

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 891**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2010 PCT/US2010/053953**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.05.2011 WO11056505**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2010 E 10828825 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2494076**

54 Título: **Detección de anomalías cromosómicas asociadas con la prognosis del cáncer de pulmón de células no pequeñas**

30 Prioridad:

**26.10.2009 US 254955 P**  
**26.10.2009 US 254968 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.03.2018**

73 Titular/es:

**ABBOTT MOLECULAR INC. (100.0%)**  
**1300 East Touhy Avenue**  
**Des Plaines, IL 60018, US**

72 Inventor/es:

**PESTOVA, EKATERINA;**  
**LEGATOR, MONA, STEIN;**  
**LU, XIN y**  
**SEMIZAROV, DIMITRI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 658 891 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

**Detección de anomalías cromosómicas asociadas con la prognosis del cáncer de pulmón de células no pequeñas****Referencia cruzada a una solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Núm. 61/254.968 y 61/254.955, ambas presentadas el 26 de octubre de 2009.

**Campo de la invención**

La presente descripción se refiere a ensayos de diagnóstico *in vitro* de muestras de tejido de pacientes con cáncer de pulmón para determinar el pronóstico del paciente, y en particular se refiere a un ensayo *in vitro* para determinar el pronóstico de pacientes en estadio temprano, tales como los diagnosticados de cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio I o estadio II.

**Antecedentes de la invención**

El cáncer de pulmón representó casi un tercio de las muertes por cáncer en los Estados Unidos en 2005, y en general se clasifica en dos tipos: cáncer de pulmón de células no pequeñas y cáncer de pulmón de células pequeñas. El cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) comprende 80-85% de los casos de cáncer de pulmón en los Estados Unidos. El CPCNP comprende tres tipos principales: (i) Carcinoma de células escamosas, que comienza en células escamosas, que son células delgadas y planas que parecen escamas de peces. El carcinoma de células escamosas también se llama carcinoma epidermoide; (ii) Carcinoma de células grandes, que comienza en varios tipos de células grandes de pulmón; (iii) Adenocarcinoma, que comienza en las células que recubren los alvéolos del pulmón y producen sustancias tales como mucus. Otros tipos menos comunes de CPCNP incluyen carcinoma pleomórfico, tumor carcinoide y carcinoma no clasificado.

El diagnóstico de CPCNP se realiza mediante el examen de un patólogo de tejido sospechoso, como una muestra de biopsia. Después del diagnóstico de CPCNP, a la enfermedad del paciente se le asigna un pronóstico (la posibilidad de recuperación) utilizando la salud general del paciente y la edad, la gravedad de síntomas tales como tos y dificultad para respirar, el tipo particular de CPCNP y la estadificación del cáncer. La estadificación toma en consideración el tamaño del tumor y si el tumor está presente solo en el pulmón o se ha diseminado a otros lugares del organismo. Las opciones de tratamiento concretas para un paciente con CPCNP se seleccionan a continuación en base a estas consideraciones, y la estadificación del cáncer es un componente importante para la selección del tratamiento. Los pacientes con CPCNP en estadio temprano pueden curarse mediante resección quirúrgica para extirpar el tumor, pero las modalidades de diagnóstico actuales no pueden predecir qué pacientes recaerán después de la cirugía. El cáncer es una enfermedad frecuentemente mortal con una tasa de curación baja, para la cual la mayoría de los tratamientos están dirigidos a mejorar la calidad y la duración de la vida. Debido a que las células cancerosas son células humanas, frecuentemente distinguidas solo por la acumulación de un número relativamente pequeño de aberraciones genéticas o mutaciones proteicas, las terapias farmacológicas que son útiles para destruir células cancerosas son también perjudiciales para muchas células humanas normales y causan toxicidades típicamente significativas en los pacientes que son tratados. Además, debido a que los cánceres frecuentemente recurren localmente o producen metástasis en tejidos y órganos alejados de su tejido de origen, es fundamental saber qué pacientes con cánceres en estadio temprano necesitan tratamiento farmacológico después de la extirpación quirúrgica de su tumor primario. Este es un tema especialmente crítico en pacientes con CPCNP en estadio temprano, cuyos tumores se detectaron temprano y se extirparon quirúrgicamente, específicamente en pacientes con enfermedad en Estadios I y IIa. El tratamiento insuficiente de estos pacientes con fármacos anticancerosos da como resultado una tasa inaceptablemente alta de pacientes que desarrollan enfermedad recurrente o metastásica, lo que en última instancia conduce a un aumento de la morbilidad y muerte. El tratamiento excesivo de esta población da como resultado un número inaceptablemente alto de pacientes que, al no necesitar terapia con medicamentos, experimentan los efectos secundarios tóxicos de los medicamentos que se les administran.

El sitio web de la Red Nacional Integral del Cáncer (NCCN) describe la estadificación del CPCNP de la siguiente manera. "El sistema más utilizado en la práctica clínica de los Estados Unidos para describir el crecimiento y la propagación del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) es el sistema de estadificación TNM, también conocido como el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC). En la estadificación TNM, se combina la información sobre el tumor (T), cualquier diseminación a los ganglios linfáticos cercanos (N) y cualquier metástasis de órgano distante (M) y se asigna un estadio a agrupaciones TNM específicas. Los estadios agrupados se describen con el número 0 y números Romanos de I a IV.

"Las categorías T se basan en el tamaño del cáncer de pulmón, su diseminación y ubicación dentro de los pulmones

y su diseminación a los tejidos cercanos. En la categoría Tis, el cáncer se encuentra sólo en la capa de células que recubre las vías respiratorias. No se ha diseminado a otros tejidos pulmonares. Esta categoría también se conoce como *carcinoma in situ*.

5 "En la categoría T1, el cáncer no mide más de 3 centímetros (un poco menos de 1 a 1 ¼ pulgadas), no se ha diseminado a la pleura visceral (membranas que rodean los pulmones) y no afecta a las ramas principales de los bronquios.

10 "En la categoría T2, el cáncer tiene una o más de las siguientes características: (i) es mayor de 3 cm, (ii) implica a un bronquio principal de un pulmón, pero no está más cerca de 2 cm (aproximadamente 3 ¼ a 4 pulgadas) del punto donde la tráquea (garganta) se ramifica en los bronquios principales izquierdo y derecho, o (iii) se ha diseminado a la pleura visceral. El cáncer puede bloquear parcialmente los conductos respiratorios, pero éste no ha ocasionado la obstrucción total del pulmón o el desarrollo de neumonía.

15 "En la categoría T3, el cáncer tiene una o más de las siguientes características: (i) se ha diseminado a la pared del tórax, el diafragma (el músculo respiratorio que separa el tórax del abdomen), la pleura mediastínica (las membranas que rodean el espacio entre los 2 pulmones), o el pericardio parietal (las membranas del saco que rodea el corazón), (ii) involucra un bronquio principal de un pulmón, y está más cerca de 2 cm al punto donde la tráquea (o garganta) se ramifica hacia los bronquios principales izquierdo y derecho, pero no afecta a esta zona, o (iii) ha crecido lo suficiente en las vías respiratorias como para causar la obstrucción total de un pulmón o la neumonía de todo el pulmón.

20 "En la categoría T4, el cáncer tiene una o más de las siguientes características: (i) Se ha diseminado al mediastino (el espacio detrás del esternón y enfrente del corazón), el corazón, la traquea (garganta), el esófago (el tubo que conecta la garganta con el estómago), la columna vertebral o el punto donde la tráquea se ramifica hacia los bronquios principales izquierdo y derecho; (ii) Están presentes dos o más nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo; (iii) está presente un derrame pleural maligno, que es la existencia de líquido que contiene células cancerosas en el espacio que rodea el pulmón.

25 "La categoría N depende de cuáles, si los hubiera, de los ganglios linfáticos cercanos a los pulmones están afectados por el cáncer. En la categoría N0, el cáncer no se ha diseminado a ningún ganglio linfático. En la categoría N1, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos dentro del pulmón o a los ganglios linfáticos hiliares (aquellos ubicados alrededor de la zona donde el bronquio ingresa al pulmón). En la categoría N1, los ganglios linfáticos afectados están solo en el mismo lado que el pulmón canceroso. En la categoría N2, el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos subcarinales (los que están alrededor del punto donde la tráquea se ramifica a los bronquios izquierdo y derecho) o a los ganglios linfáticos en el mediastino (el espacio detrás del esternón y enfrente del corazón). En la categoría N2, los ganglios linfáticos afectados se encuentran en el mismo lado del pulmón canceroso. En la categoría N3, el cáncer se ha diseminado hasta los ganglios linfáticos cerca de la clavícula de cada lado y/o a los ganglios linfáticos mediales o hiliares del lado opuesto al pulmón canceroso.

30 "La categoría M depende de si el cáncer ha producido metástasis y se ha diseminado a tejidos y órganos distantes. En la categoría M0, no hay diseminación distante del cáncer. En la categoría M1, el cáncer se ha diseminado a 1 o más sitios distantes. Los sitios que se consideran distantes incluyen otros lóbulos de los pulmones, los ganglios linfáticos más allá de los utilizados para determinar la categoría N del cáncer, y otros órganos o tejidos tales como el hígado, los huesos o el cerebro.

35 Una vez que se han asignado las categorías T, N y M para el CPCNP concreto, esta información se combina (agrupamiento por etapas) para asignar un estadio general de 0, I, II, III o IV (véase la Tabla 1). Varias combinaciones de las categorías T y N se combinan en estadios. Los estadios identifican tipos de tumores que tienen un pronóstico similar y se tratan de manera similar. Como se observa en la Tabla 1, un tumor con diseminación distante (es decir, un cáncer de categoría M1) se considera Estadio IV, independientemente del tamaño tumoral de afectación de los ganglios linfáticos. "La siguiente Tabla del sitio web de NCCN muestra la categoría y estadio combinados clasificación para CPCNP.

55

**TABLA 1**

Estadio general	T Categoría	N Categoría	Categoría M
Estadio 0	Tis	N0	M0
Estadio IA	T1	N0	M0
Estadio IB	T2	N0	M0
Estadio IIA	T1	N1	M0

Estadio general	T Categoría	N Categoría	Categoría M
Estadio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estadio IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
Estadio IIIB	T3	N2	M0
	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
Estadio IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Los pacientes con CPCNP con un número de estadios más bajo generalmente tienen un pronóstico y perspectivas de supervivencia más favorables, y estos pacientes generalmente se tratan mediante resección quirúrgica del tumor. Sin embargo, incluso para pacientes en estadio inicial, tales como aquellos con CPCNP en Estadio 1B, Estadio IIA o IIB, un porcentaje significativo de estos pacientes recaerá después de la resección quirúrgica mostrando una enfermedad más agresiva y morirán. Los métodos actuales de diagnóstico clínico son incapaces de identificar el pronóstico de CPCNP en estadio temprano con suficiente precisión para dirigir una terapia más agresiva contra aquellos pacientes con mayor probabilidad de recurrencia. Se necesitan mejores métodos de diagnóstico *in vitro* para identificar pacientes de CPCNP en estadio temprano de mayor riesgo que deberían recibir quimioterapia neoadyuvante o adyuvante o, en general, volver a evaluar las opiniones sobre el tratamiento.

Se han descrito ensayos de diagnóstico *in vitro* moleculares basados en hibridación *in situ* fluorescente (FISH) utilizando sondas de hibridación de ADN marcadas fluorescentemente para identificar anomalías cromosómicas para su uso en la selección de quimioterapia para pacientes con CPCNP, (documento PCT/US2005/018879, "Methods for prediction of clinical outcome to epidermal growth factor inhibitors by cancer patients", M. Garcia et al.). Los ensayos de FISH se han descrito como un ensayo de diagnóstico inicial para CPCNP en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20060063194, "Methods and probes for the detection of cancer", L. Morrison et al., publicada el 23 de marzo de 2006 (en lo sucesivo, "Morrison '194"). La solicitud Morrison '194 describe múltiples conjuntos de sondas FISH útiles para el escrutinio y diagnóstico de CPCNP, y un conjunto de sondas descrito en Morrison '194 está disponible comercialmente como el conjunto de sondas LAVysion™ de Abbott Molecular, Inc. (Des Plaines, Illinois, EE.UU.) bajo etiquetado de "Reactivo Específico del Analito" (ASR por sus siglas en inglés) para su uso por los laboratorios clínicos para producir ensayos clínicos de diagnóstico. Conforme a los requisitos de etiquetado ASR de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU., el etiquetado ASR no debe incluir ninguna reivindicación sobre la utilidad médica del ASR. El conjunto de sondas ASR LAVysion comprende cuatro sondas FISH: una sonda específica del locus cromosómico 5p15 marcada con el fluoróforo verde SpectrumGreen, una sonda específica del locus cromosómico 8q24 marcada con el fluoróforo amarillo SpectrumGold, una sonda de enumeración del cromosoma 6 marcada con el fluoróforo azul SpectrumAqua, y una sonda específica del locus cromosómico 7p12 marcada con el fluoróforo rojo SpectrumRed. La investigación realizada utilizando el conjunto de sondas LAVysion se ha descrito y es revisada, por ejemplo, por K. Halling et al., en "Fluorescence in situ hybridization in diagnostic cytology", Hum. Path. (2007) 38: 1137-1144.

La expresión en exceso de ciclina E se ha asociado anteriormente con un mal resultado en cáncer de pulmón (revisado por Singhal et al., en Clin. Cancer Res., 2005, 11, pág. 3974-3986). Sin embargo, no se han establecido alteraciones en el número de copias en el locus de ciclina E como marcadores predictivos. Además, ningún informe previo sobre los ensayos FISH para CPCNP ha revelado el uso de sondas FISH para identificar con mayor precisión el pronóstico para CPCNP en estadio temprano, en particular, aquellos clasificados como Estadio IB o Estadio II.

BROËT PHILIPPE ET AL: "Prediction of Clinical Outcome in Multiple Lung Cancer Cohorts by Integrative Genomics: Implications for Chemotherapy Selection.", CANCER RESEARCH, vol. 69, núm. 3 (2009-02-01), páginas 1055-1062 describe alteraciones específicas del número de copias relacionadas con la supervivencia libre de recaída y establece un sólido predictor del resultado clínico en CPCNP en estadio IB. GALLEGOS RUIZ M I ET AL, "Integration of Gene Dosage and Gene Expression in Non-Small Cell Lung Cancer, Identification of HSP90 as Potential Target", PLOS ONE, PUBLIC LIBRARY OF SCIENCE, US, (20080305), vol. 3, núm. 3, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0001722, ISSN 1932-6203, páginas E1722 - 1, XP002555299 describen que la localización de HSP90 tendrá un impacto clínico para los pacientes con CPCNP.

SYLVIE MICHELLAND ET AL, "Comparison of Chromosomal Imbalances in Neuroendocrine and Non-Small-Cell Lung Carcinomas", CANCER GENETICS AND CYTOGENETICS, (19991001), vol. 114, núm. 1, doXi:10.1016/S0165-

4608(99)00035-7, ISSN 0165-4608, páginas 22 - 30 utilizó la hibridación genómica comparativa (CGH) para caracterizar y comparar el patrón cromosómico de 11 CPCNP y 11 carcinomas de pulmón NE de alto grado. Según los autores, las diferencias en el patrón y la distribución de los cambios genéticos observados en el CPCNP frente a los carcinomas de pulmón NE de alto grado sugieren la existencia de vías tumorigénicas distintas entre estas dos clases principales de tumores pulmonares.

### Compendio de la invención

De acuerdo con una primera realización, la presente invención se dirige a un método para predecir el pronóstico de enfermedad en un paciente que está siendo tratado de cáncer de pulmón, a partir de una muestra biológica del paciente, comprendiendo el método:

poner en contacto la muestra con dos o más sondas, cada sonda dirigida a una subregión cromosómica diferente, en donde las subregiones cromosómicas incluyen 1p13.3 y al menos una subregión cromosómica seleccionada del grupo que consiste en: 19q12, 19q13.11-13.12, 17q25.1, 6q13, 12p13.3, 11q13.1, 19q13.33-13.43, 6p21.2, 11q12.2-13.1, 17q22, 17q21.32-21.33, 2q22.3-2q23.3, 6q22.31-23.3, 8p23.1, 2q24.2, 2q33.1-2q33.2, 6p21.31, 2q33.3, 9p13.2, 4q24, 5q11.2, 16q12.1, 5q11.2, 5q15, 5q12.1-13.1, 14q22.1-23.1, 14q23.2-24.1, 9p35.3, 4p13, 5q12.1, 3q13.3, 4p12, 14a21.1, 4p13,2q34, 14q21.3, 14q12, 3q11.2, 14q22.3-23.1, 14q22.1, 4q21.21-4q22, 10q11.23-21.1, 5q11.2, y 5q13.1-13.2;

incubar las dos o más sondas con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia de polinucleótidos en su cromosoma o región cromosómica diana para formar un complejo de hibridación estable; y

detectar la hibridación de las dos o más sondas, en donde un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia o pérdida en una región cromosómica elegida como diana por las sondas es indicativa de un aumento de riesgo de mal pronóstico de enfermedad cuando se compara con una medida de referencia de pronóstico de enfermedad en pacientes que no tienen ganancia o pérdida de las dos o más regiones cromosómicas elegidas como diana por las dos o más sondas,

en donde la muestra biológica comprende una muestra tumoral, en donde el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio temprano, y en donde el paciente ha sido tratado con resección quirúrgica sin ningún seguimiento o quimioterapia neoadyuvante.

De acuerdo con una segunda realización, la presente invención se dirige a una combinación de sondas que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sondas, en donde las sondas se dirigen a 1p13.3 y al menos una subregión seleccionada del grupo de subregiones expuesto en la primera realización.

De acuerdo con una tercera realización, la presente invención se refiere a un kit para predecir el pronóstico de enfermedad en un paciente tratado de cáncer de pulmón, a partir de una muestra biológica del paciente, en donde el kit comprende una combinación única de sondas de acuerdo con la segunda realización.

### Breve Descripción de los dibujos

La **Figura 1** es un mapa cromosómico de una sonda para el "marcador 1" sobre Cr19, en 19q12.

La **Figura 2** un mapa cromosómico de una sonda para el "marcador 2" sobre Cr19, en 19q13.11-q13.12.

La **Figura 3** es un mapa cromosómico de las sondas para los marcadores 1 y 2 sobre Cr19, en 19q12-13.12.

La **Figura 4** es un mapa cromosómico de dos contiguos para el "marcador 5" en Cr12, sobre 12p13.33.

La **Figura 5** es un mapa cromosómico de una sonda para el "marcador 6" (MEN1) en Cr11, sobre 11q12.2-q13.1.

La **Figura 6** es un mapa cromosómico de una sonda para el "marcador 4" sobre Cr6, en 6q13.

### Descripción detallada

Los marcadores basados en la expresión de mal pronóstico de enfermedad en el cáncer que se describieron previamente no se pueden medir con FISH, una herramienta de diagnóstico clínico bien establecida. Hasta ahora, no se han identificado amplificaciones/deleciones genéticas que puedan predecir el pronóstico de enfermedad. Los autores de la presente invención han descubierto cambios, es decir., amplificaciones y deleciones, en ciertas secuencias cromosómicas en ciertos pacientes con cáncer. Además, los autores de la presente invención han determinado que estos cambios se asocian de forma estadísticamente significativa a una supervivencia general más corta o un tiempo reducido hasta la recurrencia en el CPCNP en estadio I-II. La presente descripción proporciona por lo tanto un método de detección de anomalías cromosómicas asociadas con el pronóstico de CPCNP, así como combinaciones de sondas y kits de diagnóstico. Los métodos pueden utilizar técnicas conocidas como Hibridación Genómica Comparativa en una micromatriz (aCGH) e Hibridación Fluorescente In Situ (FISH) utilizando una combinación de sondas específicas de locus "Locus Specific Identifier" (LSI) y sondas de enumeración cromosómica "Chromosome Enumerator" (CEP) para detectar células que tienen anomalías cromosómicas compatibles con ciertos resultados de enfermedad en CPCNP en estadio I-II. Por consiguiente, la presente descripción proporciona métodos para determinar el pronóstico del cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) en estadio temprano

en un ser humano mediante la evaluación del número de copias de ADN cromosómico en uno cualquiera de cuarenta y siete marcadores.

5 Las ventajas de los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir uno o más de las siguientes: uso de ADN estable para la detección de anomalías cromosómicas (delección, amplificación, aneusomía, translocación);  
 10 detección rápida: los resultados podrían obtenerse en 18-36 horas; las posibilidades de implementación incluyen métodos multiplexados (p.ej., micromatrices) y FISH multicolor; uso como prueba independiente o como complemento de otras pruebas (histología, PSA, nomograma, metilación, mutación); uso en muestras de citología o biopsia (recién congeladas o FFPE); la combinación de varias sondas aumenta la sensibilidad y la especificidad en comparación con un ensayo de un solo analito; aumento de la sensibilidad en comparación con la citología convencional.

## 1. Definiciones

15 Los términos utilizados en las reivindicaciones y la memoria descriptiva se definen a continuación, a menos que se especifique lo contrario.

20 Los términos "cáncer de pulmón de células no pequeñas" y "CPCNP" utilizados indistintamente en la presente memoria se refieren a una neoplasia maligna de pulmón que no es del tipo avena (o célula pequeña), e incluye, pero no se limita a los tipos reconocidos de carcinomas broncogénicos (aquellos que surgen del revestimiento de los bronquios) incluyendo adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas y carcinoma indiferenciado de células grandes. Los diferentes estadios del CPCNP se reconocen en base al crecimiento y la diseminación del cáncer de acuerdo con el sistema de estadificación TNM, o el sistema del American Joint Committee on Cancer (AJCC) como se expone en la Tabla 1 anterior, e incluyen los estadios iniciales IA, IB, IIA y IIB, a veces denominados colectivamente aquí como estadio I-II.

25 Los términos "tumor" o "cáncer" en un animal se refieren a la presencia de células que poseen características tales como crecimiento o morfología atípicos, incluyendo proliferación incontrolada, inmortalidad, potencial metastásico, crecimiento y tasa de proliferación rápidos, y ciertas características morfológicas distintivas. A menudo, las células cancerosas tendrán la forma de un tumor, pero tales células pueden existir solas dentro de un animal. El término tumor incluye tanto neoplasmas benignos como malignos. El término "neoplásico" se refiere a crecimiento atípico tanto benigno como maligno.

30 Los términos "muestra biológica" o "espécimen" se refieren a una cantidad de tejido corporal o células obtenidas de un sujeto que se sospecha que tiene, o que tiene CPCNP. En algunas realizaciones, la muestra incluye una biopsia incluida en parafina fijada con formalina. Además de los sujetos que tienen o se sospecha que tienen CPCNP, la muestra biológica puede obtenerse además de un sujeto que tiene un diagnóstico de CPCNP en estadio temprano (estadio I-II). La muestra biológica o espécimen se pueden obtener de una muestra de biopsia pulmonar que se puede obtener, por ejemplo, mediante cualquier método conocido, como biopsia con aguja, biopsia broncoscópica, biopsia abierta o cirugía toracoscópica asistida por video.

35 Los términos "ácido nucleico" o "polinucleótido", según se utilizan en la presente memoria, se refieren a un desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma monocatenaria o bicatenaria. El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares o mejoradas, para los fines deseados. El término también abarca estructuras similares a ácidos nucleicos con esqueletos sintéticos. Los análogos de la cadena principal de ADN proporcionados por la invención incluyen fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidoato, alquilfosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetil, metileno (metilimino), 3'-N-carbamato, morfolinocarbamato y ácidos peptidonucleicos (PNA); véanse *Oligonucleotides and Analogues, a Practical Approach*, editado por F. Eckstein, IRL Press en Oxford University Press (1991); *Antisense Strategies*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Volumen 600, Eds. Baserga y Denhardt (NYAS 1992); Milligan (1993) *J. Med. Chem.* 36:1923-1937; *Antisense Research and Applications* (1993, CRC Press). Los PNA contienen cadenas principales no iónicas, tales como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. Los enlaces fosforotioato se describen en los documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144: 189-197. Otros esqueletos sintéticos abarcados por el término incluyen enlaces metilfosfonato o enlaces metilfosfonato y fosfodiéster alternativos (Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36: 8692-8698) y enlaces de bencilfosfonato (Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6: 153-156).

40 Los términos "hibridar específicamente con", "hibridación específica" e "hibridar selectivamente con", según se utilizan en la presente memoria, se refieren a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula de ácido nucleico preferentemente a una secuencia de nucleótidos concreta en condiciones rigurosas. El término "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones en las que una sonda se hibridará preferentemente con su secuencia diana, y en menor medida, o nada en absoluto, con otras secuencias. Una "hibridación rigurosa" y "condiciones de lavado de hibridación rigurosas" en el contexto de hibridación de ácido nucleico (p.ej., como en matriz, hibridación Southern o Northern, o FISH) dependen de la secuencia, y son diferentes bajo diferentes

parámetros ambientales. Se encuentra una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en Tijssen (1993) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes parte I, Cap. 2, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays," Elsevier, NY ("Tijssen"). En general, las condiciones de hibridación y lavado altamente rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5°C más bajas que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. El  $T_m$  es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que 50% de la secuencia diana hibrida con una sonda perfectamente coincidente. Se seleccionan condiciones muy rigurosas para que sean iguales al  $T_m$  para una sonda concreta. Un ejemplo de condiciones de hibridación rigurosas para la hibridación de ácidos nucleicos complementarios que tienen más de 100 residuos complementarios en una matriz o en un filtro en una transferencia Southern o northern es de 42°C utilizando soluciones de hibridación convencionales (véase, p.ej., Sambrook y Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY y la discusión detallada, más abajo).

Una "sonda cromosómica" o "composición de sonda cromosómica" se refiere a uno o más polinucleótidos que hibridan específicamente con una región de un cromosoma. Las secuencias diana a las que se puede unir la sonda varían de longitud, por ejemplo, de aproximadamente 25.000 nucleótidos a aproximadamente 800.000 nucleótidos. También se pueden emplear sondas más pequeñas, por ejemplo, que hibridan con una región de menos de 100.000 nucleótidos, o con una región de menos de 10.000 nucleótidos. Por lo tanto, en diversas realizaciones, la sonda puede hibridar con secuencias diana que tienen 25.000 nucleótidos, 30.000 nucleótidos, 50.000 nucleótidos, 100.000 nucleótidos, 150.000 nucleótidos, 200.000 nucleótidos, 250.000 nucleótidos, 300.000 nucleótidos, 350.000 nucleótidos, 400.000 nucleótidos, 450.000 nucleótidos, 500.000 nucleótidos, 550.000 nucleótidos, 600.000 nucleótidos, 650.000 nucleótidos, 700.000 nucleótidos, 750.000 nucleótidos, o 800.000 nucleótidos de longitud o que tienen una longitud que cae en cualquier intervalo teniendo cualquiera de estos valores como criterios de valoración. Una sonda para una región cromosómica concreta puede incluir múltiples fragmentos de polinucleótidos, por ejemplo, que varían de tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 1.000 nucleótidos de longitud.

Una sonda de enumeración cromosómica (CEP) es cualquier sonda capaz de enumerar el número de cromosomas específicos en una célula.

El término "radical que contiene marca" o "radical de detección" generalmente se refiere a uno o varios grupos moleculares asociados con una sonda cromosómica, directa o indirectamente, que permiten la detección de esa sonda tras la hibridación con su diana.

El término "región diana" o "diana de ácido nucleico" se refiere a una secuencia de nucleótidos que reside en una ubicación cromosómica específica cuya pérdida y/o ganancia es indicativa de la presencia de CPCNP.

## 2. Introducción

Los métodos descritos en la presente memoria se basan, en parte, en la identificación de sondas cromosómicas altamente sensibles y específicas y combinaciones de sondas que se pueden utilizar para detectar selectivamente el CPCNP en estadio I-II con mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad. Las combinaciones de sondas de dos o más sondas proporcionan una mayor sensibilidad y especificidad que las sondas individuales. Las sondas abarcan sondas específicas de locus así como sondas de enumeración cromosómica (CEP), que típicamente hibridan con regiones centroméricas. Los métodos se llevan a cabo hibridando una o más sondas a ácidos nucleicos de, p.ej., especímenes de citología (especímenes de biopsia pulmonar) o células de especímenes congelados o especímenes fijados, tales como tejido incluido en parafina y fijado en formalina.

La presente descripción incluye métodos para determinar el pronóstico de pacientes con CPCNP clasificados como cánceres en estadio temprano, en particular los clasificados como Estadio IA, Estadio IB, Estadio IIA o Estadio IIB (Estadio IIA y IIB se denominan colectivamente Estadio II) utilizando el sistema de estadificación TNM ampliamente utilizado. Se pueden utilizar sistemas alternativos de estadificación de CPCNP basados en otras clasificaciones de diagnóstico para identificar a los pacientes cuya muestra de tejido se puede someter a ensayo mediante los métodos descritos en la presente memoria. Según se utiliza en la presente memoria, "CPCNP en estadio temprano" se refiere a un tumor de CPCNP que no se ha propagado a más de un ganglio linfático, ni ha producido metástasis en ningún otro órgano. Los pacientes con CPCNP en estadio temprano casi siempre se tratan mediante resección quirúrgica buscando la extirpación completa del tumor, aunque existe un riesgo significativo de recidiva para estos pacientes en estadio inicial, incluso cuando se cree que el tumor está completamente resecado. Las modalidades diagnósticas actuales no permiten una predicción precisa de cuál de estos cánceres en estadio temprano tiene un alto riesgo de recurrencia y, por lo tanto, debe tratarse después de la resección con quimioterapia adyuvante o antes de la resección con quimioterapia neoadyuvante. La presente descripción proporciona una identificación pronóstica de los pacientes en estadio temprano con un riesgo mayor determinando el número de copias del gen en la muestra del paciente.

Por lo tanto, en un aspecto, los métodos abarcan un método para predecir el pronóstico de enfermedad en un

paciente que está siendo tratado de cáncer de pulmón. Se proporciona una muestra de prueba, que es una muestra biológica del paciente, y se determina un número de copias para un marcador de pronóstico cáncer seleccionado en la muestra de prueba. El número de copia de la muestra de prueba se compara con un número de copia de referencia de dos, determinando de ese modo la presencia o ausencia de un cambio de número de copias para el marcador de pronóstico cáncer. Basándose en la presencia o ausencia de un cambio de número de copias para el marcador de pronóstico cáncer en la muestra de prueba, se identifica que el paciente tiene un mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en comparación con una medida de referencia del pronóstico de enfermedad en pacientes que no tienen cambio de número de copias para el marcador de pronóstico cáncer. La presencia de un cambio en el número de copias para el marcador de resultado del cáncer, es decir, un número de copias superior a 2 debido a la amplificación, o inferior a 2 debido a la delección, es predictivo de un mal pronóstico de la enfermedad. El mal pronóstico de enfermedad es al menos uno de una disminución del tiempo de supervivencia global cuando se compara con un tiempo de supervivencia global de pacientes que no tienen cambio de número de copias en el marcador de pronóstico cáncer y un tiempo más corto hasta la recurrencia cuando se compara con el tiempo hasta la recurrencia para pacientes que no tienen cambio en el número de copias en el marcador de resultado del cáncer. Los métodos también abarcan un método para predecir el pronóstico de enfermedad en un paciente tratado con cáncer de pulmón, en el que, basándose en la presencia o ausencia de un cambio en el número de copias en el marcador de resultado del cáncer, se determina si el paciente tiene un cáncer riesgo de una disminución del tiempo de supervivencia global o un tiempo más corto para la recurrencia en comparación con un tiempo de supervivencia global de pacientes que no tienen un cambio en el número de copias en el marcador de resultado del cáncer.

### 3. Sondas cromosómicas

Las sondas para su uso en la invención se utilizan para la hibridación a ácidos nucleicos que están presentes en muestras biológicas de sujetos que tienen un diagnóstico de CPCNP en estadio I-II o que se sospecha que tienen CPCNP que pueden estar en cualquier estadio. En ciertas realizaciones, las sondas se marcan con marcas detectables, por ejemplo, marcas fluorescentes.

#### a. Sonda de enumeración cromosómica

Una sonda de enumeración cromosómica típicamente reconoce y se une a una región cercana a (denominada "pericentromérica") o en el centrómero de un cromosoma específico, típicamente una secuencia de ADN repetitiva. Se considera que el centrómero de un cromosoma representa a esa entidad cromosómica, ya que se requiere el centrómero para una segregación fiel durante la división celular. La delección o amplificación de una región cromosómica concreta puede diferenciarse de la pérdida o ganancia del cromosoma completo (aneusomía), dentro del cual normalmente reside, comparando el número de señales correspondientes al locus concreto (número de copias) con el número de señales para el centrómero correspondiente. Un método para llevar a cabo esta comparación es dividir el número de señales que representan el locus por el número de señales que representan el centrómero. Las proporciones de menos de uno indican la pérdida relativa o la eliminación del locus, y las proporciones mayores que uno indican ganancia relativa o amplificación del locus. De forma similar, se puede llevar a cabo una comparación entre dos loci diferentes en el mismo cromosoma, por ejemplo en dos brazos diferentes del cromosoma, para indicar ganancias o pérdidas desequilibradas dentro del cromosoma.

En lugar de una sonda centromérica para un cromosoma, un experto en la técnica reconocerá que una sonda de brazo cromosómico puede usarse alternativamente para aproximarse a la pérdida o ganancia cromosómica completa. Sin embargo, tales sondas no son tan precisas para enumerar cromosomas ya que la pérdida de señales para tales sondas puede no indicar siempre una pérdida de los cromosomas completos. Los ejemplos de sondas de enumeración cromosómica incluyen sondas CEP® (p.ej., sondas CEP® 12 y X/Y) comercialmente disponibles de Abbott Molecular, DesPlaines, IL (anteriormente Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

Las sondas enumeración cromosómica y las sondas específicas de locus que se dirigen a una región o subregión cromosómica pueden prepararse fácilmente por los expertos en la técnica o pueden obtenerse comercialmente, por ejemplo, de Abbott Molecular, Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR) o Cytocell (Oxfordshire, Reino Unido). Tales sondas se preparan utilizando técnicas convencionales. Las sondas cromosómicas se pueden preparar, por ejemplo, a partir de ácidos nucleicos de proteínas, ADN humano clonado tales como plásmidos, cromosomas artificiales bacterianos (BAC) y cromosomas artificiales P1 (PAC) que contienen insertos de secuencias de ADN humano. Se puede obtener una región de interés mediante amplificación por PCR o clonación. Alternativamente, las sondas cromosómicas se pueden preparar sintéticamente.

#### b. Sondas específicas de locus

Las sondas que se pueden utilizar en el método descrito en la presente memoria incluyen sondas que hibridan selectivamente con regiones cromosómicas, p.ej., 1p, 2q, 3q, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 9p, 10q, 11q, 12p, 14q, 16q, 17q, y 19q; o subregiones de las regiones cromosómicas, p.ej. 1p13, 2q22-q23, 2q24, 2q33, 2q34, 3q11, 3q13, 4p13, 4p12, 4q21, 4q24, 5q11, 5q12, 5q13, 5q15, 6p21, 6q13, 6q22-q23, 8p23, 9p35, 9p13, 10q11-q21, 11q12-q13,

11q13, 12pa13, 14q12, 14q21, 14q22-q23, 14q23- 24, 16q12, 17q21, 17q22, 17q25, 19q12, and 19q13; o 1p13.3, 2q22.3-q23.3, 2q24.2, 2q33.3, 2q34, 3q11.2, 3q13.3, 4p13, 4p12, 4q21.21-q22, 4q24, 5q11.2, 5q12.1, 5q13.1-q13.2, 5q15, 6p21.2, 6q21.3, 6q13, 6q22.3-q23.3, 8p23.1, 9p35.3, 9p13.2, 10q11.23-q21.1, 11q12.2-q13.1, 11q13.1, 12pa13.3, 14q12, 14q21.1, 14q21.3, 14q22.1, 14q22.1-23.1, 14q22.3-q23.1, 14q23.2-q24.1, 16q12.1, 17q21.32-q21.33, 17q22, 17q25.1, 19q12, 19q13.11-q13.12 y 19q13.33-q13.43. (Las designaciones de subregión, según se utilizan en la presente memoria, incluyen la banda designada y típicamente aproximadamente 10 megabases de secuencia genómica a cada lado). Tales sondas también se denominan "sondas específicas de locus". Una sonda específica de locus se une selectivamente a un locus específico en una región cromosómica que se sabe que experimenta ganancia o pérdida en CPCNP, particularmente CPCNP en estadio I-II, y particularmente aquellos pacientes de CPCNP en estadio 1-11 con mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad. Una sonda puede dirigir regiones codificantes o no codificantes, o ambas, incluyendo exones, intrones, y/o secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y similares.

Quando se desea elegir como diana un locus génico concreto, se prefieren las sondas que hibridan a lo largo de toda la longitud del gen diana en algunas realizaciones, aunque no se requieren. En realizaciones específicas, una sonda específica de locus se puede diseñar para hibridar con un oncogen o gen supresor tumoral, cuya aberración genética se correlaciona con un aumento de riesgo de mal pronóstico de enfermedad en el CPCNP.

Las sondas útiles en los métodos descritos en la presente memoria generalmente incluyen una colección de uno o más fragmentos de ácido nucleico cuya hibridación con una diana puede detectarse. Las sondas pueden producirse a partir de una fuente de ácidos nucleicos de una o más porciones concretas (preseleccionadas) del genoma, por ejemplo, uno o más clones, un cromosoma completo aislado o fragmento de cromosoma, o una colección de productos de amplificación de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las sondas útiles en el método descrito en la presente memoria pueden producirse a partir de ácidos nucleicos encontrados en las regiones descritas en la presente memoria. La sonda puede procesarse de alguna manera, por ejemplo, mediante el bloqueo o eliminación de ácidos nucleicos repetitivos o el enriquecimiento con ácidos nucleicos únicos.

En ciertos aspectos, *p.ej.*, en los métodos basados en FISH, las dianas de la sonda específica de locus incluyen preferiblemente al menos 100.000 nucleótidos. Para las células de una muestra dada, con respecto a las de un control, los aumentos o las disminuciones del número de señales para una sonda indican una ganancia o pérdida, respectivamente, para la región correspondiente.

Las sondas también se pueden emplear como ácidos nucleicos aislados inmovilizados sobre una superficie sólida (*p.ej.*, nitrocelulosa), como en la aCGH. En algunas realizaciones, las sondas pueden ser miembros de una matriz de ácidos nucleicos como se describe, por ejemplo, en el documento WO 96/17958, específicamente para su descripción de la matriz CGH. Las técnicas capaces de producir matrices de alta densidad son bien conocidas (véanse, *p.ej.* Fodor et al. Science 767-773 (1991)) y la Patente de Estados Unidos Núm 5.143.854).

Como se describe en detalle a continuación, se identificaron los loci que supuestamente se asociaron con un mayor riesgo de mal pronóstico de enfermedad en el CPCNP. Estos incluyen regiones de ADN cromosómico, cuya amplificación produce una ganancia de número de copias en el locus concreto, en donde la ganancia del número de copias se asocia con un mal pronóstico de enfermedad. Estos marcadores de pronóstico cáncer incluyen Cr 19, 34,7 Mb-35,6 Mb; Cr 19, 38,9-40,7 Mb; Cr 17, 69,2-71,3 Mb; Cr 6, 70,8-71,1 Mb; Cr 12, 93,7 kb-1,9Mb; Cr 11, 64,3-64,8 Mb; Cr 19, 57,0-62,2 Mb; Cr 6,39,1-39,9 Mb; Cr 11, 64,8-65,7 Mb; Cr 11, 61,4-64,3 Mb; Cr 17, 51,5-53,2 Mb; Cr 17, 43,5-44,9 Mb; Cr 2, 147,6-151,1 Mb; Cr 6, 123,7-135,6 Mb; Cr 8, 6,9-8,8 Mb; Cr 2, 159,9-161,4 Mb; Cr 2, 200,9-204,2 Mb; Cr 6, 36,3-36,7 Mb; Cr 2, 205,9-208,1 Mb; y Cr 1, 109,5-111,1 Mb. Estos loci también incluyen regiones de ADN cromosómico, cuya eliminación produce una pérdida del número de copias en el locus, en donde la pérdida del número de copias se asocia con un mal pronóstico de enfermedad. Estos marcadores de resultado del cáncer (marcadores de delección o "MarcadoresDel") incluyen Cr 5, 62,9 - 67,8 Mb; Cr 5, 53,3 - 53,8 Mb; Cr 4, 105,8 - 107,2 Mb; Cr 16, 45,8 - 46,3 Mb; Cr 5, 50,7 - 52,0 Mb; Cr 5, 94,2 - 96,1 Mb; Cr 9, 36,1- 37,0 Mb; Cr 5, 94,2 - 96,1 Mb; Cr14, 51,1- 52,8 Mb; Cr 14, 61,5 - 68,6 Mb; Cr 9, 28,1 Mb; Cr 4, 43,7 - 44,2 Mb; Cr 5, 60,8 - 62,9 Mb; Cr 3, 120,0 - 121,1 Mb; Cr 4, 46,2 - 48,0 Mb; Cr 14, 38,9 - 40,0 Mb; Cr 4, 44,2 - 44,6 Mb; Cr 2, 213,7 - 214,3 Mb; Cr14, 43,9 - 46,6 Mb; Cr 14, 27,6 - 28,6 Mb; Cr 3, 98,0 - 98,3 Mb; Cr14, 55,2 - 60,0 Mb; Cr14, 48,7 - 51,1 Mb; Cr 4, 81,4 - 83,2 Mb; Cr 10, 51,9 - 54,2 Mb; Cr 5, 55,2 - 58,6 Mb; y Cr 5, 67,8 - 68,5 Mb.

Se desarrollaron nuevas sondas FISH para estos marcadores, que se enumeran en la Tabla 10 en los Ejemplos a continuación, junto con sus correspondientes posiciones cromosómicas de inicio y final, y bandas de inicio y final. Las regiones cromosómicas elegidas como diana por las sondas incluyen 1p, 2q, 3q, 3q, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 9p, 10q, 11q, 12p, 14q, 16q, 17q y 19q. Aquellas regiones cromosómicas en las que una ganancia es indicativa de un mal pronóstico de enfermedad en el paciente incluyen 1p, 2q, 6p, 6q, 8p, 11q, 12p, 17q, y preferiblemente 19q, 1p, 6p, 6q, 11q, 12p y 19q. Aquellas regiones cromosómicas en las que una pérdida es indicativa del mal pronóstico de enfermedad en el paciente incluyen 2q, 3q, 4p, 4q, 5q, 9p, 10q, 14q y 16q, y preferiblemente 4q, 5q, 9p y 16q. Las subregiones cromosómicas elegidas como diana por las sondas incluyen 1p13, 2q22-q23, 2q24, 2q33, 2q34, 3q11, 3q13, 4p13, 4p12, 4q21, 4q24, 5q11, 5q12, 5q13, 5q15, 6p21, 6q13, 6q22-q23, 8p23, 9p35, 9p13, 10q11-q21, 11q1

2-q13, 11q13, 12p13, 14q12, 14q21, 14q22-q23, 14q23-24, 16q12, 17q21, 17q22, 17q25, 19q12, y 19q13, y más concretamente 1p13.3, 2q22.3-q23.3, 2q24.2, 2q33.3, 2q34, 3q11.2, 3q13.3, 4p13, 4p12, 4q21.21-q22, 4q24, 5q11.2, 5q12.1, 5q13.1-q13.2, 5q15, 6p21.2, 6q21.3, 6q13, 6q22.3-q23.3, 8p23.1, 9p35.3, 9p13.2, 10q11.23-q21.1, 11q12.2-q13.1, 11q13.1, 12p13.3, 14q12, 14q21.1, 14q21.3, 14q22.1, 14q22.1-23.1, 14q22.3-q23.1, 14q23.2-q24.1, 16q12.1, 17q21.32-q21.33, 17q22, 17q25.1, 19q12, 19q13.11-q13.12 y 19q13.33-q13.43.

### c. Métodos de selección de la sonda

Las combinaciones de sondas se pueden seleccionar por su capacidad para identificar si el paciente tiene un mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad después del diagnóstico de CPCNP en estadio temprano. Alternativamente, las combinaciones de sondas se pueden seleccionar por su capacidad para guiar la selección de un tratamiento para un paciente que padece cáncer de pulmón. Por ejemplo, cuando el tratamiento con un agente de quimioterapia es al menos una opción de tratamiento para el paciente, las combinaciones de sondas se pueden utilizar para ayudar a determinar un régimen de tratamiento de quimioterapia, incluida la selección de un agente de quimioterapia y determinar la frecuencia del tratamiento de quimioterapia. Por ejemplo, la elección de un agente de quimioterapia concreto y del cronograma de tratamiento puede estar guiada por el conocimiento de que el paciente no tiene un mayor riesgo de tener un mal pronóstico de enfermedad o, por el contrario, de que el paciente corre un mayor riesgo de tener un mal pronóstico. Alternativamente, las combinaciones de sonda se pueden utilizar para clasificar a un paciente por tener un cáncer de pulmón que es resistente al tratamiento convencional, basándose en la presencia de un cambio en el número de copias de dos o más marcadores de pronóstico cáncer.

Las combinaciones de sondas para su uso en los métodos de la presente descripción se pueden seleccionar utilizando principios bien conocidos por el experto en la técnica y como se describe en los ejemplos. Las combinaciones de sondas cromosómicas dentro de una combinación de sondas se eligen por su sensibilidad, especificidad y detectabilidad en relación con el aumento del riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en el CPCNP. La sensibilidad se refiere a la capacidad de una prueba (por ejemplo, FISH) para detectar un aumento del riesgo de un mal pronóstico de enfermedad para un paciente con CPCNP (tiempo de supervivencia más corto o tiempo más corto hasta la recurrencia) cuando existe un mayor riesgo. Más precisamente, la sensibilidad se define como Verdaderos Positivos/(Verdaderos Positivos + Falsos Negativos). Una prueba con alta sensibilidad tiene pocos resultados falsos negativos, mientras que una prueba con baja sensibilidad tiene muchos resultados falsos negativos. En realizaciones concretas, la combinación de sondas tiene una sensibilidad de al menos aproximadamente: 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100%, o una sensibilidad que cae en un intervalo con cualquiera de estos valores como criterios de valoración.

La especificidad, por otro lado, se refiere a la capacidad de la prueba (p.ej., FISH) para proporcionar un resultado negativo cuando la enfermedad no está presente. Más precisamente, la especificidad se define como Verdaderos Negativos/(Verdaderos Negativos + Falsos Positivos). Una prueba con alta especificidad tiene pocos resultados positivos falsos, mientras que una prueba con una baja especificidad tiene muchos resultados positivos falsos. En ciertas realizaciones, la combinación de sondas tiene una especificidad de aproximadamente: 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o 95%, o una especificidad que cae en un intervalo con cualquiera de estos valores como criterios de valoración.

En general, se prefieren las combinaciones de sondas cromosómicas con la mayor sensibilidad y especificidad combinadas para la detección de un mayor riesgo de mal pronóstico en CPCNP. En realizaciones ilustrativas, la combinación de sondas tiene una sensibilidad y especificidad de al menos aproximadamente: 93% y 88%, 95% y 90%, 96% y 91%, 97% y 92%, respectivamente, o cualquier combinación de sensibilidad y especificidad basada en los valores dados más arriba para cada uno de estos parámetros.

La sensibilidad y especificidad combinadas de una combinación de sondas se pueden representar mediante la distancia del parámetro del ideal (DFI), definida como  $[(1-\text{sensibilidad})^2 + (1-\text{especificidad})^2]^{1/2}$ . Los valores DFI varían de 0 a 1,414, representando 0 una combinación de sondas que tiene 100% de sensibilidad y 100% de especificidad y representando 1,414 una combinación de sondas con 0% de sensibilidad y 0% de especificidad.

No hay límite para la cantidad de sondas que se pueden emplear en una combinación. Por ejemplo, se pueden combinar 5 sondas, se pueden combinar 10 sondas, se pueden combinar 20 sondas, se pueden combinar 30 sondas, se pueden combinar 40 sondas, se pueden combinar 50 sondas, etc. Aunque, en ciertas realizaciones, no se combinan más de diez (10) sondas. Adicionalmente, en algunas realizaciones, el número de sondas dentro de un conjunto que debe ser considerado por un observador humano (y no con técnicas de imágenes asistidas por computadora) puede restringirse por razones prácticas, por ejemplo, por el número de fluoróforos únicos que proporcionan señales visualmente distinguibles después de la hibridación. Por ejemplo, convenientemente se pueden emplear típicamente cuatro o cinco fluoróforos únicos (p.ej., que aparecen como señales rojas, verdes, azul y oro para el ojo humano) en una combinación de sondas única. En general, la sensibilidad de un ensayo aumenta a medida que aumenta el número de sondas en un conjunto. Sin embargo, los aumentos en la sensibilidad se vuelven cada vez más pequeños con la adición de más sondas y en algún momento la inclusión de sondas adicionales en una combinación de sondas no se asocia con aumentos significativos en la sensibilidad del ensayo ("rendimientos

decrecientes"). El aumento del número de sondas en una combinación de sondas puede disminuir la especificidad del ensayo. Por consiguiente, una combinación de sondas de la presente descripción incluye típicamente dos, tres o cuatro sondas cromosómicas, según sea necesario para proporcionar un equilibrio óptimo entre sensibilidad y especificidad.

5 Se pueden elegir sondas individuales para su inclusión en una combinación de sondas en función de su capacidad para complementar otras sondas dentro de la combinación. Específicamente, se dirigen a cromosomas o subregiones cromosómicas que no se alteran con frecuencia simultáneamente en un paciente dado con CPCNP. Por lo tanto, cada sonda en una combinación de sondas complementa a la otra o a las otras, es decir, identifica un mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en CPCNP donde la identificación por parte de las otras sondas de la combinación falla alguna vez. Un método para determinar qué sondas se complementan entre sí es identificar sondas individuales con los valores más bajos de DFI para un grupo de especímenes tumorales. A continuación, se pueden analizar sondas adicionales en las muestras tumorales en las que falló la identificación por parte de la sonda inicial, y la sonda con el valor más bajo de DFI medido cuando se combina con la sonda o sondas iniciales se agrega al conjunto. Esto puede repetirse hasta que se logre un conjunto completo de sondas cromosómicas con el valor de DFI deseado.

20 El análisis de discriminación es un método que se puede utilizar para determinar qué sondas son más capaces de detectar un mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en el CPCNP. Este método evalúa si las sondas individuales son capaces de detectar un porcentaje estadísticamente diferente de células anormales en los especímenes de prueba (p.ej., biopsias de pulmón) en comparación con las muestras normales. La detección de células con ganancias cromosómicas (o locus) o pérdidas cromosómicas (o locus) puede usarse para identificar pacientes con mayor riesgo de mal pronóstico en CPCNP. Sin embargo, a veces las pérdidas cromosómicas se producen como un artefacto en las células normales debido a la superposición de señal aleatoria y/o la hibridación deficiente. En secciones de material embebido en parafina fijado con formalina, comúnmente utilizadas para evaluar biopsias, el truncamiento de núcleos en el proceso de corte también puede producir pérdida de material cromosómico por artefactos. En consecuencia, las ganancias cromosómicas a menudo son un indicador más fiable de la presencia de células neoplásicas.

30 Los valores de corte para las ganancias y pérdidas cromosómicas individuales se deben determinar al elegir una combinación de sondas. Se pretende que el término "valor de corte" signifique el valor de un parámetro asociado a la aberración cromosómica que divide una población de especímenes en dos grupos: las muestras que superan el valor de corte y las muestras que están por debajo del valor de corte. Por ejemplo, el parámetro puede ser el número absoluto o porcentaje de células en una población que tiene aberraciones genéticas (p.ej., pérdidas o ganancias para regiones diana). Si el número o porcentaje de células en el espécimen que albergan pérdidas o ganancias para una sonda en particular es mayor que el valor de corte, se determina que la muestra es positiva para un mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en el CPCNP.

40 Las combinaciones de sondas útiles se comentan en el Ejemplo 3 a continuación. En combinaciones ilustrativas, una ganancia en el número de copias en dos o más subregiones cromosómicas que incluyen 19q12 y 19q13, y/o dos o más subregiones cromosómicas que incluyen 11q12 y 11q13, son indicativas de un mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en el CPCNP. Por lo tanto, las combinaciones de sonda útiles incluyen una combinación de al menos dos sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas que incluyen 19q12 y 19q13, o una combinación de al menos dos sondas para un conjunto de subregiones cromosómicas que incluyen 11q12 y 11q13.

#### 4. Hibridación de la sonda

50 Las condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácidos nucleicos generalmente incluyen las combinaciones de condiciones que se pueden emplear en un procedimiento de hibridación dado para producir híbridos específicos, cuyas condiciones pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Tales condiciones típicamente implican temperatura controlada, fase líquida y contacto entre una sonda cromosómica y una diana. Las condiciones de hibridación varían dependiendo de muchos factores que incluyen la concentración de la sonda, la longitud de la diana, el contenido de G-C de la diana y sonda, la composición del disolvente, la temperatura y la duración de la incubación. Al menos una etapa de desnaturalización puede preceder al contacto de las sondas con las dianas. Alternativamente, tanto la sonda como la diana de ácido nucleico pueden someterse a condiciones de desnaturalización juntas mientras están en contacto entre sí, o con el contacto posterior de la sonda con la muestra biológica. La hibridación puede lograrse con la incubación posterior de la sonda/muestra en, por ejemplo, una fase líquida de una mezcla de 2-4xSSC y formamida con una razón en volumen de aproximadamente 50:50, a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 55°C durante un tiempo que se encuentra ilustrativamente en el intervalo de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 96 horas, o más preferiblemente a una temperatura de aproximadamente 32 a aproximadamente 40°C durante un tiempo en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 16 horas. Con el fin de aumentar la especificidad, se puede utilizar un agente bloqueante tal como ácido nucleico bloqueante no marcado como se describe en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.756.696 (específicamente la descripción del uso de ácido nucleico bloqueante),

junto con los métodos de la presente descripción. Se pueden emplear fácilmente otras condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra, como sería fácilmente evidente para los expertos en la técnica.

5 Tras completar un período de incubación adecuado, la unión no específica de las sondas cromosómicas al ADN de la muestra puede eliminarse mediante una serie de lavados. La temperatura y concentraciones de sal se eligen adecuadamente para una rigurosidad deseada. El nivel de rigurosidad requerido depende de la complejidad de una  
10 secuencia de sondas específica en relación con la secuencia genómica, y puede determinarse hibridando sistemáticamente las sondas con muestras de composición genética conocida. En general, se pueden llevar a cabo lavados de alta rigurosidad a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 65 a aproximadamente 80°C con aproximadamente 0,2x a aproximadamente 2xSSC y de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 1% de un detergente no iónico tal como Nonidet P-40 (NP40). Si se requieren lavados de menor rigurosidad, los lavados se pueden llevar a cabo a una temperatura más baja con un aumento de la concentración de sal.

## 15 5. Detección de patrones de hibridación de sondas

Las sondas de hibridación pueden detectarse utilizando cualquier medio conocido en la técnica. Los radicales que contienen la marca se pueden asociar directa o indirectamente con las sondas cromosómicas. Se pueden  
20 seleccionar diferentes radicales que contienen marca para cada sonda individual dentro de una combinación particular de modo que cada sonda hibridada sea visualmente distinta de las otras en la detección. Cuando se emplea FISH, las sondas cromosómicas se pueden marcar convenientemente con radicales que contienen marcadores fluorescentes distintos. En tales realizaciones, los fluoróforos, moléculas orgánicas que emiten fluorescencia tras la irradiación a una longitud de onda concreta, típicamente se unen directamente a las sondas cromosómicas. Está disponible comercialmente un gran número de fluoróforos en formas reactivas adecuadas para  
25 el marcaje de ADN.

La unión de fluoróforos a sondas de ácidos nucleicos es bien conocida en la técnica y puede realizarse por cualquier medio disponible. Los fluoróforos se pueden unir covalentemente a un nucleótido concreto, por ejemplo, y el nucleótido marcado se puede incorporar a la sonda utilizando técnicas convencionales tales como traslado de mella,  
30 cebado aleatorio, marcaje por PCR, y similares. Alternativamente, el fluoróforo se puede unir covalentemente a través de un enlazador a los nucleótidos de desoxicitidina de la sonda que se han transaminado. Los métodos para marcar sondas se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 5.491.224 y Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (2002), Y. S. Fan, Ed., Capítulo 2, "Labeling Fluorescence In Situ Hybridization Probes for Genomic Targets," L. Morrison et al., pág. 21-40, Humana Press, por sus descripciones de las sondas de marcaje.

35 Los fluoróforos ilustrativos que se pueden usar para las sondas de marcaje incluyen TEXAS RED (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), acetilazida azul CASCADE (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR), SPECTRUMORANGE™ (Abbott Molecular, Des Plaines, IL) y SPECTRUMGOLD™ (Abbott Molecular).

40 Un experto en la técnica reconocerá que se pueden utilizar otros agentes o colorantes en lugar de fluoróforos como radicales que contienen marca. Los agentes luminiscentes incluyen, por ejemplo, radicales que contienen marcas radioluminiscentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes y fosforescentes. Alternativamente, se pueden utilizar radicales de detección que se visualizan por medios indirectos. Por ejemplo, las sondas pueden marcarse con biotina o digoxigenina utilizando métodos de rutina conocidos en la técnica, y a continuación procesarse para su  
45 detección. La visualización de una sonda que contiene biotina se puede lograr mediante la unión posterior de avidina conjugada con un marcador detectable. El marcador detectable puede ser un fluoróforo, en cuyo caso puede lograrse la visualización y discriminación de las sondas como se describió anteriormente para FISH.

Las sondas cromosómicas hibridadas a regiones diana se pueden visualizar alternativamente mediante reacciones  
50 enzimáticas de radicales marcadores con sustratos adecuados para la formación de productos de color insolubles. Cada sonda puede discriminarse de otras sondas dentro del conjunto mediante elección de un radical marcador distinto. Una sonda que contiene biotina dentro de un conjunto puede detectarse mediante la incubación posterior con avidina conjugada con fosfatasa alcalina (AP) o peroxidasa de rábano picante (HRP) y un sustrato adecuado. El 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato y nitroazul de tetrazolio (NBT) sirven como sustratos para la fosfatasa alcalina, mientras que la diaminobenzidina sirve como sustrato para la HRP.

En realizaciones en las que se utilizan sondas o composiciones de sondas marcadas con fluoróforo, el método de  
60 detección puede implicar microscopía de fluorescencia, citometría de flujo u otros medios para determinar la hibridación de la sonda. Se puede usar cualquier método de formación de imágenes microscópicas adecuado junto con los métodos de la presente descripción para observar fluoróforos múltiples. En el caso en el que se emplea microscopía de fluorescencia, las muestras hibridadas se pueden observar a la luz adecuada para la excitación de cada fluoróforo y con el uso de un filtro o filtros apropiados. De forma alternativa, se pueden usar sistemas de obtención de imágenes digitales automatizados como los sistemas MetaSystems, BioView o Applied Imaging.

En la matriz CGH, las sondas no están marcadas, sino que están inmovilizadas en distintas ubicaciones en un sustrato, como se describe en el documento WO 96/17958. En este contexto, las sondas a menudo se denominan "ácidos nucleicos diana". Los ácidos nucleicos de muestra típicamente se marcan para permitir la detección de complejos de hibridación. Los ácidos nucleicos de muestra utilizados en la hibridación pueden marcarse detectablemente antes de la reacción de hibridación. Alternativamente, se puede seleccionar una marca detectable que se una al producto de hibridación. En la aCGH dual o multicolor, el conjunto de ácidos nucleicos diana se hibrida con dos o más colecciones de ácidos nucleicos marcados de forma diferente, ya sea de forma simultánea o en serie. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de muestra (p.ej., de biopsia de pulmón) y los ácidos nucleicos de referencia (por ejemplo, de pulmón normal) se marcan cada uno con una etiqueta separada y distinguible. Las diferencias en la intensidad de cada señal en cada aplicación de ácido nucleico diana se pueden detectar como una indicación de una diferencia en el número de copias. Aunque puede emplearse cualquier marcador detectable adecuado para la aCGH, las marcas fluorescentes son típicamente las más convenientes.

Los métodos preferidos para visualizar señales se describen en el documento WO 93/18186. Para facilitar la visualización de resultados y mejorar la sensibilidad en la detección de pequeñas diferencias de intensidad de fluorescencia, se puede utilizar un sistema de análisis mediante obtención de imágenes digitales. Un sistema ilustrativo es QUIPS (un acrónimo de sistema de procesamiento de imágenes cuantitativo), que es un sistema de análisis de imágenes automatizado basado en un microscopio de fluorescencia convencional equipado con una plataforma automatizada, control de foco y rueda de filtro (Ludl Electronic Products, Ltd., Hawthorne, NY). La rueda de filtro está montada en la trayectoria de excitación de fluorescencia del microscopio para la selección de la longitud de onda de excitación. Los filtros especiales (Chroma Technology, Brattleboro, Vt.) en el bloque dicróico permiten la excitación de los múltiples colorantes sin cambio de registro de imagen. El microscopio tiene dos puertos de cámara, uno de los cuales tiene una cámara CCD intensificada (Quantex Corp., Sunnyvale, California) para una visualización sensible de imágenes de video de alta velocidad que se utiliza para encontrar zonas interesantes en una diapositiva así como para enfocar. El otro puerto de cámara tiene una cámara CCD enfriada (modelo 200 de Photometrics Ltd., Tucson, Arizona) que se utiliza para la adquisición real de imágenes a alta resolución y sensibilidad. La cámara CCD enfriada está interconectada a una estación de trabajo SUN 4/330 (SUN Microsystems, Inc., Mountain View, CA) a través de un bus VME. La adquisición completa de imágenes multicolor se controla utilizando un paquete de soporte lógico de procesamiento de imágenes SCIL-Image (Delft Center for Image Processing, Delft, Países Bajos).

## 6. Escrutinio y diagnóstico de pacientes con CPCNP

Los métodos de detección de la invención incluyen la obtención de una muestra biológica de un sujeto que tiene CPCNP o se sospecha que tiene CPCNP. La muestra biológica puede ser una muestra de citología. La muestra biológica puede ser un espécimen congelado o fijado, tal como una muestra fijada en formalina y embebida en parafina. Típicamente para un paciente con cáncer de pulmón la muestra biológica es una muestra de tejido tal como una muestra de sangre periférica que contiene células tumorales circulantes o una biopsia o resección de tejido tumoral de pulmón (p.ej., biopsia pulmonar obtenida mediante biopsia con aguja, biopsia broncoscópica, biopsia abierta o biopsia toracoscópica asistida por video). Otras muestras de tejido adecuadas incluyen, por ejemplo, una muestra citológica de capa fina, una muestra de aspiración con aguja fina, una muestra de lavado pulmonar, una muestra de derrame pleural, una muestra de tejido congelado, una muestra de tejido embebida en parafina o un extracto o muestra procesada producida a partir de cualquiera de una muestra de sangre periférica. Preferiblemente, la muestra se ha clasificado como un cáncer en estadio temprano, por ejemplo, tal como cualquiera de Estadio IA, Estadio IB, Estadio IIA o Estadio IIB, de acuerdo con la práctica de estadificación generalmente aceptada, por ejemplo utilizando estadios patológicos.

La muestra se pone en contacto con una o más sondas cromosómicas para detectar selectivamente un aumento del riesgo de mal pronóstico de enfermedad en CPCNP en la muestra, si lo hubiera, en condiciones para hibridar específicamente las sondas con sus dianas de ácido nucleico presentes en la muestra. Las sondas de una combinación se pueden hibridar concurrentemente o secuencialmente con los resultados de cada hibridación visualizados digitalmente, la sonda o las sondas se eliminan, y la muestra se hibrida posteriormente con la sonda o sondas restantes. Las combinaciones de múltiples sondas también se pueden hibridar con la muestra de esta manera.

Como se indicó, una muestra biológica puede tratarse con un fijador tal como formaldehído e incorporarse en parafina y seccionarse para usar en los métodos de la invención. Alternativamente, se puede presionar tejido fresco o congelado contra portaobjetos de vidrio para formar monocapas de células conocidas como preparaciones táctiles, que contienen núcleos intactos y no sufren el artefacto de truncamiento de la sección. Estas células pueden ser fijadas, p.ej., en soluciones alcohólicas tales como etanol del 100% o metanol:ácido acético 3:1. Los núcleos también se pueden extraer de secciones gruesas de especímenes embebidos en parafina para reducir los artefactos de truncamiento y eliminar el material incrustado. Típicamente, las muestras biológicas, una vez obtenidas, se recogen y se procesan antes de la hibridación utilizando métodos convencionales conocidos en la técnica. Tal procesamiento típicamente incluye el tratamiento con proteasa y la fijación adicional en una solución de aldehído tal como formaldehído.

## 7. Preselección de muestras

Antes de la detección, las muestras de células pueden ser opcionalmente preseleccionadas en base a anomalías citológicas aparentes. La preselección identifica las células sospechosas, lo que permite que el escrutinio se centre en esas células. La preselección permite un escrutinio más rápido y aumenta la probabilidad de que no se pierda un resultado positivo. Durante la preselección, las células de una muestra biológica pueden colocarse en un portaobjetos de microscopio y escanearse visualmente en busca de anomalías citológicas comúnmente asociadas con células displásicas y neoplásicas. Dichas anomalías incluyen anomalías en el tamaño nuclear, la forma nuclear y la tinción nuclear, evaluadas por núcleos de contraste con tinciones de ácido nucleico o colorantes tales como yoduro de propidio o dihidrocloruro de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) usualmente después de la hibridación de sondas para sus ADN diana. Típicamente, las células neoplásicas albergan núcleos que están agrandados, de forma irregular, y/o muestran un patrón de tinción moteado. El yoduro de propidio, utilizado típicamente a una concentración de aproximadamente 0,4 µg/ml a aproximadamente 5 µg/ml, es un colorante específico de ADN fluorescente rojo que se puede observar a una longitud de onda máxima de emisión de 614 nm. DAPI, utilizado típicamente a una concentración de aproximadamente 125 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml es una tinción específica de ADN fluorescente azul que se puede observar a una longitud de onda máxima de emisión de 452 nm. En este caso, solo las células preseleccionadas para la detección se someten a recuento de pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Preferiblemente, las células preseleccionadas en el orden de al menos 20, y más preferiblemente al menos 30-40, en número se eligen para evaluar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. La preselección de una región sospechosa en una sección de tejido se puede realizar en una sección en serie teñida por medios convencionales, tales como tinción H&E o PAP, y la región sospechosa puede ser marcada por un patólogo o técnico capacitado. La misma región se puede ubicar en la sección en serie teñida mediante FISH y los núcleos se pueden enumerar dentro de esa región. Dentro de la región marcada, la enumeración puede estar limitada a núcleos que exhiben características anormales como se describió anteriormente.

Alternativamente, las células para la detección se pueden elegir independientemente de las características citológicas o histológicas. Por ejemplo, todas las células que no se solapan en un área o áreas determinadas en un portaobjetos de microscopio pueden evaluarse para determinar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. Como un ejemplo adicional, las células en el portaobjetos, p.ej., las células que muestran morfología alterada, en el orden de al menos aproximadamente 50, y más preferiblemente al menos aproximadamente 100, en número que aparecen en orden consecutivo en un portaobjetos de microscopio pueden elegirse para evaluar las pérdidas y/o ganancias cromosómicas.

## 8. Patrón de hibridación

### a. FISH

El patrón de hibridación para el conjunto de sondas cromosómicas para las regiones diana se detecta y registra para las células elegidas para la evaluación de las pérdidas y/o ganancias cromosómicas. La hibridación se detecta por la presencia o ausencia de las señales concretas generadas por cada una de las sondas cromosómicas. Se pretende que el término "patrón de hibridación" se refiere a la cuantificación de pérdidas/ganancias cromosómicas para aquellas células elegidas para tal evaluación, con respecto al número de las mismas en una muestra de control uniformemente coincidente, para cada sonda en toda una muestra de células elegida. La cuantificación de pérdidas/ganancias puede incluir determinaciones que evalúan la relación de un locus a otro en el mismo o en un cromosoma diferente. Una vez que se determina el número de regiones diana dentro de cada célula, según se evalúa por el número de regiones que muestran hibridación a cada sonda, pueden cuantificarse las ganancias y/o pérdidas cromosómicas relativas.

La ganancia o pérdida relativa para cada sonda se determina comparando el número de señales de sonda distintas en cada célula con el número esperado en una célula normal, es decir, donde el número de copias debe ser dos. Las células no neoplásicas en la muestra, tales como queratinocitos, fibroblastos y linfocitos, se pueden utilizar como células normales de referencia. Más que el número normal de señales de sonda se considera una ganancia, y menos que el número normal se considera una pérdida. Alternativamente, puede requerirse un número mínimo de señales por sonda por célula para considerar la célula anormal (p.ej., 5 o más señales). Asimismo, para la pérdida, se puede requerir un número máximo de señales por sonda para considerar la célula anormal (por ejemplo, 0 señales, o una o menos señales).

Los porcentajes de células con al menos una ganancia y/o pérdida deben registrarse para cada locus. Una célula se considera anormal si al menos una de las aberraciones genéticas encontradas, identificadas por una combinación de sondas de la presente descripción se encuentra en esa célula. Una muestra puede considerarse positiva para una ganancia o pérdida si el porcentaje de células con la ganancia o pérdida respectiva excede el valor de corte para cualquier sonda utilizada en un ensayo. Alternativamente, pueden requerirse dos o más aberraciones genéticas para considerar la célula anormal con el efecto de aumento de especificidad. Por ejemplo, cuando las ganancias son indicativas de un mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en CPCNP, una muestra se considera positiva si

contiene, por ejemplo, al menos cuatro células que muestran ganancias de al menos dos o más regiones que contienen sonda.

#### b. aCGH

5 La matriz CGH puede llevarse a cabo en modo de un solo color o de dos o multicolor. En el modo de un solo color, solo los ácidos nucleicos de la muestra se marcan e hibridan con el conjunto de ácidos nucleicos. Las diferencias en el número de copias pueden detectarse detectando una intensidad de señal en una aplicación de ácido nucleico diana concreta en la matriz que difiere significativamente de la intensidad de señal observada en uno o más puntos correspondientes a uno o más loci que están presentes en los ácidos nucleicos de muestra en un número de copia normal. Para facilitar esta determinación, la matriz puede incluir elementos diana para uno o más loci que no se espera que muestren diferencias en el número de copias en pacientes con mayor riesgo de un mal pronóstico de enfermedad en el CPCNP.

15 En el modo dual o multicolor, la señal correspondiente a cada colección marcada de ácidos nucleicos (p.ej., ácidos nucleicos de muestra y ácidos nucleicos de referencia, normales) se detecta en cada aplicación de ácido nucleico diana en la matriz. Las señales en cada aplicación se pueden comparar, por ejemplo, calculando una razón. Por ejemplo, si la razón entre la señal de muestra de ácido nucleico y la señal de ácido nucleico de referencia excede de 1, esto indica una ganancia en los ácidos nucleicos de muestra en el locus correspondiente a la aplicación de ácido nucleico diana en la matriz. Por el contrario, si la razón de la muestra de ácido nucleico a la señal de ácido nucleico de referencia es menor que 1, esto indica una pérdida en los ácidos nucleicos de muestra en el locus correspondiente.

#### 9. Combinaciones de sondas y kits para su uso en aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico

25 La invención incluye combinaciones de sondas altamente específicas y sensibles, como se describe en las reivindicaciones adjuntas, que pueden usarse para predecir el pronóstico de enfermedad en el CPCNP, con referencia particular a CPCNP en estadio I-II, y kits para su uso en aplicaciones de diagnóstico, investigación y pronóstico. Los kits incluyen combinaciones de sondas y también pueden incluir reactivos tales como tampones y similares. Los kits pueden incluir materiales instructivos con instrucciones (es decir, protocolos) para la práctica de los métodos de esta invención. Si bien los materiales instructivos generalmente incluyen materiales escritos o impresos, estos no están limitados a los mismos. Cualquier medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicadas a un usuario final está contemplado por esta invención. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (p.ej., discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (p.ej., CD ROM) y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones de sitios de Internet que proporcionan dichos materiales instructivos.

#### Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

#### Ejemplo 1: Análisis de muestras de pacientes con CPCNP

45 **Métodos experimentales: *Especímenes.*** Se perfilaron un total de 178 muestras clínicamente anotadas de CPCNP para determinar alteraciones del número de copias utilizando micromatrices de genotipificación de SNP de alta densidad (conjunto de matrices de 100K de Affymetrix). Todas las muestras se disecaron cuidadosamente para maximizar la proporción tumor/tejido normal y verificar el tipo y el estadio histopatológico. Solo se analizaron muestras de pacientes con muestras en estadio I y II. Todos estos fueron de pacientes tratados con resección quirúrgica sin ningún seguimiento o quimioterapia neoadyuvante. La información clínica recopilada para cada paciente incluyó raza, edad, fecha de nacimiento, sexo, estadio clínico, estadio patológico, ubicación, fecha del procedimiento quirúrgico (SP), histología, diferenciación, fecha de diagnóstico, positividad del ganglio, estado de tabaquismo, estado de la quimioterapia, estado de la radiación, estado de recurrencia, fecha de recurrencia, ubicación de recurrencia, tiempo hasta la recurrencia, fecha del último seguimiento, estado en el último seguimiento, vivo/muerto, supervivencia global y causa de muerte. El tiempo de recurrencia (TDR) y la supervivencia global (SG) se eligieron como los parámetros de resultado. Otros parámetros clínicos (estado del ganglio, estadio, etc.) se consideraron variables de confusión. Los tiempos hasta a la recurrencia del cáncer de pulmón y los tiempos de supervivencia generales se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes.

60 Las tablas 2 y 3 proporcionan las cifras de Supervivencia Global y Tiempo Total de Recurrencia, respectivamente, para la cohorte de pacientes estudiados.

**TABLA 2:**

SG			
Estadio	mueertos	vivos (censurado)	total
1a	6	25	31
1b	6	40	46
2a	0	1	1
2b	7	17	24
total	19	83	102

**TABLA 3:**

TDR			
Estadio	con recurrencia	sin recurrencia (censurado)	total
1a	10	21	31
1b	9	34	43
2a	1	0	1
2b	9	13	22
total	29	68	97

5 **Perfilado del número de copias.** Se utilizaron aproximadamente 30 mg de tejido de cada tumor para extraer ADN genómico de alto peso molecular utilizando el kit Qiagen DNAeasy (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se procesaron doscientos cincuenta nanogramos de ADN para la hibridación con cada una de las dos micromatrices que comprendían las matrices del conjunto de 100K Genechip Human Mapping (Matsuzaki H, Dong S, Loi H, et al. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. Nat Methods 2004; 1:109-11) (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA), que cubre 116.204 loci de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el genoma humano con una distancia media entre marcadores de 23,6 kb. Las micromatrices se procesaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (www.affymetrix.com). El número de copias se calculó comparando la señal del chip con el promedio de 48 muestras femeninas normales. Las muestras con contaminación tisular normal fueron eliminadas mediante QC.

10 **Métodos estadísticos.** El análisis univariado se utilizó para someter a ensayo los siguientes parámetros como posibles factores de confusión: Estadio patológico, Estadio clínico, Estado de tabaquismo, Edad, Sexo, Estado del ganglio, histología (adenocarcinoma frente a carcinoma de células escamosas). No se detectaron efectos significativos. En el análisis de supervivencia, se sometieron a ensayo la interacción del estadio clínico y las regiones marcadoras. Ninguna anomalía en el número de copias tuvo una interacción significativa con el estadio (valor p de FDR <0,05).

25 **Resultados:** Solo se analizaron los pacientes con enfermedad en estadio I-II. El análisis de Kaplan-Meier se aplicó a los datos para generar un gráfico de Kaplan-Meier para cada marcador, mostrando la diferencia en SG y/o TDR entre pacientes con y sin amplificación de un marcador seleccionado como se indica (es decir, una ganancia de número de copias de al menos uno), o que muestra la diferencia en SG y/o TDR entre pacientes con y sin delección (es decir, una pérdida del número de copias de al menos uno) del marcador seleccionado. Las gráficas mostraron que las alteraciones en el número de copias (ganancia o pérdida) en los marcadores especificados se asocian con una SG breve y/o una TDR más corta en pacientes con CPNM en estadio I-II. La Tabla 4 enumera los datos de supervivencia generales para varios marcadores. (Los marcadores para los que se muestran datos en las dos filas inferiores (p.ej., en la posición de inicio 70761833) se comparten entre diferentes estadios clínicos).

**TABLA 4: Supervivencia global para los marcadores en Cr1, Cr2, Cr6, Cr8, Cr11, Cr12, Cr17 y Cr19**

Estadios	crom	pos,inicio	long.seg	FDR	n.amp	amp.media	n.SNP
	2	147604021	3513659	0,0233	7	2,8516132	166
	2	159911944	1511940	0,0001	5	3,2498274	67
	2	200924525	3320890	0,0398	6	3,006085	79
	2	205893481	2160144	0,0075	5	2,9990652	101

Estadios	crom	pos, inicio	long. seg	FDR	n. amp	amp. media	n. SNP
	3	88399682	386599	0,0140	5	3,5534647	12
	6	36255222	423122	0,0347	6	2,9201916	8
	6	39088059	762306	0,0356	15	3,1071308	30
	6	123724457	11850520	0,0377	7	2,9452862	667
	8	4115551	55428	0,0126	7	2,8073117	19
	8	6895465	1889190	0,0166	7	3,0262839	36
1a-2a	11	61374252	2935802	0,0004	9	3,2120357	46
	11	64310154	493823	0,0040	12	3,5343537	6
	11	64803977	880941	0,0004	7	3,6506583	9
	12	93683	1774306	0,0493	11	3,604318	50
	17	43477124	1455714	0,0219	7	3,1622542	24
	17	51532820	1678229	0,0054	10	13,1730034	54
	17	69173224	2131396	0,0304	23	3,1612824	32
	19	32693527	387442	0,0183	18	4,0913848	8
	19	33195577	113123	0,0459	22	3,841479	6
	19	34722418	921516	0,0299	27	4,1530261	20
	19	38853838	1895624	0,0085	24	3,895232	34
	19	57033283	5156456	0,0091	14	3,1469281	83
1b-2b	1	109538586	1580066	0,0224	5	2,9805551	58
	6	70761833	382704	0,0116	17	3,2107404	28
1a-2b	6	70761833	382704	0,0110	24	3,0754468	28

La Tabla 5 enumera los genes y los miARN que están codificados por secuencias de nucleótidos dentro de cada secuencia marcadora de pronóstico cáncer. En cualquiera de los métodos, el marcador de pronóstico cáncer puede seleccionarse entre los enumerados en la Tabla 5. Esos marcadores designados "M1" a "M20" son cada uno una región de ADN cromosómico, cuya amplificación produce una ganancia de número de copias en el marcador de resultado del cáncer, en donde la ganancia del número de copias se asocia con un mal pronóstico de enfermedad. Esos marcadores designados "DM1" a "DM27" son cada uno una región de ADN cromosómico, cuya eliminación produce una pérdida del número de copias en el marcador de resultado del cáncer, en donde la pérdida del número de copias se asocia con un mal pronóstico de enfermedad.

**TABLA 5: marcadores de resultado del cáncer y genes correspondientes y miARN**

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
M1	Cr 19, 34,7 Mb-35,6 Mb;	C19orf12; C19orf12; ciclina E1; PLEKHF1; POP4; y ZNF536
M2	Cr 19, 38,9-40,7 Mb;	ATP4A ATPasa; CHST8, DMKN FAR1,2,3; FXD1,3,5,7; GAPDHS; GPI; GPR42; GRAMD1A; HAMP; HPN; KCTD15 KIAA0355; KRTDAP; LGI4; LSM14A; LSR; REVISTA; PDCD2L; SAE2 SUMO1; SBSN; SCN1B; TMEM147,162; USF2; WTIP; y ZNF181,30,302,599,792
M3	Cr 17, 69,2-71,3 Mb;	ARMC7 (7 que contiene repetición de armadillo); ATP sintasa ATP5H (transportador de H+, complejo F0 mitocondrial, subunidad d); CASKIN2 (proteína interactiva CASK 2); CD300A (molécula CD300a); CD300C (molécula CD300c); CD300E (molécula de CD300e); CD300LB (miembro b de la familia de tipo molécula CD300); CD300LF (miembro f de familia de tipo molécula CD300); CDR2L (similar a la proteína 2 relacionada con la degeneración cerebelosa); DNAI2 (dineína, axonémica, cadena intermedia 2); (familia del dominio de la desaturasa de ácidos grasos FADS6, miembro 6); FDXR (ferredoxina reductasa); GALK1 (galactoquinasa 1);

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		GGA3 (asociada a golgi, que contiene gamma adaptina de oído, proteína de unión a ARF); GPR142 (receptor acoplado a proteína G 142); GPRC5C (receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro C); GRB2 (proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento); GRIN2C (receptor de glutamato, ionotrópico, N-metil D-aspartato 2C); H3F3B (Histona H3, familia 3B (H3.3B)); HN1 (transcrito 1 de carcinoma de colon inmaduro ICT1 expresado hematológico y neurológico 1); ITGB4 (integrina, beta 4); KCTD2 (2 que contiene el dominio de tetramerización de canales de potasio); KIAA0195; KIF19 (miembro 19 de la familia de cinesina); LLGL2 (homólogo 2 letal de larvas gigantes (Drosophila)); LOC388419 (similar a una proteína de unión a galectina - 3); MIF4GD (que contiene el dominio MIF4G); MRPS7 (proteína ribosomal mitocondrial S7); NAT9 (N- acetiltransferasa 9); NT5C (5',3'-nucleotidasa, citosólica); NUP85 (nucleoporina 85 kDa); OTOP2 (otopetrina 2); OTOP3 (otopetrina 3); RAB37 (RAB37, miembro de la familia oncogénica RAS); RECQL5 (proteína RecQ 5); RPL38 proteína ribosómica L38; SAP30BP (proteína de unión a SAP30); SLC16A5 (familia de portadores de soluto 16, miembro 5 (transportador de ácido monocarboxílico 6)); SLC25A19 (familia de portadores de soluto 25 (portador de pirofosfato de tiamina mitocondrial), miembro 19); SLC9A3R (familia de portadores de soluto 9 (intercambiador de sodio/hidrógeno), miembro 3 regulador 1); SUMO2 (homólogo 2 del supresor SMT3 de mif dos 3 (S. cerevisiae)); TMEM104 (proteína transmembrana 104); TTYH2 (homólogo tweety 2 (Drosophila)); UNK (homólogo unkempt (Drosophila)); y USH1G (síndrome de Usher 1G (autosómico recesivo)
M4	Cr 6, 70,8-71,1 Mb;	COL19A1 (colágeno, tipo XIX, alfa 1) y COL9A1 (colágeno, tipo IX, alfa 1)
M5	Cr 12, 93,7 kb-1,9 Mb;	ADIPOR2 (receptor de adiponectina 2); B4GALNT3 (beta-1,4-N-acetil-galactosaminil transferasa 3); CACNA2D4 (canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad alfa 2/delta 4); CCDC77 (77 que contiene el dominio de bobina helicoidal); ERC1 (que interactúa con ELKS/RAB6/miembro 1 de la familia CAST); FBXL14 (F-box y proteína 14 de repetición rica en leucina); HSN2 (neuropatía sensitiva hereditaria, tipo II); IQSEC3 (motivo IQ y dominio 3 de Sec7); JARID1A (jumonji, dominio interactivo rico en AT 1A); LRTM2 (repeticiones ricas en leucina y dominios transmembrana 2); NINJ2 (ninjurina 2); RAD52 (homólogo de RAD52 (S. cerevisiae)); SLC6A12 (familia 6 de portadores de soluto (transportador de neurotransmisores, betaína/GABA), miembro 12); SLC6A13 (familia 6 de portadores de soluto (transportador de neurotransmisores, GABA), miembro 13); WNK1 (proteína quinasa 1 deficiente en lisina de WNK); y WNT5B (familia del sitio de integración MMTV sin alas, miembro 5B)
M6	Cr 11, 64,3-64,8 Mb;	ARL2 (factor de tipo 2 de ribosilación de ADP); ATG2A ATG2 (homólogo A relacionado con la autofagia (S. cerevisiae)); BATF2 (factor de transcripción de la cremallera de leucina básico, similar a ATF 2, CAPN1 calpaína 1, (mu/I) subunidad grande); CDC42BPG (proteína quinasa gamma de unión a CDC42 (similar a DMPK)); CDCA5 (5 asociado al ciclo de división celular); EHD1 (1 que contiene el dominio EH); FAU (virus de sarcoma murino de Finkel-Biskis-Reilly (FBR-MuSV) expresado de manera ubicua); GPHA2 (hormona glicoproteica alfa 2); MAP4K2 proteína quinasa quinasa quinasa quinasa 2 activada por mitógeno
		MEN1 neoplasia endocrina múltiple I
		MRPL49 proteína ribosomal mitocondrial L49
		NAALADL1 dipeptidasa tipo 1 ácida ligada a alfa N-acetilada
		POLA2 polimerasa (dirigida por ADN), alfa 2 (subunidad de 70 kD)
		PPP2R5B proteína fosfatasa 2, reguladora de la subunidad B', isoforma beta
		SAC3D1 1 que contiene el dominio SAC3
		SLC22A20 familia de portadores de soluto 22, miembro 20
		SNX15 nexina de clasificación 15
		SPDYC homólogo C speedy (Drosophila)
		SYVN1 inhibidor de la apoptosis sinovial 1, sinoviolina
		TM7SF2 miembro 2 de la superfamilia transmembrana 7

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		ZFPL1 proteína tipo 1 de dedo de cinc
		ZNHIT2 dedo de cinc, HIT tipo 2; hsa-mir-192; y
		hsa-mir-194-2
M7	Cr 19, 57,0 - 62,2 Mb;	BIRC8 (8 que contiene repeticiones IAP baculovirales);
		BRSK1 (BR serina/treonina quinasa 1);
		CACNG6,7,8 canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad 6,7,8
		CCDC106 106 que contiene el dominio de bobina helicoidal
		CDC42EP5 proteína efectora CDC42 (unión a Rho GTPasa) 5
		CNOT3 Complejo de transcripción de CCR4-NOT, subunidad 3
		COX6B2 polipéptido 2 de la subunidad VIb de la citocromo c oxidasa (testículo)
		DPRX homeobox relacionado divergente-emparejado
		EPN1 epsina 1
		EPS8L1 EPS8 de tipo 1
		FCAR fragmento Fc de IgA, receptor de FIZ1 dedo de cinc 1 que interactúa con FLT3
		GALP péptido de tipo galanina
		GP6 glicoproteína VI (plaquetas)
		HSPBP1 proteína que interactúa con hsp70
		IL11 interleuquina 11
		ISOC2 2 que contiene dominio isocorismatasa
		KIR2DL1, KIR2DL4, KIR2DS4 KIR3DL1, KIR3DL3, KIR3DX1 receptor de tipo inmunoglobulina de células asesinas
		LAIR1,2 receptor similar a inmunoglobulina asociado a leucocitos 1,2
		LENG1,4,8,9 miembro del grupo de receptores leucocitarios (LRC) 1,4,8,9
		LILRA2,3,4 receptor leucocitario de tipo inmunoglobulina, subfamilia A (con dominio TM), miembro 2,3,4
		LILRB1,2,3,4,5 receptor leucocitario de tipo inmunoglobulina, subfamilia B (con dominios TM e ITIM), miembro 1,2,3,4,5
		MYADM marcador de diferenciación asociado a mieloide
		NAT14 N-acetiltransferasa 14
		NCR1 receptor de activación de la citotoxicidad natural 1
		NDUFA3 NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 subcomplejo alfa, 3, 9kDa
		NLRP2,4,5,7,8,9,11,12,13 familia NLR, 2,4,5,7,8,9,11,12,13 que contiene dominio pirina.
		OSCAR asociado a los osteoclastos, receptor tipo inmunoglobulina
		PEG3 expresado paternalmente 3
		PPP1R12C proteína fosfatasa 1, regulador (inhibidor) subunidad 12C
		PPP2R1A proteína fosfatasa 2 de (anteriormente 2A), subunidad reguladora A, isoforma alfa
		PRKCG proteína quinasa C, gamma
		PRPF31 homólogo del factor de procesamiento 31 pre-ARNm PRP31 (S. cerevisiae)

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		PTPRH proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, H
		RDH13 retinol deshidrogenasa 13 (todo-trans/9-cis)
		RPL28 proteína ribosomal L28
		RPS9 proteína ribosomal S9
		SAPS1 familia de dominios SAPS, miembro 1
		SUV420H2 homólogo 2 del supresor de variegación 4-20 (Drosophila)
		SYT5 sinaptotagmina V
		TFPT compañero de fusión TCF3 (E2A) (en la leucemia infantil)
		TMC4 4 de tipo canal transmembrana
		TMEM190 proteína transmembrana 190
		TMEM86B proteína transmembrana 86B
		TNNI3 troponina I tipo 3 (cardiaca)
		TNNT1 troponina T tipo 1 (esquelético, lento)
		TSEN34 homólogo de la endonucleasa 34 de empalme de tRNA (S. cerevisiae)
		TTYH1 homólogo 1 tweety (Drosophila)
		U2AF2 factor auxiliar de ARN nuclear pequeño 2 U2
		UBE2S enzima de conjugación de ubiquitina E2S
		VN1R2 receptor 2 de vomeronasal 1
		VN1R4 receptor 4 de vomeronasal 1
		VSTM1 1 que contiene conjunto V y dominio transmembrana
		ZNF28,160,320,321,331,347,350,415,432,444,468,470 proteína de dedo de cinc
		28,160,320,321,331,347,350,415,432,444,468,470; e incluyendo miARN
		hsa-mir-643, hsa-mir-512-1, hsa-mir-512-2, hsa-mir-498, hsa-mir-520e, hsa-mir-515-1, hsa-mir-519e, hsa-mir-520f, hsa-mir-515-2, hsa-mir-519c, hsa-mir-520a, hsa-mir-526b, hsa-mir-519b, hsa-mir-525, hsa-mir-523, hsa-mir-518f, hsa-mir-520b, hsa-mir-518b, hsa-mir-526a-1, hsa-mir-520c, hsa-mir-518c, hsa-mir-524, hsa-mir-517a, hsa-mir-519d, hsa-mir-521-2, hsa-mir-520d, hsa-mir-517b, hsa-mir-520g, hsa-mir-516-3, hsa-mir-526a-2, hsa-mir-518e, hsa-mir-518a-1, hsa-mir-518d, hsa-mir-516-4, hsa-mir-518a-2, hsa-mir-517c, hsa-mir-520h, hsa-mir-521-1, hsa-mir-522, hsa-mir-519a-1, hsa-mir-527, hsa-mir-516-1, hsa-mir-516-2, hsa-mir-519a-2, hsa-mir-371, hsa-mir-372, hsa-mir-373, hsa-mir-516a-1, hsa-mir-516a-2, hsa-mir-516b-1, hsa-mir-516b-2, hsa-mir-517a-1, hsa-mir-517a-2, hsa-mir-520c-1, hsa-mir-520c-2
M8	Cr 6, 39,1 - 39,9 Mb;	C6orf64 (marco de lectura abierto 64 del cromosoma 6); DNAH8 dineína, axonema, cadena pesada 8
		GLP1R receptor del péptido 1 de tipo glucagón
		KCNK16 canal de potasio, subfamilia K, miembro 16
		KCNK17 canal de potasio, subfamilia K, miembro 17
		KCNK5 Canal de potasio, subfamilia K, miembro 5
		KIF6 miembro 6 de la familia de cinesina.
M9	Cr 11, 64,8 - 65,7 Mb;	BANF1 (barrera al factor de autointegración 1); CATSPER1 canal de cationes, 1 asociado a espermatozoides
		CCDC85B 85B que contiene dominio de bobina helicoidal

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		CDC42EP2CDC42 proteína efectora (unión a Rho GTPasa) 2
		CFL1 cofilina 1 (no muscular)
		CST6 cistatina E/M
		CTSW catepsina W
		DPF2 D4, familia 2 de dedos de cinc y doble PHD
		DRAP1 DR1 asociado a la proteína 1 (cofactor negativo 2 alfa)
		EFEMP2 proteína 2 de la matriz extracelular de tipo fibulina que contiene EGF
		EHBP1L1 proteína 1 de tipo 1 de unión al dominio EH
		FAM89B familia con similitud de secuencia 89, miembro B
		FIBP proteína de unión intracelular al factor de crecimiento de fibroblastos (ácido)
		FOSL1 antígeno 1 de tipo FOS
		FRMD8 8 que contiene el dominio FERM
		GAL3ST3 galactosa-3-O-sulfotransferasa 3
		HTATIP proteína que interactúa con Tat de VIH-1, 60kDa. KCNK7 canal de potasio, subfamilia K, miembro 7
		LTBP3 proteína 3 de unión al factor beta de crecimiento transformante latente
		MAP3K11 proteína quinasa quinasa quinasa 11 activada por mitógenos
		MGC11102 proteína hipotética MGC11102
		MUS81 homólogo de endonucleasa MUS81 ( <i>S. cerevisiae</i> )
		OVOL1 1 de tipo ovo ( <i>Drosophila</i> )
		PACS1 proteína 1 de clasificación de agrupamiento de fosfofurina ácida
		PCNXL3 3 de tipo pecanex ( <i>Drosophila</i> )
		POLA2 polimerasa (dirigida por ADN) alfa 2 (subunidad de 70 kD)
		RELA homólogo A oncogén viral de la reticuloendoteliosis v-rel, factor nuclear del intensificador del gen de polipéptido de la cadena ligera kappa en células B 3, p65 (aviar)
		RNASEH2C ribonucleasa H2, subunidad C
		START1 antígeno de carcinoma de células escamosas reconocido por las células T
		SCYL1 1 de tipo SCY1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
		SF3B2 factor de empalme 3b, subunidad 2, 145 kDa
		SIPA1 gen 1 asociado a la proliferación inducida por señales
		SLC25A45 familia de portadores de soluto 25, miembro 45
		SSSCA1 autoantígeno 1 del síndrome de Sjogren/esclerodermia
		TIGD3 3 derivado del elemento transponible tigger
		TSGA10IP específica testículo, proteína que interactúa 10
M10	Cr 11, 61,4 - 64,3 Mb;	AHNAK (nucleoproteína AHNAK); ASRGL1 1 de tipo asparraginasa
		B3GAT3 beta-1,3-glucuroniltransferasa 3 (glucuronosiltransferasa I)
		BAD antagonista BCL2 de la muerte celular

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		BEST1 bestrofina 1
		BSCL2 lipodistrofia congénita 2 de Bernardinelli-Seip (seipina)
		CCDC88B 88B que contiene el dominio de bobina helicoidal
		CHRM1 receptor colinérgico, muscarínico 1
		COX8A citocromo c oxidasa subunidad 8A (ubicua)
		DKFZP564J0863 proteína DKFZP564J0863
		DKFZP566E164 proteína DKFZP566E164
		ADNJC4 homólogo de DnaJ (Hsp40), subfamilia C, miembro 4
		EEF1G factor de elongación de la traducción eucariótica 1 gamma
		EML3 proteína asociada a los microtúbulos del equinodermo de tipo 3
		ESRRA receptor alfa relacionado con estrógenos
		FADS2,3 desaturasa 2,3 de ácido graso
		FKBP2 FK506 proteína de unión 2, 13kDa
		FLRT1 proteína 1 transmembrana rica en fibronectina y leucina
		FTH1 ferritina, polipéptido pesado 1
		GANAB glucosidasa, alfa; neutra AB
		GNG3 proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gamma 3
		GPR137 receptor acoplado a proteína G137
		HRASLS2,3,5 supresor de tipo HRAS 2,3,5
		INCENP antígenos de proteínas centroméricas internas de 135/155kDa
		INTS5 subunidad 5 del complejo integrador
		KCNK4 canal de potasio, subfamilia K, miembro 4
		LGALS12 lectina, unión a galactósido, soluble, 12 (galectina 12)
		MACROD1 1 que contiene el dominio MACRO
		MARK2 MAP/quinasa 2 reguladora de la afinidad por microtúbulos
		MGC3196 hipotética proteína MGC3196
		MTA2 familia 1 asociada a metástasis, miembro 2
		NAT11 N-acetiltransferasa 11
		NRXN2 neurexina 2
		NUDT22 motivo 22 de tipo nudix (nucleósido difosfato unido a X)
		NXF1 factor 1 de exportación de ARN nuclear
		OTUB1 dominio OTU, 1 de unión a ubiquitina aldehído
		PLCB3 fosfolipasa C, beta 3 (específica de fosfatidilinositol)
		POLR2G polipéptido G de polimerasa (ARN) II (dirigido por ADN)
		PPP1R14B proteína fosfatasa 1, reguladora (inhibidora) subunidad 14B
		PRDX5 peroxiredoxina 5
		PYGM fosforilasa, glucógeno; músculo (síndrome de McArdle, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo V)

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		RAB3IL1 1 de tipo proteína que interactúa con RAB3A (rabina3)
		RARRES3 respondedora 3 del receptor de ácido retinoico (inducida por tazaroteno)
		RASGRP2 proteína 2 liberadora de guanilo RAS (regulada por calcio y DAG)
		RCOR2 correpresor 2 de REST
		ROM1 proteína de la membrana del segmento externo de la retina 1
		RPS6KA4 proteína quinasa S6 ribosómica, 90 kDa, polipéptido 4
		RTN3 reticulón 3
		SCGB1A1, 1D1, 1D2, 1D4, 2A1, 2A1 secretoglobina, familia
		SF1 factor de empalme 1
		SLC22A10, 11, 12, 6, 8, 9 familia de portadores de soluto 22 (transportador de aniones/cationes orgánicos) SLC3A2 familia de portadores de soluto 3 (activadores del transporte de aminoácidos dibásicos y neutros), miembro 2
		STIP1 fosfoproteína 1 inducida por estrés (proteína que organiza Hsp70/Hsp90)
		STX5 sintaxina 5
		TAF6L ARN polimerasa II de tipo TAF6, factor asociado al factor asociado con p300/CBP (PCAF), 65kDa
		TRPT1 tRNA fosfotransferasa 1
		TTC9C dominio de repetición del tetratricopeptido 9C
		TUT1 uridilil transferasa 1 terminal, específica de ARNpn U6
		URP2 proteína 2 relacionada con UNC-112
		UST6 supuesto transportador de aniones orgánicos de tipo UST1
		VEGFB factor de crecimiento endotelial vascular B
		WDR74 dominio de repetición WD 74; y
		ZBTB3 dedo de cinc y 3 que contiene el dominio BTB
M11	Cr 17, 51,5 - 53,2 Mb;	AKAP1 (proteína de anclaje de la quinasa A (PRKA) 1); ANKFN1 (1 que contiene el dominio de repetición de anquirina y dominio de fibronectina de tipo III);
		C17 o f67 marco de lectura abierto 67 del cromosoma 17
		COIL coilina
		DGKE diacilglicerol quinasa, epsilon 64kDa
		MSI2 homólogo 2 musashi (Drosophila)
		NOG nogina
		SCPEP1 serina carboxipeptidasa 1; y
		TRIM25 25 que contiene el motivo tripartito
M12	Cr 17, 43,5 - 44,9 Mb;	hsa-mir-10a; hsa-mir-196a-1; ABI3 (familia de genes ABI, miembro 3); ATP5G1 (ATP sintasa, transporte de H <sup>+</sup> , complejo F0 mitocondrial, subunidad C1 (subunidad 9)); B4GALNT2 beta-1,4-N-acetil-galactosaminil transferasa 2
		CALCOCO2 dominio 2 de unión a calcio y bobina helicoidal
		CBX1 homólogo 1 cromobox (homólogo HP1 beta de Drosophila)
		GIP polipéptido inhibidor gástrico
		GNGT2 proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), polipéptido 2 con actividad

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		de transducción gamma
		HOXB1,2,3,4,5,6,7,8,9,13 homeobox
		B1,2,3,4,5,6,7,8,9,13
		IGF2BP1 proteína 1 de unión a ARNm del factor de crecimiento de tipo insulínico 2
		NFE2L1 1 de tipo factor nuclear (2 derivado de eritroides)
		NGFR receptor del factor de crecimiento nervioso (superfamilia TNFR, miembro 16)
		PHB prohibitina
		PHOSPHO1 fosfatasa, huérfano 1
		PRAC proteína nuclear pequeña PRAC
		SKAP1 fosfoproteína 1 asociada a src quinasa
		SNF8 SNF8, subunidad del complejo ESCRT-II, homólogo (S. cerevisiae)
		SNX11 nexina 11 de clasificación
		TTL6 familia de tipo tirosina ligasa de tubulina, miembro 6
		UBE2Z (enzima de conjugación con ubiquitina E2Z); y
		ZNF652 (proteína de dedo de cinc 652).
M13	Cr 2, 147,6 - 151,1 Mb;	ACVR2A receptor de activina A, tipo IIA; C2orf25 marco de lectura abierto 25 del cromosoma 2
		EPC2 intensificador del homólogo 2 de polycomb (Drosophila)
		KIF5C miembro 5C de la familia de cinesinas
		LOC130576 proteína hipotética LOC130576
		LYPD6 6 que contiene dominio LY6/PLAUR
		MBD5 proteína 5 del dominio de unión a metil-CpG
		ORC4L complejo de reconocimiento de origen, subunidad tipo 4 (levadura)
		RND3 GTPasa 3 de la familia Rho
M14	Cr 6, 123,7 - 135,6 Mb;	hsa-mir-588; AKAP7 (proteína de anclaje 7 de la quinasa A (PRKA)); ALDH8A1 familia 8 de aldehído deshidrogenasa, miembro A1
		ARG1 arginasa, hígado
		ARHGAP18 proteína 18 que activa Rho GTPasa
		CTGF factor de crecimiento del tejido conectivo
		ECHDC1 1 que contiene el dominio hidratasa de enoil Coenzima A
		ENPP1,3 ectonucleótido pirofosfatasa/fosfodiesterasa 1,3
		EPB41L2 2 de tipo banda de proteína de membrana de eritrocitos 4.1
		EYA4 homólogo 4 ausente en ojos (Drosophila)
		HDDC2 2 que contiene el dominio HD
		HEY2 motivo 2 piloso/potenciador de división relacionado con YRPW
		HINT3 proteína 3 de unión a nucleótidos de la triada de histidina
		KIAA1913 KIAA1913
		LAMA2 laminina, alfa 2 (merosina, distrofia muscular congénita)

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		MED23 subunidad 23 del complejo mediador
		MOXD1 monooxigenasa, 1 de tipo DBH
		MYB homólogo de oncogén viral de la mieloblastosis v-myb (aviar)
		NCOA7 coactivador 7 de receptores nucleares
		NKAIN2 2 que interactúa con ATPasa de transporte de Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>
		OR2A4 receptor olfativo, familia 2, subfamilia A, miembro 4
		PTPRK proteína tirosina fosfatasa, tipo receptor, K. RNF146 proteína de dedo anular 146
		RNF217 proteína de dedo anular 217
		RPS12 proteína ribosómica S12
		SAMD3 3 que contiene el dominio del motivo alfa estéril
		SGK quinasa regulada por suero/glucocorticoide
		SLC2A12 familia 2 de transportadores de soluto (transportador de glucosa facilitado), miembro 12
		STX7 sintaxina 7
		TAAR1,2,5,6,8,9 receptor 1,2,5,6,8,9 asociado a amina traza
		TBPL1 1 de tipo TBP
		TCF21 factor de transcripción 21
		TPD52L1 1 de tipo proteína tumoral D52
		TRDN triadina
		TRMT11, homólogo de tRNA metiltransferasa 11 ( <i>S. cerevisiae</i> ); y VNN1,2,3 (vanina 1,2,3).
M15	Cr 8, 6,9 - 8,8 Mb;	CLDN23 claudina 23;
		DEFA5 defensina, alfa 5, específica de célula de Paneth;
		DEFB103B defensina, beta 103B
		DEFB104A defensina, beta 104A
		DEFB104B defensina, beta 104B
		DEFB105B defensina, beta 105B
		DEFB106A defensina, beta 106A
		DEFB106B defensina, beta 106B
		DEFB107A defensina, beta 107A
		DEFB107B defensina, beta 107B
		DEFB4 defensina, beta 4
		MFHAS 1 secuencia 1 amplificada de histiocitoma fibroso maligno
		PRAGMIN homólogo de pragma de rata de Rnd2
		SPAG11A antígeno asociado con espermatozoides 11A; y
		SPAG11B antígeno asociado con espermatozoides 11B
M16	Cr 2, 159,9 - 161,4 Mb;	BAZ2B bromodominio adyacente al dominio del dedo de cinc, 2B;

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		CD302 molécula CD302
		ITGB6 integrina, beta 6
		LY75 antígeno de linfocitos 75
		MARCH7 (dedo anular asociado a la membrana (C3HC4) 7);
		PLA2R1 (receptor 1 de fosfolipasa A2, 180 kDa); y
		RBMS 1 (motivo de unión a ARN, proteína de interacción 1 de cadena sencilla).
M17	Cr 2, 200,9 - 204,2 Mb;	ABI2 2 interactuadora con abl; ALS2 esclerosis lateral amiotrófica tipo 2 (juvenil)
		ALS2CR2, 4, 7, 8, 11, 12, 13 región cromosómica de la esclerosis lateral amiotrófica tipo 2 (juvenil), candidato 2, 4, 7, 8, 11, 12, 13
		AOX1 aldehído oxidasa 1
		BMPR2 receptor de la proteína morfogenética ósea, tipo II (serina/treonina quinasa)
		BZW1 cremallera de leucina de carácter básico y dominios 1 de W2
		CASP10 caspasa 10, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis
		CASP8 caspasa 8, cisteína peptidasa relacionada con la apoptosis
		CFLAR CASP8 y regulador de la apoptosis tipo FADD
		CLK1 quinasa 1 de tipo CDC
		CYP20A1 citocromo P450, familia 20, subfamilia A, polipéptido 1
		FAM126B familia con similitud de secuencia 126, miembro B
		FZD7 homólogo frizzled 7 (Drosophila) ICA1L autoantígeno de células de los islotes tipo 1,69 kDa
		KCTD18 18 que contiene el dominio de tetramerización de canales de potasio
		LOC26010 proteína 6 transactivada de ADN polimerasa viral
		MPP4 proteína de membrana, palmitoilada 4 (MAGUK miembro 4 de la subfamilia p55). NBEAL1 1 de tipo neurobeachina
		NDUFB3 subcomplejo 1 beta de NADH deshidrogenasa (ubiquinona), 3, 12kDa
		NIF3L1 1 de tipo factor 3 de interacción NIF3 NGG1 (S. pombe)
		NOP5/NOP58 proteína nucleolar NOP5/NOP58
		ORC2L complejo de reconocimiento de origen, tipo subunidad 2 (levadura)
		PPIL3 3 de tipo peptidilprolil isomerasa (ciclofilina)
		RAPH1 asociación Ras (RalGDS/AF-6) y dominios 1 de homología con pleckstrina
		SGOL2 2 de tipo shugoshina (S. pombe)
		SUMO1 supresor SMT3 del homólogo 1 de mif dos 3 (S. cerevisiae)
		TRAK2 tráfico de proteínas, 2 de unión a cinesina; y
		WDR12 (dominio 12 de repetición de WD)
M18	Cr 6, 36,3 - 36,7 Mb;	BRPF3 (que contiene bromodominio y dedo PHD, 3)
		DKFZp779B1540 proteína hipotética DKFZp779B1540
		ETV7 gen 7 variante de ets (oncogén TEL2)

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		KCTD20 20 que contiene el dominio de tetramerización de canales de potasio
		PNPLA1 1 que contiene el dominio fosfolipasa de tipo patatina
		PXT1 peroxisomal, 1 específica de testículo
		SFRS3 factor de empalme, 3 rica en arginina/serina; y
		STK38 (serina/treonina quinasa 38)
M19	Cr 2, 205,9 - 208,1 Mb; y	ADAM23 (dominio de metalopeptidasa ADAM 23); CPO carboxipeptidasa O;
		DYTN distrotelina
		EEF1B2 factor 1 beta 2 de elongación de la traducción eucariótica
		FASTKD2 dominios 2 de la quinasa FAST
		FLJ20309 proteína hipotética FLJ20309
		GPR1 receptor 1 acoplado a proteína G
		KLF7 factor 7 de tipo Kruppel (ubicuo)
		MDH1B malato deshidrogenasa 1B, NAD (soluble)
		NDUFS1 proteína 1 de NADH deshidrogenasa (ubiquinona) Fe-S, 75kDa (NADH-coenzima Q reductasa)
		NRP2 neuropilina 2
		PARD3B homólogo B carente de la partición 3 par-3 (C. elegans)
		ZDBF2 (2 que contiene dedo de cinc, tipo DBF); y
		HCG 1657980 hCG1657980
M20	Cr 1, 109,5 - 111,1 Mb.	hsa-mir-197; AHCYL1 1 que contiene S-adenosil homocisteína hidrolasa); ALX3 homeobox 3 de tipo aristaless
		AMIGO1 molécula de adherencia con dominio 1 de tipo Ig
		AMPD2 adenosina monofosfato desaminasa 2 (isoforma L)
		ATXN7L2 2 de tipo ataxina 7
		CELSR2 cadherina, receptor 2 de tipo G de siete pasos EGF LAG (homólogo flamingo, Drosophila)
		CSF1 factor estimulador de colonias 1 (macrófagos)
		CYB561D1 1 que contiene el dominio de citocromo b-561
		EPS8L3 3 de tipo EPS8
		FAM40A familia con similitud de secuencia 40, miembro A
		GNAI3 proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), polipéptido 3 con actividad inhibidora alfa
		GNAT2 GNAT2 proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), polipéptido 2 con actividad transductora alfa
		GPR61 receptor 61 acoplado a proteína G
		GSTM1,M2,M3,M4,M5 glutatión S-transferasa M1, M2 (músculo), M3 (cerebro), M4, M5
		HBXIP proteína interactiva con virus x de la hepatitis B
		KCNA2,3,4,10 canal de potasio activado por voltaje, familia relacionada con el tipo shaker, miembro 2,3,4,10; KIAA1324 KIAA1324

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		MYBPHL de tipo proteína H de unión a miosina
		PROK1 proquineticina 1
		PSMA5 subunidad de proteasoma (prosome, macropáina), tipo alfa, 5
		PSRC1 bobina helicoidal 1 rica en prolina/serina
		RBM15 proteína 15 con motivo de unión a ARN
		SARS seril-ARNt sintetasa
		SLC16A4 familia de portadores de soluto 16, miembro 4 (transportador 5 de ácido monocarboxílico)
		SLC6A17 familia de portadores de soluto 6, miembro 17
		SORT1 sortilina 1
		SYPL2 2 de tipo sinaptofisina
		UBL4B (4B de tipo ubiquitina)
DM1	Cr 5, 62,9 - 67,8 Mb	ADAMTS6 metalopeptidasa ADAM con motivo 1 de tipo trombospondina, 6
		CD180 molécula CD180
		CENPK proteína K centromérica
		ERBB2IP proteína que interactúa con erbb2
		FLJ13611 proteína hipotética FLJ13611
		HTR1A receptor 1A de 5-hidroxitriptamina (serotonina)
		MAST4 miembro 4 de la familia serina/treonina quinasa asociada a microtúbulos
		NLN neurolisina (familia de metalopeptidasa M3)
		P18SRP proteína P18SRP
		PIK3R1 fosfoinositido-3-quinasa, subunidad reguladora 1 (p85 alfa)
		PPWD1 1 que contiene el dominio peptidilprolil isomerasa y repetición WD
		RGS7BP regulador de la proteína 7 de unión de señalización de proteína G
		RNF180 proteína 180 de dedo anular
		SDCCAG10 antígeno 10 de cáncer de colon definido serológicamente
		SFRS12 factor de empalme, 12 rica en arginina/serina
		SGTB repetición pequeña de tetratricopéptido rico en glutamina que contiene (TPR) beta0; y
		TRIM23 23 que contiene motivo tripartito.
DM2	Cr 5, 53,3 - 53,8 Mb	ARL15 (15 de tipo factor de ribosilación de ADP); HSPB3 (proteína 3 de choque térmico de 27 kDa) y hsa-miR-581.
DM3	Cr 4, 105,8 - 107,2 Mb	FLJ20184 (proteína hipotética FLJ20184);
		GSTCD (glutación S-transferasa, que contiene dominio C-terminal);
		INTS12 subunidad 12 del complejo integrador
		KIAA1546 KIAA1546
		MGC16169 proteína hipotética MGC16169
		NPNT (nefronectina); y

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		PPA2 pirofosfatasa (inorgánica) 2.
DM4	Cr 16, 45,8 - 46,3 Mb	ITFG1 (1 que contiene la repetición FG-GAP de integrina alfa) y PHKB (fosforilasa quinasa, beta).
DM5	Cr 5, 50,7 - 52,0 Mb	ISL1 (homeobox LIM ISL).
DM6	Cr 5, 94,2- 96,1 Mb	ARSK (familia arilsulfatasa, miembro K);
		CAST (calpastatina);
		ELL2 (factor de elongación, ARN polimerasa II, 2);
		FAM81B familia con similitud de secuencia 81, miembro B
		GLRX glutaredoxina (tioltransferasa)
		GPR150 receptor 150 acoplado a proteína G
		KIAA0372 KIAA0372
		MCTP1 múltiples dominios C2, transmembrana 1
		PCSK1 proproteína convertasa de subtilisina/kexina tipo 1
		RFESD (que contiene dominio de Rieske (Fe-S))
		RHOBTB3 3 que contiene el dominio BTB relacionado con Rho
		SPATA9 (9 asociada a la espermatogénesis); y hsa-miR-583.
DM7	Cr 9, 36,1 - 37,0 Mb	C9orf19 marco de lectura abierto 19 del cromosoma 9
		CCIN calicina
		CLTA clatrina, cadena ligera (Lca)
		GNE glucosamina (UDP-N-acetil)-2-epimerasa/N-acetilmanosamina quinasa
		MELK quinasa de cremallera la leucina embrionaria materna
		PAX5 caja emparejada 5
		RECK proteína rica en cisteína que induce reversión con motivos kazal
		RNF38 proteína 38 de dedo anular.
DM8	Cr 5, 94,2 - 96,1 Mb	ARSK familia arilsulfatasa, miembro K
		CAST calpastatina
		ELL2 factor de elongación, ARN polimerasa II, 2
		FAM81B familia con similitud de secuencia 81, miembro B
		GLRX glutaredoxina (tioltransferasa)
		GPR150 receptor 150 acoplado a proteína G
		KIAA0372 KIAA0372
		MCTP1 dominios C2 múltiples, transmembrana 1
		PCSK1 proproteína convertasa de subtilisina/kexina tipo 1
		RFESD que contiene dominio de Rieske (Fe-S)
		RHOBTB3 3 que contiene dominio BTB relacionado con Rho

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		SPATA9 asociada a la espermatogénesis
DM9	Cr 14, 51,1 - 52,8 Mb	C14orf166 marco de lectura abierto 166 del cromosoma 14; DDHD1 1 que contiene el dominio DDHD
		ERO1L de tipo ERO1 ( <i>S. cerevisiae</i> )
		FRMD6 6 que contiene el dominio FERM
		GNG2 proteína de unión a nucleótidos de guanina (proteína G), gamma 2
		GPNPAT1 glucosamina-fosfato N-acetiltransferasa 1
		GPR137C receptor 137C acoplado a proteína G
		NID2 nidógeno 2 (osteonidógeno)
		PLEKHC1 que contiene el dominio homología con pleckstrina, familia C (con dominio FERM) miembro 1
		PSMC6 subunidad 26S del proteasoma (prosome, macropaina), ATPasa, 6
		PTGDR receptor de prostaglandina D2 (DP)
		PTGER2 receptor 2 de prostaglandina E (subtipo EP2), 53kDa
		STYX proteína que interactúa con serina/treonina/tirosina
		TXNDC16 16 que contiene el dominio de la tiorredoxina.
DM10	Cr 14, 61,5 - 68,6 Mb	ACTN1 actinina, alfa 1
		AKAP5 proteína 5 de anclaje de quinasa A (PRKA)
		ARG2 arginasa, tipo II
		ATP6V1D ATPasa, transporte de H <sup>+</sup> , lisosomal de 34kDa, subunidad D de V1
		C14orf50 marco de lectura abierto 50 del cromosoma 14
		C14orf54 marco de lectura abierto 54 del cromosoma 14
		C14orf83 marco de lectura abierto 83 del cromosoma 14
		CHURC1 1 que contiene el dominio churchill
		EIF2S1 factor 2 de iniciación de la traducción eucariótica, subunidad 1 alfa, 35kDa
		ESR2 receptor 2 de estrógeno (ER beta)
		FLJ39779 proteína FLJ39779
		FNTB farnesiltransferasa, caja CAAX, beta
		FUT8 fucosiltransferasa 8 (alfa (1,6) fucosiltransferasa)
		GPHB5 hormona beta 5 glicoproteica
		GPHN gefirina
		GPX2 glutatión peroxidasa 2 (gastrointestinal)
		HSPA2 proteína 2 de choque térmico de 70kDa
		KCNH5 canal de potasio activado por voltaje, subfamilia H (relacionada con eag), miembro 5
		MAX factor X asociado a MYC
		MPP5 proteína de membrana, palmitoilada 5 (miembro 5 de subfamilia p55 MAGUK)
		MTHFD1 metileno tetrahidrofolato deshidrogenasa (NADP <sup>+</sup> dependiente) 1, metil tetrahidrofolato ciclohidrolasa, formil tetrahidrofolato sintetasa

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		PIGH biosíntesis de ancla de fosfatidilinositol glicano, clase H
		PLEK2 pleckstrina 2
		PLEKHG3 que contiene el dominio de homología con pleckstrina, miembro 3 de la familia G (con dominio RhoGef)
		PLEKHH1 que contiene el dominio homología con pleckstrina, miembro 1 de la familia H (con dominio MyTH4)
		PPP2R5E proteína fosfatasa 2, reguladora subunidad B', isoforma epsilon.
		RAB15 RAB15, miembro de la familia oncogénica RAS
		RAD51L1 1 de tipo RAD51 (S. cerevisiae)
		RDH11 retinol deshidrogenasa 11 (todo-trans/9-cis/11-cis)
		RDH12 retinol deshidrogenasa 12 (todo-trans/9-cis/11-cis)
		RHOJ familia de genes homólogos de ras, miembro J
		SGPP1 esfingosina-1-fosfato fosfatasa 1
		SPTB espectrina, beta, eritrocítica (incluye esferocitosis, tipo clínico I)
		SYNE2 que contiene repeticiones de espectrina, 2 de envoltura nuclear
		SYT16 sinaptotagmina XVI
		VTI1B transporte de vesículas a través de la interacción con homólogo 1B de t-SNARES (levadura)
		WDR22 dominio 22 de repetición de WD
		WDR89 dominio 89 de repetición WD
		ZBTB1 1 que contiene dedo de cinc y dominio BTB
		ZBTB25 25 que contiene dedo de cinc y dominio BTB
		ZFP36L1 proteína 36 de dedo de cinc, tipo C3H 1
		ZFYVE26 dedo de cinc, 26 que contiene dominio FYVE y hsa-miR-625.
DM11	Cr 9, 28,1 Mb	LINGO2 (2 que contiene repetición rica en leucina y dominio Ig).
DM12	Cr 4, 43,7 - 44,2 Mb	KCTD8 (8 que contiene el dominio de tetramerización de canales de potasio).
DM13	Cr 5, 60,8 - 62,9 Mb	DIMT1L de tipo dimetiladenosina transferasa DIM1 (S. cerevisiae)
		FLJ37543 hipotética proteína FLJ37543
		IPO11 importina 11
		ISCA1L de tipo homólogo 1 de ensamblaje de agrupamiento hierro-azufre (S. cerevisiae)
		KIF2A miembro 2A de la cadena pesada de cinesina.
DM14	Cr 3, 120,0 - 121,1 Mb	ADPRH ADP-ribosilarginina hidrolasa; B4GALT4 UDP-Gal: betaGlcNAc beta 1,4-galactosiltransferasa, polipéptido 4
		C3orf1 marco de lectura abierto 1 del cromosoma 3
		C3orf15 marco de lectura abierto 15 del cromosoma 3
		C3orf30 marco de lectura abierto 30 del cromosoma 3
		CD80 molécula CD80

ES 2 658 891 T3

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		CDGAP proteína activadora de GTPasa Cdc42
		COX 17 homólogo de ensamblaje de la citocromo c oxidasa COX 17 (S. cerevisiae)
		GSK3B glucógeno sintasa quinasa 3 beta
		IGSF11 superfamilia de inmunoglobulina, miembro 11
		KTELC1 1 que contiene KTEL (Lys-Tyr-Glu-Leu)
		NR1I2 subfamilia 1 de receptor nuclear, grupo I, miembro 2
		PLA1A miembro A de fosfolipasa A1
		POPDC2 2 que contiene el dominio popeye
		TMEM39A proteína transmembrana 39A; y
		UPK1B uroplaquina 1B.
DM15	Cr 4, 46,2 - 48,0 Mb	CLDN23 claudina 23; DEFA5 defensina, alfa 5, específica de célula de Paneth;
		DEFB103B defensina, beta 103B
		DEFB104A defensina, beta 104A
		DEFB104B defensina, beta 104B
		DEFB105B defensina, beta 105B
		DEFB106A defensina, beta 106A
		DEFB106B defensina, beta 106B
		DEFB107A defensina, beta 107A
		DEFB107B defensina, beta 107B
		DEFB4 defensina, beta 4
		MFHAS 1 secuencia 1 amplificada de histiocitoma fibroso maligno
		PRAGMIN homólogo de la rata pragma de Rnd2
		Antígeno asociado con esperma SPAG11A 11A; y
		SPAG11B antígeno asociado con esperma 11B.
DM16	Cr 14, 38,9 - 40,0 Mb	FBXO33 (proteína F-box 33).
DM17	Cr 4, 44,2- 44,6 Mb	GNPDA2 (glucosamina-6-fosfato desaminasa 2); GUF1 (homólogo de GTPasa de GUF1 (S. cerevisiae)); e YIPF7 (familia de dominio Yip1, miembro 7).
DM18	Cr 2, 213,7 - 214,3 Mb	IKZF2 familia de dedo de cinc 2 IKAROS (Helios)
		SPAG16 antígeno 16 asociado a espermatozoides.
DM19	Cr 14, 43,9 - 46,6 Mb	C14orf106 marco de lectura abierto 106 del cromosoma 14
		C14orf155 marco de lectura abierto 155 del cromosoma 14
		C14orf28 marco de lectura abierto 28 del cromosoma 14
		FANCM Anemia de Fanconi, grupo de complementación M
		FKBP3 proteína 3 de unión a FK506, 25kDa
		KIAA0423 KIAA0423

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		KLHL28 28 de tipo kelch ( <i>Drosophila</i> )
		MDGA2 dominio MAM que contiene el ancla 2 de glicosilfosfatidilinositol
		PRPF39 homólogo 39 del factor de procesamiento pre-mRNA PRP39 ( <i>S. cerevisiae</i> )
		RPL10L proteína ribosómica de tipo L10.
DM20	Cr 14, 27,6 - 28,6 Mb	FOXG1 (caja forkhead G1).
DM21	Cr 3, 98,0 - 98,3 Mb	EPHA6 (receptor A6 de EPH).
DM22	Cr 14, 55,2 - 60,0 Mb	ACTR10 homólogo de proteína 10 relacionada con actina ( <i>S. cerevisiae</i> )
		ARID4A dominio interactivo 4A rico en AT (tipo RBP1)
		C14orf100 marco de lectura abierto 100 del cromosoma 14
		C14orf101 marco de lectura abierto 101 del cromosoma 14
		C14orf105 marco de lectura abierto 105 del cromosoma 14
		C14orf108 marco de lectura abierto 108 del cromosoma 14
		C14orf135 marco de lectura abierto 135 del cromosoma 14
		C14orf149 marco de lectura abierto 149 del cromosoma 14
		C14orf37 marco de lectura abierto 37 del cromosoma 14
		C14orf39 marco de lectura abierto 39 del cromosoma 14
		DAAM1 activador de la morfogénesis 1 asociado a dishevelled
		DACT1 dapper, antagonista de beta-catenina, homólogo 1 ( <i>Xenopus laevis</i> )
		DHRS7 miembro 7 de deshidrogenasa/reductasa (familia SDR)
		EXOC5 componente 5 del complejo exocyst
		GPR135 receptor acoplado a proteína G 135
		KIAA0586 KIAA0586
		NAT12 N-acetiltransferasa 12
		OTOX2 homeobox 2 de orthodenticle
		PELI2 homólogo 2 de pellino ( <i>Drosophila</i> )
		PPM1A proteína fosfatasa 1A (anteriormente 2C), dependiente de magnesio, isoforma alfa
		PSMA3 subunidad de proteasoma (prosome, macropáina), tipo alfa, 3
		RTN1 reticulón 1
		SLC35F4 familia 35 de portadores de soluto, miembro F4
		TIMM9 translocasa del homólogo 9 de la membrana mitocondrial interna (levadura)
		UNQ9438 TIMM.
DM23	Cr 14, 48,7 - 51,1 Mb	ABHD12B 12B que contiene el dominio de la anhidrolasa
		ARF6 factor 6 de ribosilación de ADP
		ATP5S ATP sintasa, transporte de H <sup>+</sup> , complejo F0 mitocondrial, subunidad s (factor B)
		C14orf104 marco de lectura abierto 104 del cromosoma 14

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		C14orf138 marco de lectura abierto 138 del cromosoma 14
		CDKL1 1 de tipo quinasa dependiente de ciclina (quinasa relacionada con CDC2)
		FRMD6 6 que contiene el dominio FERM
		KLHDC2 1 que contiene el dominio kelch
		KLHDC2 2 que contiene el dominio kelch
		L2HGDH L-2-hidroxiglutarato deshidrogenasa
		LOC 196913 proteína hipotética LOC 196913
		LOC283551 proteína hipotética LOC283551
		MAP4K5 proteína quinasa quinasa quinasa quinasa 5 activada por mitógeno
		MGAT2 manosil (alfa-1,6-)-glucoproteína beta-1,2-N-acetilglucosaminiltransferasa
		NIN nineína (proteína que interactúa con GSK3B)
		POLE2 polimerasa (dirigida por ADN), epsilon 2 (subunidad p59)
		PPIL5 5 de tipo peptidilprolil isomerasa (ciclofilina)
		PYGL fosforilasa, glucógeno; hígado (enfermedad de Hers, enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo VI)
		RPL36AL de tipo proteína ribosomal L36a
		RPS29 proteína ribosomal S29.
DM24	Cr 4, 81,4 - 83,2 Mb	BMP3 proteína 3 morfogenética ósea (osteogénica)
		C4orf22 marco de lectura abierto 22 del cromosoma 4
		FGF5 factor 5 de crecimiento de fibroblastos
		PRKG2 proteína cinasa, dependiente de cGMP, tipo II
		RASGEF1B familia del dominio RasGEF, miembro 1B.
DM25	Cr 10, 51,9 - 54,2 Mb	ACF factor de complementación de apobec-1
		ASAH2B N-acilesfingosina amidohidrolasa (ceramidasa no lisosómica) 2B
		CSTF2T factor de estimulación de escisión, 3' pre-ARN, subunidad 2, 64kDa, variante tau
		DKK1 homólogo 1 dickkopf ( <i>Xenopus laevis</i> )
		MBL2 lectina de unión a manosa (proteína C) 2, soluble (defecto opsónico)
		PRKG1 proteína quinasa, dependiente de cGMP, tipo I
		SGMS1 esfingomielina sintasa 1 hsa-miR-605.
DM26	Cr 5, 55,2- 58,6 Mb	ANKRD55 dominio 55 de repetición de anquirina
		C5orf29 marco de lectura abierto 29 del cromosoma 5
		C5orf35 marco de lectura abierto 35 del cromosoma 5
		DKFZp686D0972 similar al gen 4732495G21 de ADNc RIKEN
		GPBP1 proteína 1 de unión al promotor rico en GC
		IL31RA receptor A de interleuquina 31
		IL6ST transductor de señales interleuquina 6 (gp130, receptor M de oncostatina)

Núm. ID	Marcador de pronóstico cáncer	Genes y miARN
		MAP3K1 proteína quinasa quinasa quinasa 1 activada por mitógeno
		MIER3 1 de respuesta temprana de inducción de mesodermo, miembro 3 de la familia
		PDE4D fosfodiesterasa 4D, específica de AMPc (homólogo duncce de fosfodiesterasa E3, Drosophila)
		PLK2 quinasa 2 de tipo polo (Drosophila)
		RAB3C RAB3C, miembro de la familia oncogénica RAS.
DM27	Cr 5, 67,8 - 68,5 Mb.	CCNB1 (ciclina B1) y SLC30A5 (familia de portadores de soluto 30 (transportador de cinc), miembro 5).

5 La Tabla 6 enumera las coordenadas para cada marcador de pronóstico cáncer, utilizando los mismos números de referencia que figuran en la Tabla 5. Todas las coordenadas se basan en el ensamblaje del genoma humano hg18 (NCBI Build 36). Los marcadores se priorizaron en importancia y se les asignó un número de referencia en orden de importancia descendente. En otras palabras, M1 se refiere al marcador de amplificación de mayor prioridad, mientras que M20 se refiere al marcador de prioridad más baja, y DM1 se refiere al marcador de delección de mayor prioridad, mientras que DM27 se refiere al marcador de delección de prioridad más baja. Para los marcadores de amplificación (M1-M20), se consideraron los siguientes factores al priorizar los marcadores: a) la frecuencia con la que el marcador se amplificó entre los pacientes; b) el grado de amplificación del marcador cuando se amplifica; y c) si el marcador contiene genes con una asociación conocida al cáncer. Para los marcadores de delección (DM1-DM27), se consideraron los mismos factores a) y c) ((b) no fue comparablemente aplicable porque el "grado de delección" está limitado por el hecho de que solo se pueden eliminar dos copias).

TABLA 6:

ID Marcador	crom.	pos.inic.	pos.fin.
M1	cr19	34722418	35643933
M2	cr19	38853838	40749461
M3	cr17	69173224	71304619
M4	cr6	70761833	71144537
M5	cr12	93683	1867988
M6	cr11	64310154	64803976
M7	cr19	57033283	62189738
M8	cr6	39088059	39850364
M9	cr11	64803977	65684917
M10	cr11	61374252	64310153
M11	cr17	51532820	53211048
M12	cr17	43477124	44932837
M13	cr2	147604021	151117679
M14	cr6	123724457	135574976
M15	cr8	6895465	8784654
M16	cr2	159911944	161423883
M17	cr2	200924525	204245414
M18	cr6	36255222	36678343
M19	cr2	205893481	208053624
M20	cr1	109538586	111118652

ID Marcador	crom.	pos.inic.	pos.fin.
DM1	cr9	36056899	36988415
DM2	cr4	105818261	107238628
DM3	cr5	53264432	53790965
DM4	cr16	45791880	46313827
DM5	cr5	50706878	52008065
DM6	cr5	94204208	96112445
DM7	cr5	62942847	67798156
DM9	cr14	51108156	52752331
DM10	cr14	61456273	68632720
DM11	cr9	28057491	28114180
DM12	cr4	43689020	44161565
DM13	cr5	60797829	62942846
DM14	cr3	119993321	121112610
DM15	cr4	46246303	47955581
DM16	cr14	38939630	40021400
DM17	cr4	44161566	44606114
DM18	cr2	213677020	214308243
DM19	cr14	43899026	46591909
DM20	cr14	27646449	28630571
DM21	cr3	97988751	98257089
DM22	cr14	55249852	60045332
DM23	cr14	48734855	51108156
DM24	cr4	81371219	83187388
DM25	cr10	51929419	54199330
DM26	cr5	55221121	58648144
DM27	cr5	67798156	68516077

5 A diferencia de los predictores previamente identificados (firmas de expresión), los biomarcadores representan ganancias y pérdidas de ADN (eventos estables medibles por FISH). Las sondas FISH pueden usarse para permitir la validación/uso de los marcadores, y los marcadores son candidatos fuertes para su uso como biomarcadores de estratificación en ensayos clínicos. Se pueden usar, por ejemplo, para definir subgrupos moleculares de enfermedades favorables y desfavorables. Ningún ensayo de diagnóstico clínico actual *in vitro* proporciona esta capacidad. Por lo tanto, los ensayos FISH con los marcadores enumerados realizados en especímenes de biopsias de CPCNP en estadio temprano o tumores resecados parecen ser valiosos en las decisiones relacionadas con la terapia adyuvante.

10 Estos datos indican que el uso de la evaluación del número de copias genómicas de los marcadores genéticos medidos por FISH, y con el uso de un clasificador apropiado, tiene una importancia pronóstica en el CPCNP en estadio temprano. El clasificador fue capaz de producir una clasificación estadísticamente significativa de los pacientes que habían sido tratados con cirugía sin quimioterapia neoadyuvante o de seguimiento en categorías de recurrencia favorables y desfavorables. Ningún ensayo de diagnóstico clínico actual *in vitro* proporciona esta capacidad. Por lo tanto, los ensayos FISH con los marcadores enumerados realizados en especímenes de biopsias de CPCNP en estadio temprano o tumores resecados parecen ser valiosos en las decisiones relacionadas con la terapia adyuvante.

**Ejemplo 2: Validación de marcadores de pronóstico utilizando un conjunto de muestras de Corea**

20 Para validar cuarenta y seis (46) de los biomarcadores que se correlacionaron con el resultado clínico de pacientes con CPCNP en estadio bajo, se recolectó un conjunto adicional de tejidos tumorales de CPCNP en estadio bajo del

Samsung Cancer Center en Corea, junto con la información de resultados clínicos asociada.

Todas las muestras se disecaron cuidadosamente para maximizar la razón tumor/tejido normal y verificar el tipo histopatológico y la estadio. Solo se analizaron muestras de pacientes con muestras en estadio I y II. Todos estos fueron de pacientes tratados con resección quirúrgica sin ningún seguimiento ni quimioterapia neoadyuvante. La información clínica recopilada para cada paciente incluye edad, sexo, estadio clínico, estadio patológico, ubicación, histología, diferenciación, tabaquismo, estado de quimioterapia, estado de radiación, estado de recurrencia, fecha de recurrencia, ubicación de recurrencia, estado de metástasis cerebral, tiempo hasta la recurrencia, fecha del último seguimiento, estado en el último seguimiento, vivo/muerto, supervivencia general y causa de muerte. Tiempo de recurrencia (TDR) y la supervivencia global (SG) se eligieron como los parámetros de resultado. Otros parámetros clínicos (estado del nodo, estadio, etc.) se consideraron variables de confusión. Los tiempos hasta a la recurrencia del cáncer de pulmón y los tiempos de supervivencia generales se obtuvieron de las historias clínicas de los pacientes. Las Tablas 7 y 8 proporcionan las cifras de Supervivencia Global y Tiempo Total de recurrencia, respectivamente, para la cohorte de pacientes estudiada.

TABLA 7:

SG			
Estadio	mueartos	Vivos (censurado)	total
1a	0	10	10
1b	22	33	55
2a	0	0	0
2b	6	2	8
<b>Total</b>	<b>28</b>	<b>45</b>	<b>73</b>

TABLA 8:

TDR			
Estadio	Con Recurrencia	Sin Recurrencia (censurado)	total
1a	0	10	10
1b	24	31	55
2a	0	0	0
2b	6	2	8
<b>total</b>	<b>30</b>	<b>43</b>	<b>73</b>

Las muestras se procesaron, el ADN se extrajo, se amplificó y se hibridó a matrices Affymetrix SNP 6.0 (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA) que contienen más de 906.600 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y más de 946,000 sondas para la detección de la variación del número de copias con una distancia intermarcador mediana por encima de 1.8 millones de SNP y marcadores de números de copias combinados de menos de 700 bases. Las micromatrices se procesaron de acuerdo con las recomendaciones del fabricante (Affymetrix). El número de copias de estos tumores se calculó comparando un conjunto HapMap de 270 controles normales. El número de copia se segmentó utilizando el soporte lógico Partek 6.09.0310.

El número de copias promedio del conjunto de validación mostró un patrón similar al del conjunto de datos de entrenamiento anterior, pero con una densidad mucho más alta. Para comparar el patrón de número de copias promedio entre el conjunto de datos de entrenamiento y de validación, se promediaron los números de copias de la transformación log de cada marcador en todas las muestras en los conjuntos de entrenamiento y prueba, donde 0 representaba las dos copias normales. Se mostró que la ganancia o pérdida promedio de los números de copias, respectivamente, era compatible con el conjunto de datos de entrenamiento anterior.

Los datos de validación presentados en este ejemplo se basan en dieciocho (18) veces la cobertura de los SNP y los marcadores CNV en comparación con los datos de micromatrices 100K generados y utilizados para identificar los marcadores de diagnóstico, y por lo tanto, se podrían identificar eventos de cambio de número de copias a pequeña escala. Por lo tanto, en lugar de calcular el número de copias de cada biomarcador, se calculó el número de copias de cada gen dentro de estos biomarcadores, y a continuación se correlacionó con la Supervivencia Global o el Tiempo de Recurrencia de los pacientes.

5 Se validaron sesenta y un (61) genes en total, en seis (6) marcadores diferentes fueron validados con el criterio del valor p mediante la prueba de rangos logarítmicos por debajo de 0,05. Los genes se enumeran en la **Tabla 9** con valores p significativos resaltados mediante sombreado de color gris. Las Figuras 62-162 son diagramas de Kaplan-Meier que muestran la supervivencia general (SG) o el tiempo de recurrencia (TDR) en días para la cohorte de 73  
10 pacientes, clasificada por la presencia o ausencia de una ganancia de número de copias en el gen concreto como se indica en cada parcela. Al igual que con las parcelas de Kaplan-Meier de las Figuras 1-60, el eje x representa el tiempo en días, y el eje y la probabilidad de supervivencia del paciente (para SG), o de que el paciente esté libre de recurrencia de la enfermedad (para TTR). Siempre que se producía un evento relevante (ya sea muerte para SG o recurrencia de enfermedad para TTR), la curva disminuía. Cuando un paciente se perdió para realizar el seguimiento sin que se produjera un evento relevante, se hizo una marca en las líneas horizontales, indicando el último tiempo libre de evento. Los valores de P se obtuvieron comparando la disminución en la población de pacientes con y sin los biomarcadores.

15 El número de marcadores finalmente validado como se describe es relativamente pequeño, lo que puede atribuirse en parte al hecho de que las dos poblaciones de pacientes son de diferentes grupos étnicos. Se recolectaron grandes muestreos previos en Chicago, Illinois, Estados Unidos, y se incluyeron una mezcla de pacientes asiáticos, caucásicos, africanos e hispanos, mientras que las muestras de validación fueron recolectadas en Corea de una población asiática homogénea. Además, los dos conjuntos de muestras fueron procesados en diferentes lugares, Abbott Park para el primer conjunto de muestras y el Samsung Cancer Center para el segundo conjunto de  
20 muestras. Aunque el procesamiento de las muestras en ambos lugares siguió el mismo protocolo sugerido, no puede ser totalmente descartado el potencial sesgo de los sistemas. Además, los dos conjuntos de muestras se analizaron utilizando diferentes versiones de matrices de SNP Affymetrix, entre los cuales la densidad difería en un factor de dieciocho (18). Las sondas adicionales incluidas en la nueva matriz pueden revelar eventos de variación del número de copias más detallados que no se podían observar utilizando la versión anterior de matrices SNP.  
25

**Tabla 9:** Genes validados dentro de los biomarcadores identificados que se correlacionan con el resultado clínico de pacientes con NSCL

Símbolo Gen	Cromosoma	Tipo	ID Marcador	Evento	Normal	PValITTR	PValSG
C11orf20	cr11	Amp	Marcador 10	6	67	0,0024	0,0477
ESRRA	cr11	Amp	Marcador 10	6	67	0,0024	0,0477
HSPC152	cr11	Amp	Marcador 10	6	67	0,0024	0,0477
KCNK4	cr11	Amp	Marcador 10	6	67	0,0024	0,0477
PRDX5	cr11	Amp	Marcador 10	6	67	0,0024	0,0477
GPR137	cr11	Amp	Marcador 10	5	68	0,0132	0,1138
BAD	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
DNAJC4	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
FKBP2	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
NUDT22	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
PLCB3	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
PPP1R14B	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
TRPT1	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
VEGFB	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,0232	0,0278
FLRT1	cr11	Amp	Marcador 10	4	69	0,1288	0,0069
FADS2	cr11	Amp	Marcador 10	3	70	0,4208	0,0482
FADS3	cr11	Amp	Marcador 10	3	70	0,4208	0,0482
RAB3IL1	cr11	Amp	Marcador 10	3	70	0,4208	0,0482
AKAP1	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
ANKFN1	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
C17orf67	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
COIL	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
DGKE	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
MSI2	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
MTVR2	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
NOG	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
RNF126P1	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
SCPEP1	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
TRIM25	cr17	Amp	Marcador 11	3	70	0,0370	0,3782
MYO15B	cr17	Amp	Marcador 3	4	69	0,0312	0,1535
SLC16A5	cr17	Amp	Marcador 3	4	69	0,0342	0,1126
PACS1	cr11	Amp	Marcador 9	2	71	0,0015	0,0004
DKFZp761E198	cr11	Amp	Marcador 9	4	69	0,0189	0,0136
KAT5	cr11	Amp	Marcador 9	4	69	0,0189	0,0136
LTBP3	cr11	Amp	Marcador 9	4	69	0,0189	0,0136
MALAT1	cr11	Amp	Marcador 9	4	69	0,0189	0,0136
RELA	cr11	Amp	Marcador 9	4	69	0,0189	0,0136
RNASEH2C	cr11	Amp	Marcador 9	4	69	0,0189	0,0136
SCYL1	cr11	Amp	Marcador 9	4	69	0,0189	0,0136
EHBP1L1	cr11	Amp	Marcador 9	5	68	0,0224	0,0004
FAM89B	cr11	Amp	Marcador 9	5	68	0,0224	0,0004
KCNK7	cr11	Amp	Marcador 9	5	68	0,0224	0,0004

MAP3K11	cr11	Amp	Marcador 9	5	68	0,0224	0,0004
PCNXL3	cr11	Amp	Marcador 9	5	68	0,0224	0,0004
SIPA1	cr11	Amp	Marcador 9	5	68	0,0224	0,0004
SSSCA1	cr11	Amp	Marcador 9	5	68	0,0224	0,0004
CCNB1	cr5	Del	MarcadorDel 27	19	54	0,3161	0,0495
SLC30A5	cr5	Del	MarcadorDel 27	19	54	0,3161	0,0495
ARSK	cr5	Del	MarcadorDel 6	9	64	0,0033	0,0135
FAM81B	cr5	Del	MarcadorDel 6	9	64	0,0033	0,0135
GPR150	cr5	Del	MarcadorDel 6	9	64	0,0033	0,0135
MCTP1	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0114	0,0051
C5orf27	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0122	0,0406
CAST	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0122	0,0406
GLRX	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0122	0,0406
PCSK1	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0122	0,0406
RFESD	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0122	0,0406
RHOBTB3	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0122	0,0406
SPATA9	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0122	0,0406
TTC37	cr5	Del	MarcadorDel 6	10	63	0,0193	0,0491
ELL2	cr5	Del	MarcadorDel 6	11	62	0,0467	0,1066

**Ejemplo 3: Sondas FISH para regiones cromosómicas asociadas a un mayor riesgo de mal pronóstico de enfermedad en CPCNP**

5 Después de la identificación y validación de los biomarcadores como se describe en los Ejemplos 1 y 2 anteriores, las sondas FISH para las regiones cromosómicas identificadas, es decir, 1p, 2q, 3q, 3q, 4p, 4q, 5q, 6p, 6q, 8p, 9p, 10q, 11q, 12p, 14q, 16q, 17q y 19q, se prepararon en Abbott Molecular utilizando técnicas convencionales, dirigiéndose cada sonda a una región o subregión cromosómica como se identifica en la presente memoria. La Tabla 10 enumera las regiones cromosómicas diana por cromosoma, posiciones de inicio y final, bandas de inicio y final y tipo de marcador (Amp = ganancia, Del = pérdida). Las Figuras 1-6 son mapas cromosómicos de sondas FISH seleccionadas. La Figura 1 muestra el mapeo de una sonda FISH para el "marcador 1" en Cr19, en 19q12. La Figura 2 muestra el mapeo de una sonda FISH para el "marcador 2" en Cr19, en 19q13.11-q13.12. La Figura 3 mapea las dos sondas mostradas en las Figuras 1 y 2 juntas, en Cr19, en 19q12-13.12. La Figura 4 muestra el mapeo de dos contiguos de FISH para el "marcador 5" en Cr12, en 12p13.33. La Figura 5 muestra el mapeo de una sonda FISH para el "marcador 6" (que incluye MEN1) en Cr11, en 11q12.2-q13.1. La Figura 6 muestra el mapeo de una sonda FISH para el "marcador 4" en Cr6, en 6q13. También se generaron sondas FISH para todos los marcadores de amplificación 1-20 y marcadores de delección ("MarcadoresDel") 1-26.

20 **Tabla 10: Dianas de la sonda FISH**

cr	pos.inicio	pos.final	Banda Inicio	Banda Final	Tipo	ID Marcador
cr1	109538586	111118652	p13.3	p13.3	Amp	Marcador20
cr2	147604021	151117679	q22.3	q23.3	Amp	Marcador13
cr2	159911944	161423883	q24.2	q24.2	Amp	Marcador16
cr2	200924525	204245414	q33.1	q33.2	Amp	Marcador17
cr2	205893481	208053624	q33.3	q33.3	Amp	Marcador19
cr2	213677020	214308243	q34	q34	Del	MarcadorDel18
cr3	97988751	98257089	q11.2	q11.2	Del	MarcadorDel21
cr3	119993321	121112610	q13.32	q13.33	Del	MarcadorDel14
cr4	43689020	44161565	p13	p13	Del	MarcadorDel12
cr4	44161566	44606114	p13	p13	Del	MarcadorDel17
cr4	46246303	47955581	p12	p12	Del	MarcadorDel15
cr4	81371219	83187388	q21.21	q21.22	Del	MarcadorDel24

ES 2 658 891 T3

cr	pos.inicio	pos.final	Banda Inicio	Banda Final	Tipo	ID Marcador
cr4	105818261	107238628	q24	q24	Del	MarcadorDel2
cr5	50706878	52008065	q11.2	q11.2	Del	MarcadorDel5
cr5	53264432	53790965	q11.2	q11.2	Del	MarcadorDel3
cr5	55221121	58648144	q11.2	q11.2	Del	MarcadorDel26
cr5	60797829	62942846	q12.1	q12.1	Del	MarcadorDel13
cr5	62942847	67798156	q12.1	q13.1	Del	MarcadorDel7
cr5	67798156	68516077	q13.1	q13.2	Del	MarcadorDel27
cr5	94204208	96112445	q15	q15	Del	MarcadorDel6
cr6	36255222	36678343	p21.31	p21.31	Amp	Marcador18
cr6	39088059	39850364	p21.2	p21.2	Amp	Marcador8
cr6	70761833	71144537	q13	q13	Amp	Marcador4
cr6	123724457	135574976	q22.31	q23.3	Amp	Marcador14
cr8	6895465	8784654	p23.1	p23.1	Amp	Marcador15
cr9	28057491	28114180	p35.3	p35.3	Del	MarcadorDel11
cr9	36056899	36988415	p13.3	p13.2	Del	MarcadorDel1
cr10	51929419	54199330	q11.23	q21.1	Del	MarcadorDel25
cr11	61374252	64310153	q12.2	q13.1	Amp	Marcador10
cr11	64310154	64803976	q13.1	q13.1	Amp	Marcador6
cr11	64803977	65684917	q13.1	q13.1	Amp	Marcador9
cr12	93683	1867988	p13.33	p13.33	Amp	Marcador5
cr14	27646449	28630571	q12	q12	Del	MarcadorDel20
cr14	38939630	40021400	q21.1	q21.1	Del	MarcadorDel16
cr14	43899026	46591909	q21.3	q21.3	Del	MarcadorDel19
cr14	48734855	51108156	q22.1	q22.1	Del	MarcadorDel23
cr14	51108156	52752331	q22.1	q22.2	Del	MarcadorDel9
cr14	55249852	60045332	q22.3	q23.1	Del	MarcadorDel22
cr14	61456273	68632720	q23.2	q24.1	Del	MarcadorDel10
cr16	45791880	46313827	q12.1	q12.1	Del	MarcadorDel4
cr17	43477124	44932837	q21.32	q21.33	Amp	Marcador12
cr17	51532820	53211048	q22	q22	Amp	Marcador11
cr17	69173224	71304619	q25.1	q25.1	Amp	Marcador3
<b>cr19</b>	<b>34722418</b>	<b>35643933</b>	q12	q12	<b>Amp</b>	<b>Marcador1</b>
cr19	38853838	40749461	q13.11	q13.12	Amp	Marcador2
cr19	57033283	62189738	q13.33	q13.43	Amp	Marcador7

Debe entenderse que la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el pronóstico de enfermedad en un paciente que está siendo tratado de cáncer de pulmón, a partir de una muestra biológica del paciente, comprendiendo el método:

5 poner en contacto la muestra con dos o más sondas, cada sonda dirigida a una subregión cromosómica diferente, en donde las subregiones cromosómicas incluyen 1p13.3 y al menos una subregión cromosómica seleccionada del grupo que consiste en: 19q12, 19q13.11-13.12, 17q25.1, 6q13, 12p13.3, 11q13.1, 19q13.33-13.43, 6p21.2, 11q12.2-13.1, 17q22, 17q21.32-21.33, 2q22.3-2q23.3, 6q22.31-23.3, 8p23.1, 10 2q24.2, 2q33.1-2q33.2, 6p21.31, 2q33.3, 9p13.2, 4q24, 5q11.2, 16q12.1, 5q11.2, 5q15, 5q12.1-13.1, 14q22.1-23.1, 14q23.2-24.1, 9p35.3, 4p13, 5q12.1, 3q13.3, 4p12, 14q21.1, 4p13, 2q34, 14q21.3, 14q12, 3q11.2, 14q22.3-23.1, 14q22.1, 4q21.21-4q22, 10q11.23-21.1, 5q11.2, and 5q13.1-13.2;

15 incubar las dos o más sondas con la muestra en condiciones en las que cada sonda se une selectivamente con una secuencia de polinucleótidos en su cromosoma o región cromosómica dianas para formar un complejo de hibridación estable; y

20 detectar la hibridación de las dos o más sondas, en donde un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia o pérdida en una región cromosómica elegida como diana por las sondas es indicativo de un aumento de riesgo de mal pronóstico de enfermedad cuando se compara con una medida de referencia de pronóstico de enfermedad en pacientes que no tienen ganancia o pérdida en las dos o más regiones cromosómicas elegidas como diana por las dos o más sondas,

25 en donde la muestra biológica comprende una muestra tumoral, en donde el cáncer es cáncer de pulmón de células no pequeñas en estadio temprano, y en donde el paciente ha sido tratado con resección quirúrgica sin ningún seguimiento o quimioterapia neoadyuvante.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos tres sondas, cada sonda dirigida a una subregión cromosómica diferente, en donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia o pérdida en una o más de las subregiones cromosómicas es indicativo del mal pronóstico de enfermedad en el paciente.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra se pone en contacto con una combinación de al menos cuatro sondas, cada sonda dirigida a una subregión cromosómica diferente, en donde un patrón de hibridación que muestra una ganancia o pérdida en una o más de estas subregiones cromosómicas es indicativo del mal pronóstico de enfermedad en el paciente.

4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la combinación de la sonda comprende

- (i) diez sondas o menos; o
- (ii) ocho sondas o menos; o
- (iii) cuatro sondas.

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el método se lleva a cabo

- (i) mediante hibridación genómica comparativa en matrices (aCGH) a sondas inmovilizadas en un sustrato; o
- (ii) mediante hibridación fluorescente in situ (FISH), y cada sonda en la combinación de sondas se marca con un fluoróforo diferente.

6. El método de la reivindicación 1, en donde la al menos una subregión cromosómica seleccionada además de 1p13.3 se selecciona del grupo que consiste en 11q13.1, 19q12, 19q13.11-13.12, 17q25.1, 6q13, 12p13.3, 19q13.33-13.43, 6p21.2, 11q12.2-13.1, 17q22, 17q21.32-21.33, 2q22.3-2q23.3, 6q22.31-23.3, 8p23.1, 2q24.2, 2q33.1-2q33.2, 6p21.31, y 2q33.3, y en donde un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia en una región cromosómica elegida como diana por las sondas es indicativo de un mayor riesgo de mal pronóstico de enfermedad en comparación con una medida de referencia de evolución de la enfermedad en pacientes sin ganancia en las dos o más regiones cromosómicas elegidas como diana por las dos o más sondas.

7. El método de la reivindicación 1, en donde la muestra se pone en contacto con dos o más sondas, dirigiéndose cada sonda a una ubicación cromosómica diferente, en donde una sonda se dirige a Cr 1, 109.5-111.1 Mb y la al menos una ubicación cromosómica elegida como diana además de Cr 1, 109.5-111.1 Mb se selecciona del grupo que consiste en Cr 19, 34,7 Mb-35,6 Mb; Cr 19, 38,9-40,7 Mb; Cr 17, 69,2-71,3 Mb; Cr 6, 70,8-71,1 Mb; Cr 12, 93,7 kb-1,9Mb; Cr 11, 64,3-64,8 Mb; Cr 19, 57,0-62,2 Mb; Cr 6, 39,1-39,9 Mb; Cr 11, 64,8-65,7Mb; Cr 11, 61,4-64,3 Mb; Cr 17, 51,5-53,2 Mb; Cr 17, 43,5-44,9 Mb; Cr 2, 147,6-151,1 Mb; Cr 6, 123,7-135,6 Mb; Cr 8, 6,9-8,8 Mb; Cr 2, 159,9-161,4 Mb; Cr 2, 200,9-204,2 Mb; Cr 6, 36,3-36,7 Mb; Cr 2, 205,9-208,1 Mb; Cr 9, 36,1-37,0 Mb; Cr 4, 105,8-107,2 Mb; Cr 5, 53,3-53,8 Mb; Cr 16, 45,8-46,3 Mb; Cr 5, 50,7-52,0 Mb; Cr 5, 94,2-96,1 Mb; Cr 5, 62,9-67,8 Mb; Cr 5 94,2-

96,1; Cr 14, 51,1-52,8 Mb; Cr 14, 61,5-68,6 Mb; Cr 9, 28,1 Mb; Cr 4, 43,7-44,2 Mb; Cr 5, 60,8-62,9 Mb; Cr 3, 120,0-121,1 Mb; Cr 4, 46,2-48,0 Mb; Cr 14, 38,9-40,0 Mb; Cr 4, 44,2-44,6 Mb; Cr 2, 213,7-214,3 Mb; Cr 14, 43,9-46,6 Mb; Cr 14, 27,6-28,6 Mb; Cr 3, 98,0-98,3 Mb; Cr 14, 55,2-60,0 Mb; Cr 14, 48,7-51,1 Mb; Cr 4, 81,4-83,2 Mb; Cr 10, 51,9-54,2 Mb; Cr 5, 55,2-58,6 Mb; and Cr 5, 67,8-68,5 Mb.

5

8. El método de la reivindicación 7, en donde se utilizan sondas para todas las ubicaciones cromosómicas.

9. El método de la reivindicación 8, en donde un patrón de hibridación que muestra al menos una ganancia en una región cromosómica elegida como diana por las sondas que se dirigen a las ubicaciones cromosómicas Cr 1, 109,5-111,1 Mb, Cr 19, 34,7 Mb-35,6 Mb; Cr 19, 38,9-40,7 Mb; Cr 17, 69,2-71,3 Mb; Cr 6, 70,8-71,1 Mb; Cr 12, 93,7 kb-1,9Mb; Cr 11, 64,3-64,8 Mb; Cr 19, 57,0-62,2 Mb; Cr 6, 39,1-39,9 Mb; Cr 11, 64,8-65,7 Mb; Cr 11, 61,4-64,3 Mb; Cr 17, 51,5-53,2 Mb; Cr 17, 43,5-44,9 Mb; Cr 2, 147,6-151,1 Mb; Cr 6, 123,7-135,6 Mb; Cr 8, 6,9-8,8 Mb; Cr 2, 159,9-161,4 Mb; Cr 2, 200,9-204,2 Mb; Cr 6, 36,3-36,7 Mb; y Cr 2, 205,9-208,1 Mb es indicativo de un mayor riesgo de mal pronóstico de enfermedad en comparación con una medida de referencia del pronóstico de enfermedad en pacientes que no tienen ganancia en la región cromosómica elegida como diana de las sondas que se dirigen a las ubicaciones cromosómicas Cr 1, 109,5-111,1 Mb, Cr 19, 34,7 Mb-35,6 Mb; Cr 19, 38,9-40,7 Mb; Cr 17, 69,2-71,3 Mb; Cr 6, 70,8-71,1 Mb; Cr 12, 93,7 kb-1,9Mb; Cr 11, 64,3-64,8 Mb; Cr 19, 57,0-62,2 Mb; Cr 6, 39,1-39,9 Mb; Cr 11, 64,8-65,7 Mb; Cr 11,61,4-64,3 Mb; Cr 17, 51,5-53,2 Mb; Cr 17, 43,5-44,9 Mb; Cr 2, 147,6-151,1 Mb; Cr 6, 123,7-135,6 Mb; Cr 8, 6,9-8,8 Mb; Cr 2, 159,9-161,4 Mb; Cr 2, 200,9-204,2 Mb; Cr 6, 36,3-36,7 Mb; y Cr 2, 205,9-208,1 Mb.

10

15

20

10. El método de la reivindicación 8, en donde un patrón de hibridación que muestra al menos una pérdida en una región cromosómica elegida como diana por las sondas que se dirigen a las ubicaciones cromosómicas Cr 9, 36,1-37,0 Mb; Cr 4, 105,8-107,2 Mb; Cr 5, 53,3-53,8 Mb; Cr 16, 45,8-46,3 Mb; Cr 5, 50,7-52,0 Mb; Cr 5, 94,2-96,1 Mb; Cr 5, 62,9-67,8 Mb; Cr 5 94,2-96,1; Cr 14, 51,1-52,8 Mb; Cr 14, 61,5-68,6 Mb; Cr 9, 28,1 Mb; Cr 4, 43,7-44,2 Mb; Cr 5, 60,8-62,9 Mb; Cr 3, 120,0-121,1 Mb; Cr 4, 46,2-48,0 Mb; Cr 14, 38,9-40,0 Mb; Cr 4, 44,2-44,6 Mb; Cr 2, 213,7-214,3 Mb; Cr 14, 43,9-46,6 Mb; Cr 14, 27,6-28,6 Mb; Cr 3, 98,0-98,3 Mb; Cr 14, 55,2-60,0 Mb; Cr 14, 48,7-51,1 Mb; Cr 4, 81,4-83,2 Mb; Cr 10, 51,9-54,2 Mb; Cr 5, 55,2-58,6 Mb; y Cr 5, 67,8-68,5 Mb es indicativo de un mayor riesgo de mal pronóstico de la enfermedad en comparación con una medida inicial de la evolución de la enfermedad en pacientes que no tienen pérdida en las regiones cromosómicas elegidas como diana por las sondas que se dirigen a las ubicaciones cromosómicas Cr 9, 36,1-37,0 Mb; Cr 4, 105,8-107,2 Mb; Cr 5, 53,3-53,8 Mb; Cr 16, 45,8-46,3 Mb; Cr 5, 50,7-52,0 Mb; Cr 5, 94,2-96,1 Mb; Cr 5, 62,9-67,8 Mb; Cr 5 94,2-96,1; Cr 14, 51,1-52,8 Mb; Cr 14, 61,5-68,6 Mb; Cr 9, 28,1 Mb; Cr 4, 43,7-44,2 Mb; Cr 5, 60,8-62,9 Mb; Cr 3, 120,0-121,1 Mb; Cr 4, 46,2-48,0 Mb; Cr 14, 38,9-40,0 Mb; Cr 4, 44,2-44,6 Mb; Cr 2, 213,7-214,3 Mb; Cr 14, 43,9-46,5 Mb; Cr 14, 27,6-28,6 Mb; Cr 3, 98,0-98,3 Mb; Cr 14, 55,2-60,0 Mb; Cr 14,48,7-51,1 Mb; Cr 4, 81,4-83,2 Mb; Cr 10, 51,9-54,2 Mb; Cr 5, 55,2-58,6 Mb; y Cr 5, 67,8-68,5 Mb.

25

30

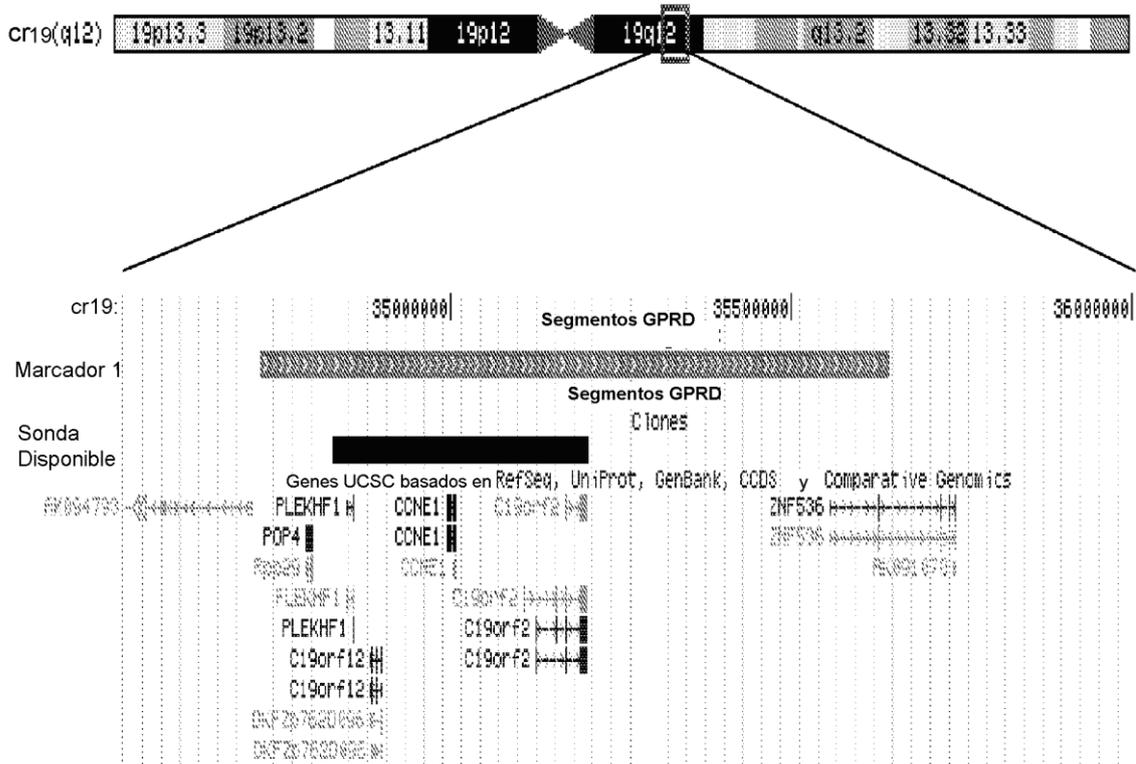
35

11. Una combinación de sondas que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sondas, en donde las sondas se dirigen a 1p13.3 y al menos a una subregión seleccionada del grupo de subregiones expuestas en la reivindicación 1.

40

12. Un kit para predecir el pronóstico de enfermedad en un paciente que está siendo tratado de cáncer de pulmón, a partir de una muestra biológica del paciente, en donde el kit comprende una única combinación de sondas de acuerdo con la reivindicación 11.

Sonda para el Marcador 1



<b>SONDA CCNE1</b>	<b>INICIO 34.827.676</b>
	<b>FIN 35.202904</b>

Fig. 1



Mapa de los Marcadores 1 y 2

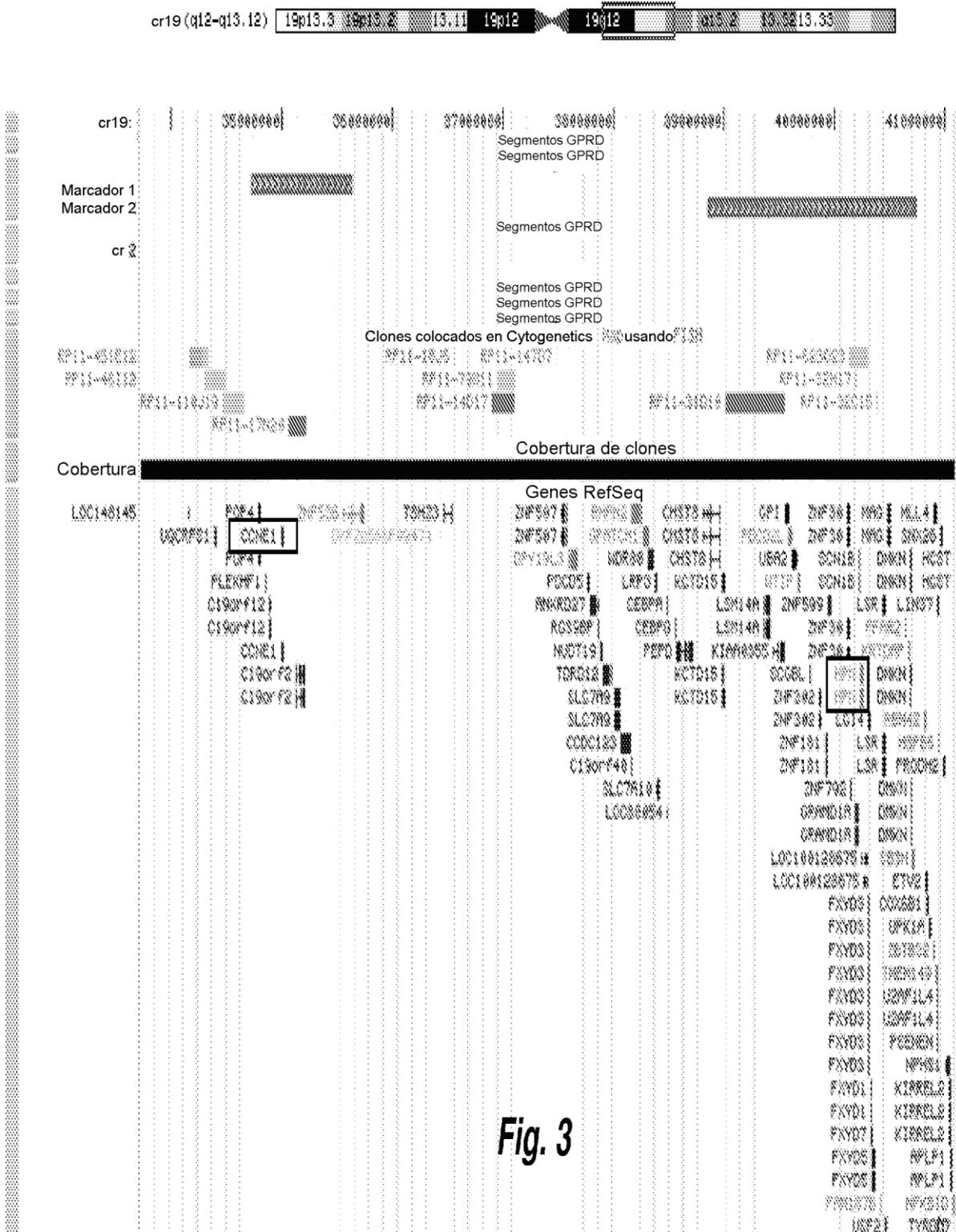
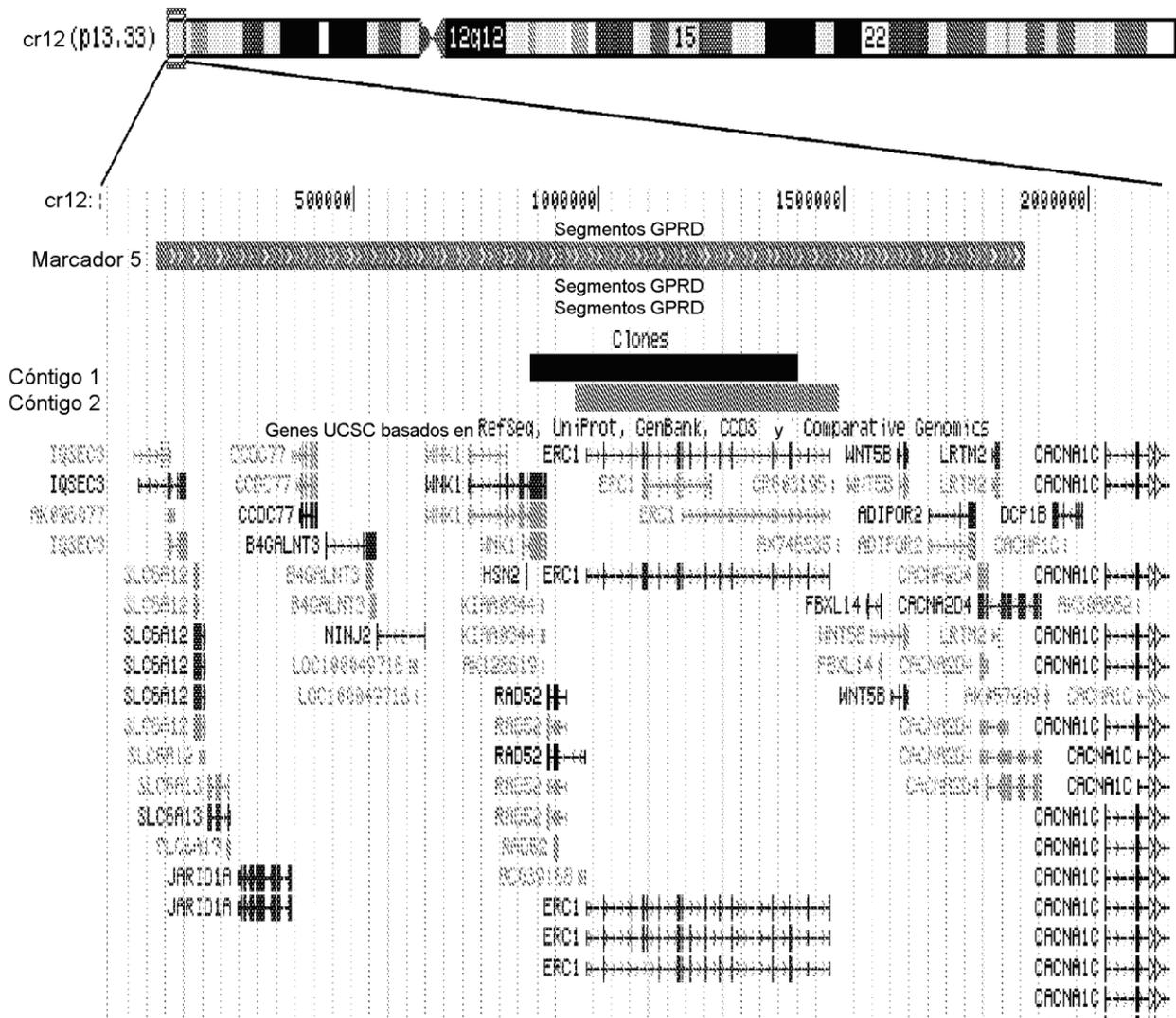


Fig. 3

**Cóntigos del Marcador 5**

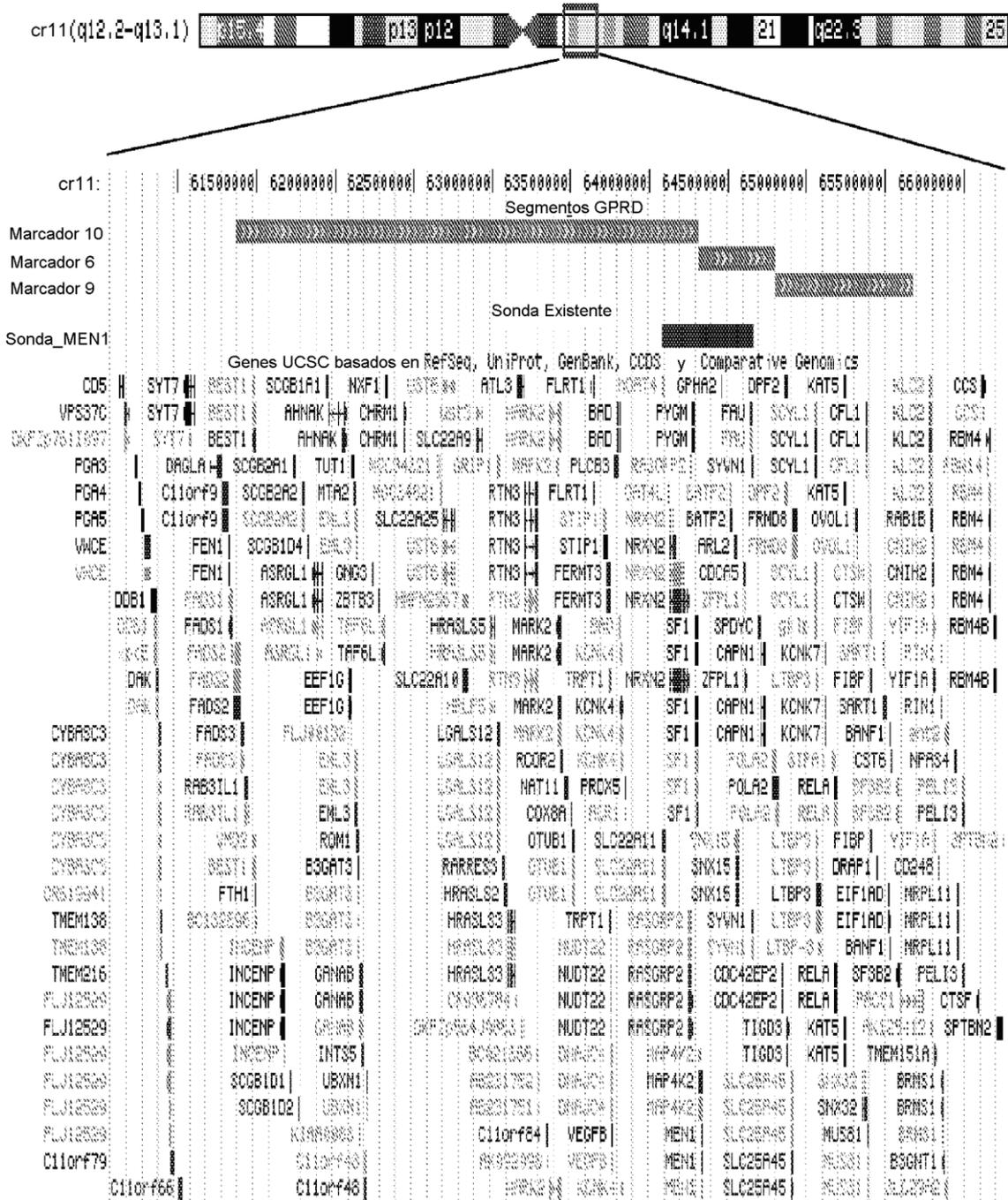


**Sonda Spectrum Green Vysis Telvysion 12p:**  
**Inicio aproximadamente**  
**Fin aproximadamente**

**Cóntigo 1 Inicio 858.584**  
**Fin 1.406.345**  
**Cóntigo 2 Inicio 949.359**  
**Fin 1.488.548**

**Fig. 4**

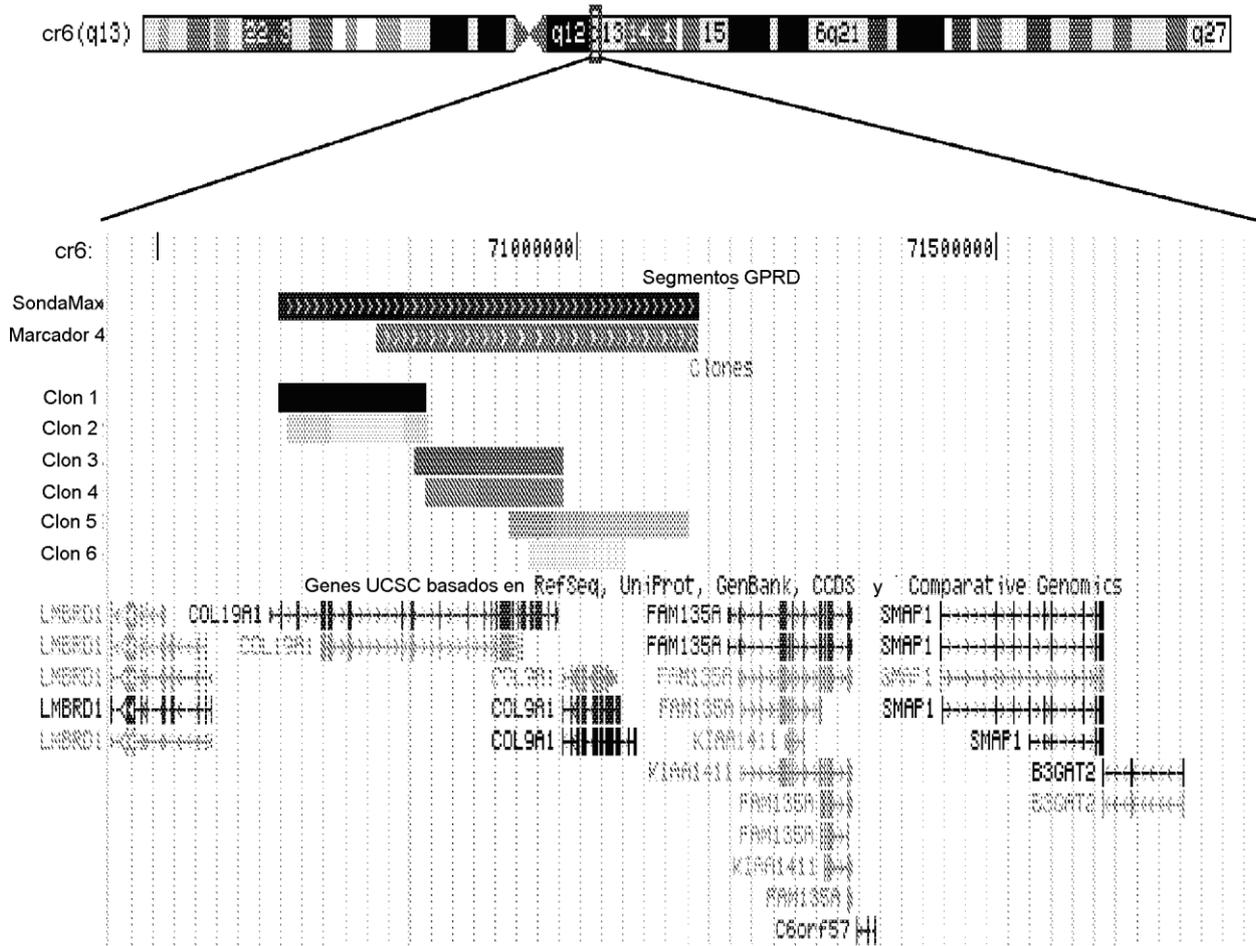
Sonda para el Marcador 6 (MEN1)



Sonda MEN1 Inicio 64.081.119  
Fin 64.669.756

Fig. 5

### Cóntigo del Marcador 4



**Fig. 6**