttcca agccaaggag accattggcc
2101  atocaggaaa tttcgtacag ctgaaatata ggcaggatgt tcaacatcag tttacttgca
2161  gotggaagca tttgtttttg aagttgtaca tagtaataat atgtcattgt acatgttgaa
2221  aggtttctat ggtactaaaa gtttgtttta ttttatcaaa cattaagctt ttttaagaaa
2281  ataattgggc agtgaaataa atgtatcttc ttgtctctgg agtgtcaaaa aaaaaaaaaa
2341  aaaa

```

Figura 1-21

PUS7

LOCUS NM_019042 3484 pb ARNm lineal PRI 11-FEB-2008
 DEFINICIÓN Homólogo de pseudouridilato sintasa 7 (*S. cerevisiae*)
 (PUS7) de *Homo sapiens*, ARNm.
 REFERENCIA NM_019042 XM_496914 XM_499357
 VERSIÓN NM_019042.3 GI:50727001

```

1 gtgcgagccc ggcgcgcggt gaggcggctg gaggcgcctc ggtcctccgc gcggaaagcg
61 ctgccttttg ctggccgcgc tagccgctgg ctcatccaag tggccttcgc cgctctcttg
121 cgtcccaacc agagcgctgg ccacctcgcc gccagctca cgcgcgcgcc gcgctcccag
181 gctccgggtt ttcttaaatg ttttcttgga gcttaaaaga tggagatgac agaaatgact
241 ggtgtgtcgc tgaacgtgg ggcactgggt gtogaagata atgacagtgg agtcccagtt
301 gaagagacaa aaaaacagaa gctgtcggaa tgcagtctaa ccaaaggtca agatgggcta
361 cagaatgact ttctgtccat cagtgaagac gtgcctcggc ctctgacac tgtcagtaot
421 gggaaagggt gaaagaattc tgaggctcag ttggaagatg aggaagaaga ggaggaagat
481 ggactttcag aggagtgcga ggaggaggaa tcagagagtt ttgcagacat gatgaagcat
541 ggactcactg aggtgacgt aggcctcacc aagtttgtga gttctcatca agggttctcg
601 ggaatcttaa aagaaagata ctccgacttc gttgttcctg aaataggaaa agatggacgg
661 atcagccatt tgaatgactt gtccattcca gtggatgagg aggaccttc agaagacata
721 tttacagttt tgacagctga agaaaagcag cgattggaag agctccagct gttcaaaaat
781 aaggaaacca gtgttgccat tgaggttatc gaggacacca aagagaaaag aacctatctc
841 catcaggcta tcaaatctct gtttccagga ttagagacaa aaacagagga tagggagggg
901 aagaaataca ttgtagccta ccacgcagct gggaaaaagg ctttggcaaa tccaagaaaa
961 cattcttggc caaaatctag gggaagttac tgccaactcg tactatataa ggaaaacaaa
1021 gacaccatgg atgctattaa tgaactctcc aaatacttaa gagtcaagcc aaatatatct
1081 tctacatgg gaaccaaaga taaaagggct ataacagttc aagaaattgc tgttctcaaa
1141 ataactgcac aaagacttgc ccacctgaat aagtgttga tgaactttaa gctagggaat
1201 ttcagctatc aaaaaaaccc actgaaattg ggagagcttc aaggaaacca cttcactgtt
1261 gttctcagaa atataacagg aactgatgac caagtacagc aagctatgaa ctctctcaag
1321 gagattggat ttattaaact ctatggaatg caaagatttg gaaccacagc tgcctctacg
1381 tatcagggtg gaagagctat actacaaaat tctggacag aagtcatgga tttaatattg
1441 aaaccccgct ctggagctga aaagggtctac ttggttaaag gcagagaaga atgggcaaa
1501 accaaagacc caactgctgc cctcagaaaa ctacctgtca aaaggtgtgt ggaaggcgag
1561 ctgcttcagag gactttcaaa atatggaatg aagaatatag tctctgcatt tggcataata
1621 cccagaaata atcgcttaat gtatattcat agctaccaa gctatgtgtg gaataacatg
1681 gtaagcaaga ggatagaaga ctatggacta aaacctgttc caggggacct cgttctcaaa
1741 ggagccacag ccacctatat tgaggaagat gatgttaata attactctat ccatgatgtg
1801 gtaatgcctt tgcctgggtt cgatgttatc taccocaaagc ataaaattca agaagcctac
1861 agggaaatgc tcacagctga caatcttgat attgacaaca tgagacacaa aattogagat
1921 tattccttgt caggggccta ccgaaagatc attattctgc ctcaaatgt tagctgggaa
1981 gtcgttgcat atgatgatcc caaaattcca ctttcaaca cagatgtgga caacctagaa
2041 gggaagacac caccagtttt tgcctctgaa ggcaaataca gggctctgaa aatggatttt
2101 tctctacccc cttctactta cgcaccatg gccattcgag aagtgtctaa aatggatacc
2161 agtatcaaga accagacgca gctgaatata acctggcttc gctgagcagt acctgttcca
2221 cagattagaa aacgtacaca agtgtttgct tctggctcc ctgtgcattt ttgtcttagt
2281 tcagactcat atatggattt caaatctttg taataaaaat tattgtattt ttttagtttt
2341 ttttagctta aagaaataat ttgcaatatt tgtacatgta cacaaacctt gaggttctta
2401 attttagctc agaataataa ttagtcaaaa tacacttcag gtgcttaaat cagagtaaaa
2461 tgtcagcttt acaataataa aaaaaggact ttggttttaa gtagcaggtt taggttttgc
2521 tacattctca aaagacagca ggagtatttg acacatctgt gatggagtat acaacaatgc
2581 attttaagag caaatgcaac aaaacaaatc tggactatgg ataaataatt tgagagctgc
2641 caccacaaaa tataaatata gtactcatgc tgactgaaat aataagacat ctacaaatct

```

Figura 1-22

```

2701 ataaacaaaa agtgattgtc attatcctgc ttatgtacta gattcaggca agcattatag
2761 acttttttggc tgcggtggct tttgcattta tattatcaat gccttgcagg aacggttgc
2821 tgataggccc attttatttt tttatttttt ttttogagac aggatctcac tctgtagcac
2881 aggctggatt gcagtgcaat cctgcaattc tcaatcttgc actgcagcct cgacctccca
2941 ggctccagtg actctcccac ctccagcctcc taagtagctg ggagtagagg cggcgacccac
3001 cagccctagc tgatttttgc atttttttgc agagacgggg gtttggccat gttgcgagg
3061 ctaactcctg ggattacagg catgagctgt gctggcgggg ttttttttct ttgatgtaaa
3121 cgtgtacagc tgttttatta gtttaaggtct aatttttact ctaggtgcct tttatgttca
3181 gaactctttc cactggactg gtatttgctc aaaaataaat aatggtagag aagaaaacta
3241 taaaaatgga caaggctttc ttctatcagt agcgtttacc ctttgtcacc agtggttttg
3301 gtatttccat gtctggcatt gcataaactt ctctggtgtg aaaggataaa tatgcctttc
3361 taaagttgta tatcaaaatt gtatcaattt ttattttcta tgatttctag aaacaaatgt
3421 aataaatatt tttaaaatct cttttctact ggttatgtaa ataaatcaaa taaatatatc
3481 aaaa

```

Figura 1-23

CD22

LOCUS NM_001771 3293 pb ARNm lineal PRI 16-MAR-2008
 DEFINICIÓN Molécula CD22 (CD22) de *Homo sapiens*, ARNm.
 REFERENCIA NM_001771
 VERSIÓN NM_001771.2 GI:157168354

```

1  ctttttgcctc cagatgctgc caggggtccct gaagaggggaa gacacgcgga aacaggcttg
61  cccccagaca cgacaccatg catctcctcg gcccttggct cctgctcctg gttctagaat
121 acttggcttt ctctgactca agtaaatggg tttttgagca cctgaaacc ctctacgcct
181 gggagggggc ctgcgtctgg atcccttgca cctacagagc cctagatggg gacctggaaa
241 gcttcctcct gttccacaat cctgagtata acaagaacac ctogaagttt gatgggacaa
301 gactctatga aagcacaaa gattgggaagg ttctctctga gcagaaaagg gtgcaattcc
361 tgggagacaa gaataagaac tgcacactga gtatccacc ggtgcacctc aatgacagtg
421 gtcagctggg gctgaggatg gagtccaaga ctgagaaatg gatggaacga atacacctca
481 atgtctctga aaggcctttt ccacctcata tccagctccc tccagaaatt caagagtccc
541 aggaagtcc tctgacctgc ttgctgaatt tctcctgcta tgggtatccg atccaattgc
601 agtggctcct agaggggggt ccaatgaggg aggtctgctg caoctcgacc tcttgacca
661 tcaagtctgt ctccaccgg agcgagctca agttctcccc acagtggagt caccatggga
721 agattgtgac ctgccagctt caggatgcag atgggaagtt cctctccaat gacacggtgc
781 agctgaacgt gaagcacacc ccgaagttgg agatcaaggt cactcccagt gatgccatag
841 tgagggaggg ggactctgtg accatgacct gcgaggtcag cagcagcaac ccggagtaca
901 cgacggtatc ctggctcaag gatgggacct cgctgaagaa gcagaatata ttcacgctaa
961 acctgcgcga agtgaccaag gaccagagtg ggaagtactg ctgtcaggtc tccaatgacg
1021 tgggcccggg aaggctcgaa gaagtgttcc tgcaagtgca gtatgccccg gaaccttcca
1081 cggttcagat cctccactca ccggctgtgg aggggaagtca agtcagattt ctttgcattg
1141 cactggccaa tctcttcca acaaattaca cgtggtacca caatgggaaa gaaatgcagg
1201 gaaggacaga ggagaaagtc cactcccaa agatcctccc ctggcacgct gggacttatt
1261 cctgtgtggc agaaaacatt ctgtgtactg gacagagggg cccgggagct gagctggatg
1321 tccagtatcc tccaagaag gtgaccacag tgattcaaaa ccccatgccg attcagaag
1381 gagacacagt gaccttttcc tgtaactaca attccagtaa cccagtggtt acccggtatg
1441 aatggaaacc ccatggcgcc tgggaggagc catecgttgg ggtgctgaag atccaaaacg
1501 ttggctggga caacacaacc atgcctgctg cagcttgtaa tagttggtgc tctggggcct
1561 cccctgtcgc cctgaatgtc cagtatgccc cccgagacgt gagggtccgg aaaatcaagc
1621 ccttttccga gattcactct ggaaactcgg tcagcctcca atgtgacttc tcaagcagcc
1681 accccaaaga agtccagttc ttctgggaga aaaatggcag gcttctgggg aaagaaagcc
1741 agctgaattt tgactccatc tcccagaag atgctgggag ttacagctgc tgggtgaaca
1801 actccatagg acagacagcg tccaaggcct ggacacttga agtgctgtat gcaccagga
1861 ggctgcgtgt gtccatgagc cggggggacc aagtgatgga ggggaagagt gcaacctga
1921 cctgtgagag cgacgccaac cctcccgctc ccactacac ctggtttgac tggaaatacc
1981 aaagcctccc ctaccacagc cagaagctga gattggagcc ggtgaaggtc cagcactcgg
2041 gtgctactgt gtgccagggg accaacagtg tgggcaaggg ccgttcgctc ctacgacccc
2101 tcaccgtcta ctatagcccg gagaccatcg gcaggcgagt ggctgtggga ctgggtcctc
2161 gctcgccat cctcatcctg gcaatctgtg ggctcaagct ccagcgacgt tggagagga
2221 cacagagcca gcaggggctt caggagaatt ccagcgcca cgtgttcttt gtgaggaata
2281 aaaagggttag aaggggcccc ctctctgaag gccccactc cctgggatgc tacaatccaa
2341 tgatggaaga tggcattagc tacaccacce tgcgctttcc cgagatgaac ataccacgaa
2401 ctggagatgc agagtcccca gagatgcaga gacctcccc ggactgcgat gacacggtca
2461 cttattcagc attgcacaag cgccaagtgg gogactatga gaacgtcatt ccagattttc
2521 cagaagatga ggggattcat tactcagagc tgatccagtt tggggtcggg gagcggcctc
2581 aggcacaaga aaatgtggac tatgtgatcc tcaaacattg aactggatg ggctgcagca
2641 gaggcactgg gggcagcggg ggccagggaa gtccccagat tccccagac accgccat

```

Figura 1-24

```

2701 ggcttctctc tgcgcgcatg tgcgcacaca cacacacaca cgcacacaca cacacacaca
2761 ctccactgagg agaacccttgt gcctgggtca gagccagtc ttttggtgag ggtaacccca
2821 aacctccaaa actcctgccc ctgtttctct ccactctcct tgctaccagc aaatccatct
2881 aaatacctgc cctgacatgc acacctcccc ctgccccccac cagggccact ggccatctcc
2941 accccagct gcttgtgtcc ctctgggat ctgctcgta tcatttttcc ttccctctc
3001 catctctctg gccctctacc cctgactctga catccccact cagcaatatt atgccagtt
3061 tctgcctctg agggaaagcc cagaaaagga cagaaacgaa gttagaaagg gccagtcct
3121 ggcttggtt ctcttttga agtgaggcat tgcacgggga gacgtaagta tcagggccc
3181 cttgactctg gggactccgg gtttgagatg gacacactgg tgtggattaa cctgccagg
3241 agacagagct cacaataaaa atggctcaga tgcacttca aagaaaaaaa aaa

```

Figura 1-25

RGS13

LOCUS NM_144766 1458 pb ARNm lineal PRI 31-ENE-2010
 DEFINICIÓN Regulador de la señalización de proteína G 13 (RGS13)
 de *Homo sapiens*, variante de transcrito 2, ARNm.
 REFERENCIA NM_144766
 VERSIÓN NM_144766.1 GI:21464138
 PAL. CLAVE
 FUENTE *Homo sapiens* (humano)

ORIGEN

```

1 gaggccagag tgccatcgaa ggtaattata gagacagtaa aatcctttta ctctgggaaa
61 aataaaatgc tgggtgtctc acaaaatttc agaacotgat ttcaaacgga tcataacaaa
121 gagggatca aatttagcat ggtggaactgc togacaggat atatttgtca atggaatggt
181 tccacatatt ataccacca catgagaaaa aaatgatcat tgtttatttg aagcttgaaa
241 aatgagcagg cggaattggt ggatttgtaa gatgtgcaga gatgaatcta agaggccccc
301 ttcaaacott aotttggagg aagtattaca gtggggcccag tottttgaaa atttaatggc
361 tacaaaaat ggtccagtag tctatgcagc atatttaaaa atggagcaca gtgacgagaa
421 tattcaatgc tggatggcat gtgaaacctc taagaaaatt gctcacgggt ggagcagaat
481 ttctagggca aagaagcttt ataagattta catccagcca cagtcacctc gagagattaa
541 cattgacagt tcgacaagag agactatcat caggaaacatt caggaaaccca ctgaaacatg
601 ttttgaagaa gctcagaaaa tagtctatat gcatatggaa agggattcct accccagatt
661 tctaaagtca gaaatgtacc aaaaactttt gaaaactatg cagtccaaca acagtttctg
721 actacaactc aaaagtttta atagaaaaaca gtatattgaa agtggtgggt ttgatotttt
781 tatttagaaa ccacaaaaat cagaaacaca gtacaaataa aacagaaatc aaactataag
841 ttgactttta gttcctaaaa agaaacatat ttcaaaagca atggaatcta gaattottat
901 aacatgaata acaaaatgta cagcaagcct atgtagtcca attaatatat aaggaaaagg
961 aagggtcttc ttcattgatac aagcattata aagtttttac tgtagtagtc aattaatgga
1021 tatttccttg ttaataaaat ttgtgtgcat aatttacaaa ttagttcttt aaaaattggt
1081 gttatatgaa ttgtgtttct agcatgaatg ttctatagag tactctaaat aacttgaatt
1141 tatagacaaa tgcctactcac agtacaatca attgtattat accatgagaa aatcaaaaag
1201 gtgttcttca gagacatttt atctataaaa ttttcctact attatgttca ttaacaaaact
1261 tctttatcac atgtatcttc tacatgtaaa acatttctga tgatttttta acaaaaaata
1321 tatgaatttc ttcatttgct ctigcatcta cattgctata aggatataaa atgtgggttc
1381 tatattttga gatgtttttt ccttacaatg tgaactcacc gtgatcttgg aatcaataa
1441 agtcaaatat caactaaa

```

Figura 1-26

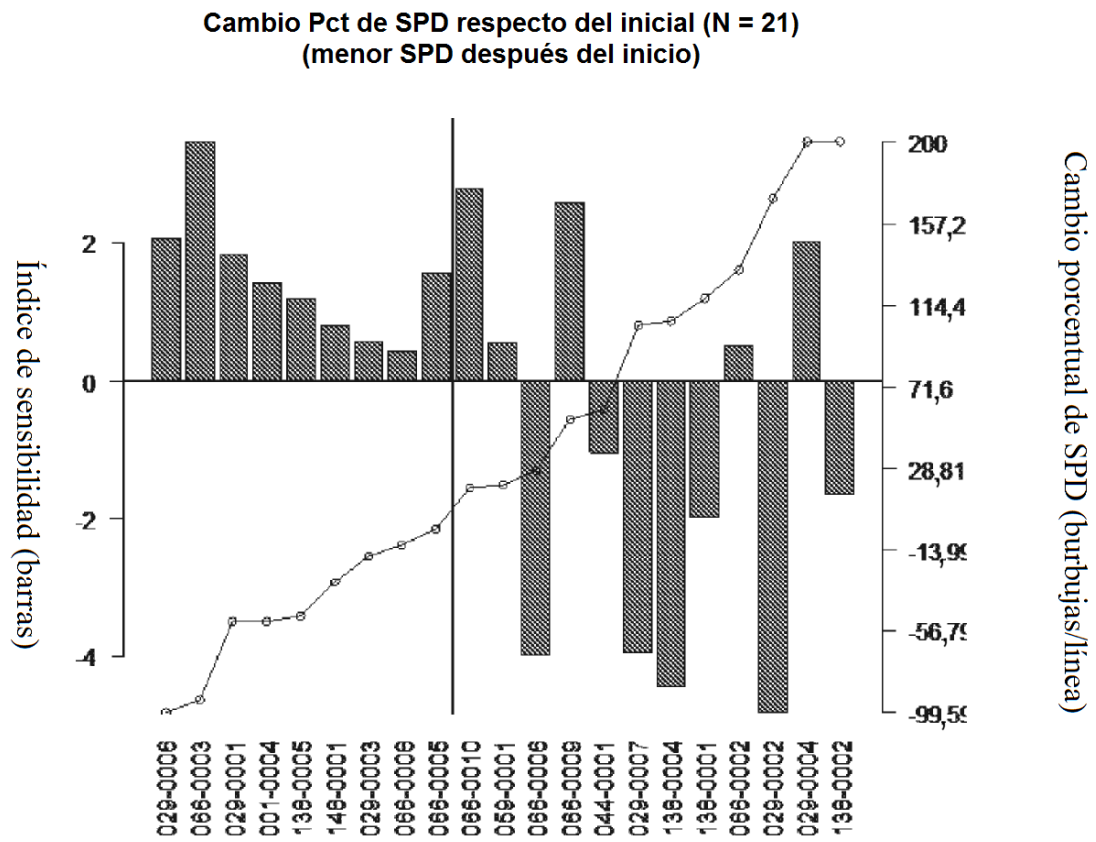


Figura 2

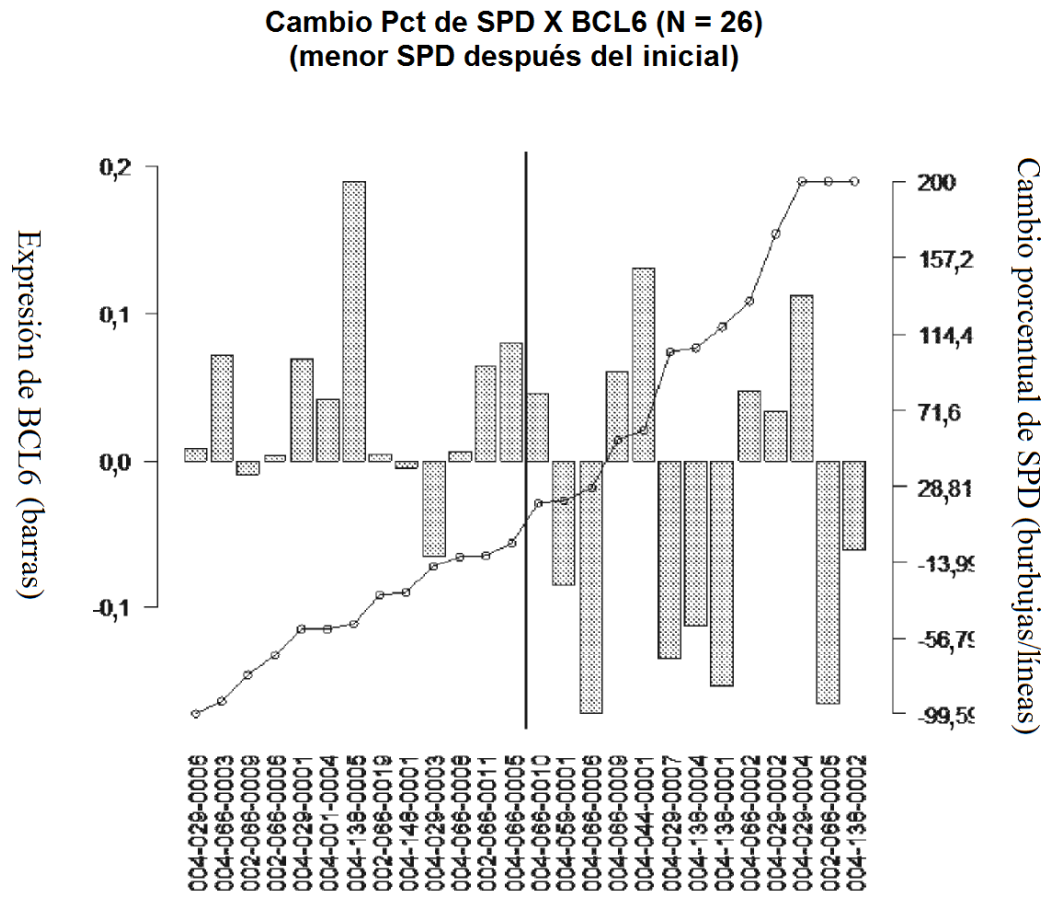


Figura 3

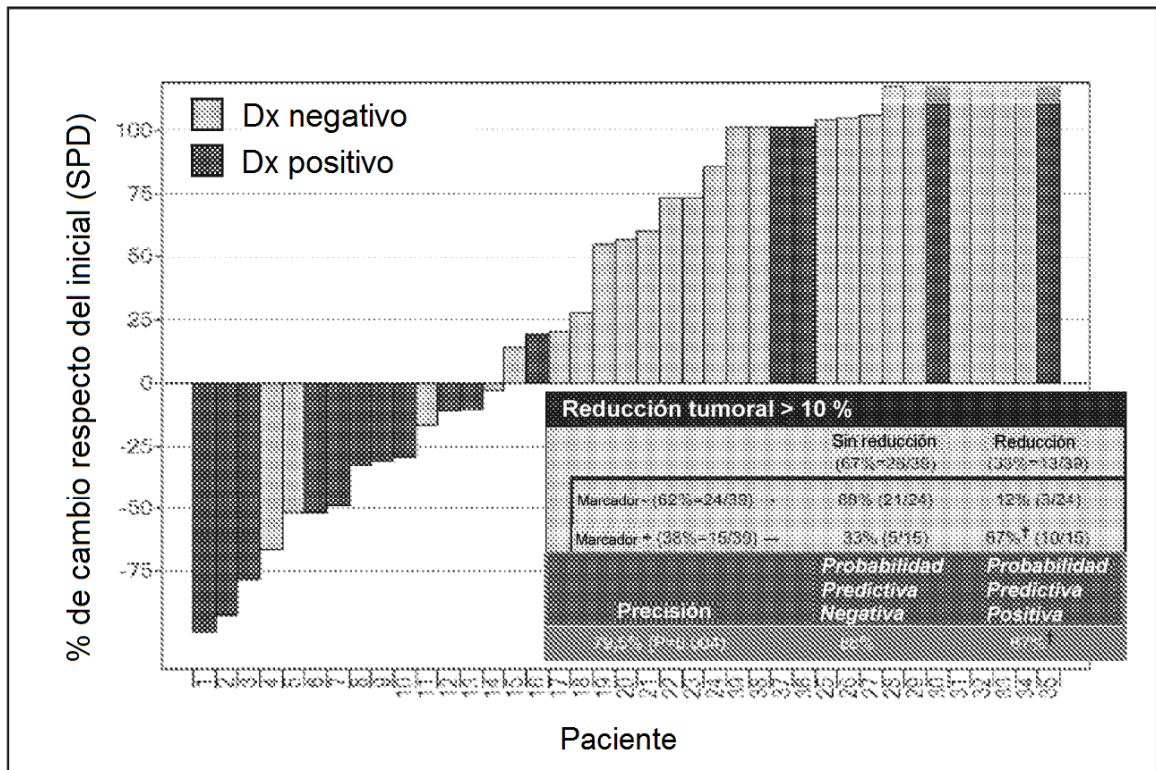


Figura 4

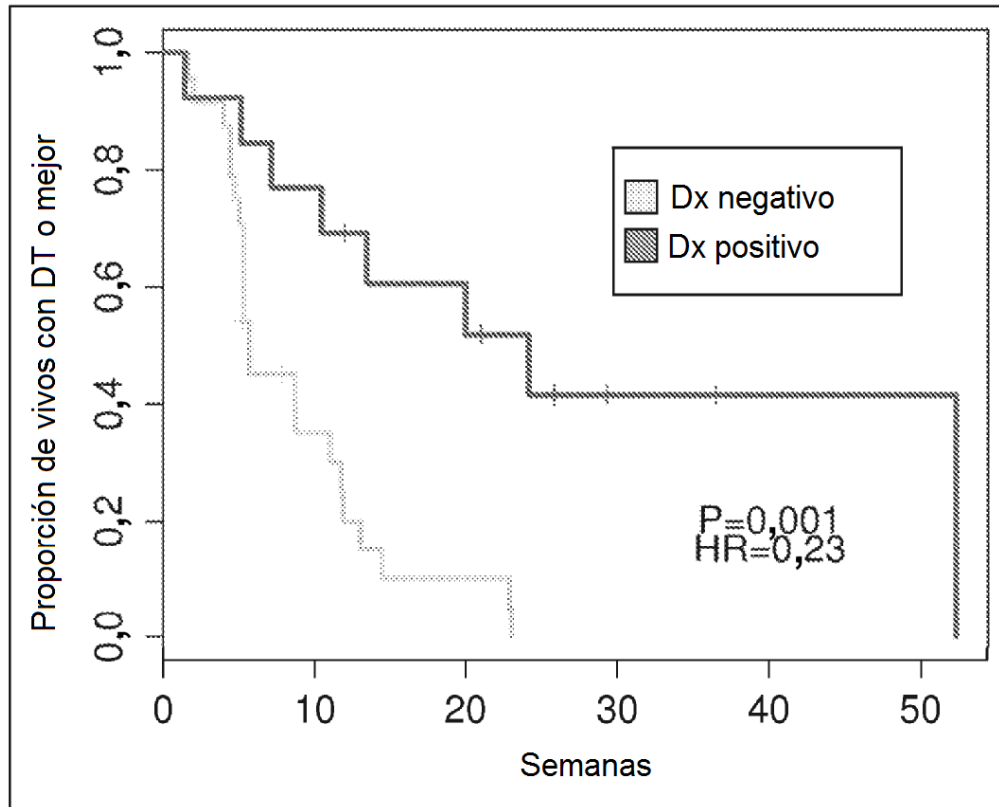


Figura 5