

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 318**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2011 PCT/US2011/057499**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2013 WO13062515**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2011 E 11874668 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2771692**

54 Título: **Biomarcadores de cáncer de pulmón y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.06.2018**

73 Titular/es:  
**SOMALOGIC, INC. (100.0%)**  
**2945 Wilderness Place**  
**Boulder, CO 80301, US**

72 Inventor/es:  
**RIEL-MEHAN, MICHAEL;**  
**STEWART, ALEX, A.E.;**  
**OSTROFF, RACHEL, M.;**  
**WILLIAMS, STEPHEN, ALARIC y**  
**BRODY, EDWARD, N.**

74 Agente/Representante:  
**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 674 318 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

Biomarcadores de cáncer de pulmón y usos de los mismos

5 **Campo de la invención**

La presente solicitud se refiere en general a la detección de biomarcadores y al diagnóstico de cáncer en un individuo y, más particularmente, cáncer de pulmón, en un individuo.

10 **Antecedentes**

La siguiente descripción proporciona un resumen de información relevante para la presente solicitud y no es una admisión de que cualquier información proporcionada o publicaciones a las que se hace referencia en el presente documento sean técnica anterior de la presente divulgación.

15 Más personas mueren de cáncer de pulmón que de cualquier otro tipo de cáncer. Esto es cierto tanto para hombres como para mujeres. El cáncer de pulmón representa más muertes que el cáncer de mama, cáncer de próstata y cáncer de colon combinados. El cáncer de pulmón representó una estimación de 157.300 muertes, o 28 % de todas las muertes por cáncer en los Estados Unidos en 2010. Se estima que en 2010, se diagnosticará cánceres de pulmón a 116.750 hombres y 105.770 mujeres, y 86.220 hombres y 71.080 mujeres morirán de cánceres de pulmón (Jemal, CA Cancer J Clin 2010;60:277). Entre los hombres en los Estados Unidos, en cáncer de pulmón es el segundo cáncer más común entre hombres blancos, negros, asiáticos/isleños del Pacífico, indios americanos/nativos de Alaska e hispanos. Entre las mujeres en los Estados Unidos, el cáncer de pulmón es el segundo cáncer más común entre mujeres blancas, negras e indias americanas/nativas de Alaska, y el tercer cáncer más común entre mujeres asiáticas/isleños del Pacífico e hispanicas. Para las personas que no dejan de fumar, la probabilidad de muerte por cáncer de pulmón es del 15 % y permanece por encima del 5 % incluso para los que dejan de fumar a una edad de 50-59. El coste anual de cuidados sanitarios del cáncer de pulmón solo en los Estados Unidos es de 95 mil millones de dólares.

30 Noventa y uno por ciento del cáncer de pulmón provocado por tabaquismo es cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), que representa aproximadamente el 85 % de todos los cánceres de pulmón. El 15 % restante de todos los cánceres de pulmón son cánceres de pulmón microcíticos, aunque sí se producen cánceres de pulmón de células mixtas. Debido a que el cáncer de pulmón microcítico es poco habitual y rápidamente letal, la oportunidad para detección temprana es pequeña.

35 Hay tres tipos principales de CPNM: carcinoma de células escamosas, carcinoma macrocítico y adenocarcinoma. El adenocarcinoma es la forma más común de cáncer de pulmón (30 %-65 %) y es el cáncer de pulmón más frecuentemente hallado tanto en fumadores como en no fumadores. El carcinoma de células escamosas representa 25-30 % de todos los cánceres de pulmón y se encuentra en general en un bronquio proximal. El CPNM de estadio temprano tiende a estar localizado y, si se detecta pronto, puede tratarse con frecuencia por cirugía con un resultado favorable y supervivencia mejorada. Otras opciones de tratamiento incluyen radioterapia, terapia farmacológica y una combinación de estos métodos.

45 El CPNM se estadia por el tamaño del tumor y su presencia en otros tejidos incluyendo ganglios linfáticos. En el estadio oculto, pueden encontrarse células cancerosas en muestras de esputo o muestras de lavado y ningún tumor es detectable en los pulmones. En el estadio 0, solamente el revestimiento interno de los pulmones muestra células cancerosas y el tumor no ha crecido a través del revestimiento. En el estadio IA, el cáncer se considera localmente invasivo y ha crecido en profundidad en el tejido pulmonar pero el tumor es de menos de 3 cm de anchura. En este estadio, el tumor no se encuentra en el bronquio principal o los ganglios linfáticos. En el estadio IB, el tumor es de más de 3 cm de anchura o ha crecido en el bronquio o la pleura, pero no ha crecido en los ganglios linfáticos. En el estadio IIA, el tumor es de menos de 7 cm de anchura y puede haber crecido en los ganglios linfáticos. En el estadio IIB, el tumor se ha encontrado en los ganglios linfáticos y es de más de 5 cm de anchura o crecen en el bronquio o la pleura; o el cáncer no está en los ganglios linfáticos pero se encuentra en la pared torácica, el diafragma, la pleura, el bronquio o el tejido que rodea el corazón, o están presentes nódulos tumorales separados en el mismo lóbulo del pulmón. En el estadio IIIA, se encuentran células cancerosas en los ganglios linfáticos cerca del pulmón y los bronquios y en los que están entre los pulmones pero en el lateral del pecho donde se localiza el tumor. Estadio IIIB, se localizan células cancerosas en el lado opuesto del tórax al tumor o en el cuello. Otros órganos cerca de los pulmones también pueden tener células cancerosas y pueden encontrarse múltiples tumores en un lóbulo de los pulmones. En el estadio IV, se encuentran tumores en más de un lóbulo del mismo pulmón o ambos pulmones y se encuentran células cancerosas en otras partes del cuerpo.

65 Los métodos actuales de diagnóstico para cánceres de pulmón incluyen ensayar el esputo con respecto a células cancerosas, radiografía de tórax, evaluación de fibra óptica y biopsia de las vías respiratorias y tomografía computarizada (TC) espiral de dosis baja. La citología de esputo tiene una sensibilidad muy baja. La radiografía de tórax también es relativamente insensible, requiriendo que las lesiones sean de más de 1 cm de tamaño para que sean visibles. La broncoscopia requiere que el tumor sea visible dentro de las vías respiratorias accesibles al

broncoscopio. El método de diagnóstico más ampliamente reconocido es la TC torácica de dosis baja, pero, en común con la radiografía, el uso de TC implica radiación ionizante, que en sí misma puede provocar cáncer. La TC también tiene limitaciones significativas: las exploraciones requieren un alto nivel de habilidad técnica para interpretarlas y muchas de las anomalías observadas no son de hecho cáncer de pulmón y se incurre en costes de cuidados sanitarios sustanciales en el seguimiento de hallazgos de TC. El hallazgo incidental más común es un nódulo pulmonar benigno.

Los nódulos pulmonares son lesiones relativamente redondeadas, o áreas de tejido anómalo, localizadas en el pulmón y su tamaño puede variar. Los nódulos pulmonares pueden ser benignos o cancerosos, pero la mayoría son benignos. Si un nódulo es de menos de 4 mm la prevalencia es de solamente 1,5 %, si es de 4-8 mm la prevalencia es de aproximadamente 6 %, y si es de más de 20 mm la incidencia es de aproximadamente 20 %. Para nódulos de tamaño pequeño y mediano, se recomienda al paciente que se someta a una exploración repetida en un periodo de tres meses a un año. Para muchos nódulos grandes, el paciente recibe una biopsia (que es invasiva y puede conducir a complicaciones) incluso aunque la mayoría de estos son benignos.

Por lo tanto, son necesarios métodos de diagnóstico que puedan reemplazar o complementar la TC para reducir el número de procedimientos quirúrgicos realizados y minimizar el riesgo de complicaciones quirúrgicas. Además, incluso cuando los nódulos pulmonares están ausentes o desconocidos, son necesarios métodos para detectar cáncer de pulmón en sus estadios tempranos para mejorar los resultados de pacientes. Solamente el 16 % de los casos de cáncer de pulmón se diagnostican como cáncer de estadio temprano, localizado, en los que la tasa de supervivencia a los 5 años es del 46 %, en comparación con el 84 % de los diagnosticados en estadio tardío, en los que la tasa de supervivencia a los 5 años es solamente del 13 %. Esto demuestra que basarse en síntomas para el diagnóstico no es útil porque muchos de ellos son comunes con otras enfermedades pulmonares y con frecuencia se presentan solo en los estadios tardíos del cáncer de pulmón. Estos síntomas incluyen una tos persistente, sangre en el esputo, dolor en el tórax y bronquitis o neumonía recurrente.

Cuando existen métodos de diagnóstico temprano en cáncer, los beneficios son aceptados en general por la comunidad médica. Los cánceres que han utilizado ampliamente protocolos de exploración tienen las mayores tasas de supervivencia a los 5 años, tales como cáncer de mama (88 %) y cáncer de colon (65 %) frente a 16 % para cáncer de pulmón. Sin embargo, hasta el 88 % de enfermos de cáncer de pulmón sobreviven diez años o más si el cáncer se diagnostica en el Estadio I mediante exploración. Esto demuestra la clara necesidad de métodos de diagnóstico que puedan detectar de forma fiable CPNM de estadio temprano.

La selección de biomarcadores para una patología específica implica en primer lugar la identificación de marcadores que tienen una diferencia medible y estadísticamente significativa en una población enferma en comparación con una población de control para una aplicación médica específica. Los biomarcadores pueden incluir moléculas secretadas o desprendidas que son análogas al desarrollo o progresión de enfermedad y se difunden fácilmente al torrente sanguíneo desde tejido pulmonar o desde tejidos distantes en respuesta a una lesión. También pueden incluir proteínas realizadas por células en respuesta al tumor. El biomarcador o el conjunto de biomarcadores identificados están en general clínicamente validados o se ha mostrado que son un indicador fiable para el uso pretendido original para el que se seleccionaron. Los biomarcadores pueden incluir moléculas pequeñas, metabolitos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Algunos de los problemas clave que afectan a la identificación de biomarcadores incluyen el sobreajuste de los datos disponibles y sesgo en los datos.

Se ha utilizado diversos métodos en un intento de identificar biomarcadores y diagnosticar la enfermedad. Para marcadores basados en proteínas, estos incluyen electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y métodos de inmunoensayo. Para marcadores de ácido nucleico, estos incluyen perfiles de expresión de ARNm, perfiles de microARN, FISH, análisis en serie de la expresión génica (SAGE) y matrices de expresión génica a gran escala.

La utilidad de electroforesis bidimensional está limitada por la sensibilidad de detección baja; problemas con la solubilidad de proteínas, carga e hidrofobia; reproducibilidad en gel; y la posibilidad de que un único punto represente múltiples proteínas. Para espectrometría de masas, dependiendo del formato utilizado, las limitaciones dependen del procesamiento y la separación de muestras, la sensibilidad a proteínas de baja abundancia, las consideraciones de señal con respecto a ruido, y la incapacidad para identificar inmediatamente la proteína detectada. Las limitaciones en enfoques de inmunoensayo para el descubrimiento de biomarcadores se centran en la incapacidad de ensayos múltiples basados en anticuerpos para medir un gran número de analitos. Se podría simplemente imprimir una matriz de anticuerpos de alta calidad y, sin intercalados, medir los analitos unidos a esos anticuerpos. (Esto sería el equivalente formal al uso de un genoma completo de secuencias de ácido nucleico para medir por hibridación todas las secuencias de ADN o ARN en un organismo o una célula. El experimento de hibridación funciona porque la hibridación puede ser un ensayo riguroso para identidad. Incluso anticuerpos muy buenos no son suficientemente rigurosos para la selección de sus compañeros de unión para actuar en el contexto de sangre o incluso extractos celulares debido a que el conjunto proteico en esas matrices tiene abundancias extremadamente diferentes.) Por lo tanto, se debe usar un enfoque diferente con enfoques basados en inmunoensayo para el descubrimiento de biomarcadores, sería necesario usar ensayos ELISA múltiples (es decir, de tipo sándwich) para obtener suficiente rigurosidad para medir muchos analitos simultáneamente para decidir qué analitos son de hecho biomarcadores. Los inmunoensayos de tipo sándwich no pueden cambiarse de escala a alto

contenido, y por lo tanto el descubrimiento de biomarcadores usando inmunoensayos de tipo sándwich rigurosos no es posible usando ningún formato de matriz convencional. Por último, los reactivos de anticuerpos están sometidos a variabilidad sustancial entre lotes e inestabilidad de reactivos. La presente plataforma para descubrimiento de biomarcadores proteicos supera este problema.

5 Muchos de estos métodos se basan en o requieren algún tipo de fraccionamiento de muestras antes del análisis. Por lo tanto la preparación de muestras requerida para realizar un estudio suficientemente potente diseñado para identificar/descubrir biomarcadores estadísticamente relevantes en una serie de poblaciones de muestras bien definidas es extremadamente difícil, costosa y requiere mucho tiempo. Durante el fraccionamiento, se puede introducir en las diversas muestras una amplia gama de moléculas. Por ejemplo, un marcador potencial podría ser inestable para el proceso, la concentración del marcador podría cambiarse, podría producirse agregación o disgregación inapropiadas, y podría producirse contaminación de muestras involuntaria y de este modo ocultar los cambios sutiles anticipados en enfermedad temprana.

15 Se ha aceptado ampliamente que los métodos de descubrimiento y detección de biomarcadores que usan estas tecnologías tienen graves limitaciones para la identificación de biomarcadores de diagnóstico. Estas limitaciones incluyen una incapacidad para detectar biomarcadores de baja abundancia, una incapacidad para abarcar uniformemente el rango dinámico completo del proteoma, la irreproducibilidad en el procesamiento y fraccionamiento de muestras y la irreproducibilidad general y falta de robustez del método. Además, estos estudios han introducido sesgos en los datos y no han abordado de forma adecuada la complejidad de las poblaciones de muestras, incluyendo controles apropiados, con respecto a la distribución y selección aleatoria requeridas para identificar y validar biomarcadores en una población enferma diana.

25 Aunque se han realizado esfuerzos dirigidos al descubrimiento de biomarcadores nuevos y eficaces durante varias décadas, estos esfuerzos en su mayoría no han tenido éxito. Se han identificado biomarcadores para diversas enfermedades normalmente en laboratorios académicos, habitualmente mediante un descubrimiento accidental mientras se realizaba investigación básica sobre algún proceso de enfermedad. Basándose en el descubrimiento y con cantidades pequeñas de datos clínicos, se han publicado artículos que sugerían la identificación de un nuevo biomarcador. La mayoría de estos biomarcadores propuestos, sin embargo, no se han confirmado como biomarcadores reales o útiles, principalmente porque el número pequeño de muestras clínicas ensayadas proporciona solamente un prueba estadística débil de que se ha descubierto de hecho un biomarcador eficaz. Es decir, la identificación inicial no era rigurosa con respecto a los elementos básicos de la estadística. En cada año de 1994 a 2003, una búsqueda de la bibliografía científica muestra que se publicaron miles de referencias dirigidas a biomarcadores. Durante ese mismo periodo de tiempo, sin embargo, la FDA aprobó para su uso diagnóstico, como máximo, tres nuevos biomarcadores proteicos al año y en varios años no se aprobó ningún biomarcador proteico nuevo.

40 Basándose en el historial de intentos de descubrimiento de biomarcadores fallidos, se han propuesto teorías matemáticas que promueven adicionalmente el entendimiento general de que los biomarcadores de enfermedad son poco habituales y difíciles de encontrar. La investigación de biomarcadores basada en geles bidimensionales o espectrometría de masas apoya estas ideas. Se han identificado muy pocos biomarcadores útiles mediante estos enfoques. Sin embargo, se pasa por alto habitualmente que el gel bidimensional y la espectrometría de masas miden proteínas que están presentes en la sangre a concentraciones de aproximadamente 1 nM y mayores, y que este conjunto de proteínas puede ser el que tenga menor probabilidad de cambiar con la enfermedad. Aparte de la presente plataforma de descubrimiento de biomarcadores, no existen plataformas de descubrimiento de biomarcadores que sean capaces de medir con precisión los niveles de expresión de proteínas a concentraciones mucho menores.

50 Se sabe mucho acerca de las rutas bioquímicas para biología humana compleja. Muchas rutas bioquímicas culminan en o se inician por proteínas secretadas que actúan localmente en la patología, por ejemplo se secretan factores de crecimiento para estimular la replicación de otras células en la patología, y se secretan otros factores para proteger el sistema inmunitario y así sucesivamente. Aunque muchas de estas proteínas secretadas actúan de una manera paracrina, algunas actúan distalmente en el cuerpo. Un experto en la materia con un entendimiento básico de las rutas bioquímicas entendería que deben existir muchas proteínas específicas de patología en sangre a concentraciones por debajo (incluso muy por debajo) de los límites de detección de geles bidimensionales y espectrometría de masas. Lo que debe preceder a la identificación de este número relativamente abundante de biomarcadores de enfermedad es una plataforma proteómica que puede analizar proteínas a concentraciones por debajo de las detectables por geles bidimensionales o espectrometría de masas.

60 El documento US2003/0215895 describe el desarrollo del anticuerpo monoclonal murino DS6. Este anticuerpo reacciona inmunohistoquímicamente con un antígeno, CA6, que se expresa en carcinomas ováricos serosos humanos pero no se expresa en epitelio superficial o mesotelio ovárico normal.

65 En consecuencia, existe la necesidad de biomarcadores, métodos, dispositivos, reactivos, sistemas y kits que permitan (a) explorar a fumadores de alto riesgo con respecto a cáncer de pulmón (b) la diferenciación de nódulos pulmonares benignos de nódulos pulmonares malignos; (c) la detección de biomarcadores de cáncer de pulmón; y

(d) el diagnóstico de cáncer de pulmón.

## Sumario

5 La presente invención se define en su sentido más amplio en las reivindicaciones adjuntas.

La presente divulgación incluye biomarcadores, métodos, reactivos, dispositivos, sistemas y kits para la detección y el diagnóstico de cáncer y, más particularmente, CPNM. Los biomarcadores de la presente divulgación se identificaron usando un ensayo basado en aptámeros múltiple que se describe en detalle en el Ejemplo 1. Usando el método de identificación de biomarcadores basado en aptámeros descrito en el presente documento, la presente divulgación describe un número sorprendentemente grande de biomarcadores de CPNM que son útiles para la detección y el diagnóstico de CPNM así como un gran número de biomarcadores de cáncer que son útiles para la detección y el diagnóstico de cáncer de forma más general. Para identificar estos biomarcadores, se midieron más de 1000 proteínas de cientos de muestras individuales, algunas de las cuales estaban a concentraciones en el intervalo femtomolar bajo. Esto es aproximadamente cuatro órdenes de magnitud menor que los experimentos de descubrimiento de biomarcadores realizados con geles bidimensionales y/o espectrometría de masas.

Aunque determinados biomarcadores de CPNM descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar CPNM, se describen en el presente documento métodos para el agrupamiento de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de CPNM que son útiles como un panel de biomarcadores. Una vez que se ha identificado un biomarcador individual o un subconjunto de biomarcadores, puede conseguirse la detección o el diagnóstico de CPNM en un individuo usando cualquier plataforma o formato de ensayo que sea capaz de medir diferencias en los niveles del biomarcador o los biomarcadores seleccionados en una muestra biológica.

Sin embargo, solamente usando el método de identificación de biomarcadores basado en aptámeros descrito en el presente documento, en donde se exploraron individualmente más de 1000 valores de biomarcadores potenciales separados de un gran número de individuos a los que se había diagnosticado previamente que tenían o no CPNM fue posible identificar los biomarcadores de CPNM desvelados en el presente documento. Este enfoque de descubrimiento está en claro contraste con el descubrimiento de biomarcadores de medio acondicionado o células lisadas ya que consulta un sistema más pertinente para el paciente que no requiere traducción a la patología humana.

Por lo tanto, en un aspecto de la presente divulgación se proporcionan uno o más biomarcadores para su uso solos o en diversas combinaciones para diagnosticar CPNM o permitir el diagnóstico diferencial de CPNM de afecciones benignas tales como las halladas en individuos con nódulos pulmonares indeterminados identificados con una exploración de TC u otro método de captura de imágenes, exploración de fumadores de alto riesgo para CPNM y diagnóstico de un individuo con CPNM. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, que, como se ha indicado anteriormente, se identificaron usando un ensayo basado en aptámeros múltiple, como se describe en general en el Ejemplo 1 y más específicamente en el Ejemplo 2 y 5. Los marcadores proporcionados en la Tabla 1 son útiles en el diagnóstico de CPNM en una población de alto riesgo y para distinguir enfermedades pulmonares benignas en individuos que nódulos pulmonares indeterminados de CPNM.

Aunque determinados biomarcadores de CPNM descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar CPNM, también se describen en el presente documento métodos para el agrupamiento de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de CPNM que son cada uno útiles como un panel de dos o más biomarcadores. Por lo tanto, diversas realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en donde N es al menos dos biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 2-59 biomarcadores.

En otros aspectos más, N se selecciona para que sea cualquier número de 2-5, 2-10, 2-15, 2-20, 2-25, 2-30, 2-35, 2-40, 2-45, 2-50, 2-55 o 2-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 3-25, 3-30, 3-35, 3-40, 3-45, 3-50, 3-55 o 3-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 4-5, 4-10, 4-15, 4-20, 4-25, 4-30, 4-35, 4-40, 4-45, 4-50, 4-55 o 4-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55 o 5-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 6-10, 6-15, 6-20, 6-25, 6-30, 6-35, 6-40, 6-45, 6-50, 6-55 o 6-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 7-10, 7-15, 7-20, 7-25, 7-30, 7-35, 7-40, 7-45, 7-50, 7-55 o 7-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 8-10, 8-15, 8-20, 8-25, 8-30, 8-35, 8-40, 8-45, 8-50, 8-55 o 8-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 9-10, 9-15, 9-20, 9-25, 9-30, 9-35, 9-40, 9-45, 9-50, 9-55 o 9-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 10-15, 10-20, 10-25, 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-55 o 10-59. Se apreciará que N puede seleccionarse para abarcar intervalos similares, pero de mayor orden.

En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar CPNM en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos un valor de biomarcador correspondiente a al menos un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, en donde el individuo se

clasifica como aquejado de CPNM basándose en al menos un valor de biomarcador.

5 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar CPNM en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde la probabilidad de que el individuo tenga CPNM se determina basándose en los valores de biomarcadores.

10 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar CPNM en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde el individuo se clasifica como aquejado de CPNM basándose en los valores de biomarcadores y en donde  $N = 2-10$ .

15 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar CPNM en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde la probabilidad de que el individuo tenga CPNM se determina basándose en los valores de biomarcadores y en donde  $N = 2-10$ .

20 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar que un individuo no tiene CPNM, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos un valor de biomarcador correspondiente a al menos un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde el individuo se clasifica como no aquejado de CPNM basándose en al menos un valor de biomarcador.

25 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar que un individuo no tiene CPNM, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde el individuo se clasifica como no aquejado de CPNM basándose en los valores de biomarcadores y en donde  $N = 2-10$ .

30 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar CPNM, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene CPNM y en donde  $N = 3-10$ .

35 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar CPNM, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de biomarcadores seleccionado del grupo de paneles expuesto en las tablas 2 -11, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene CPNM.

40 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una ausencia de CPNM, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica una ausencia de CPNM en el individuo y en donde  $N = 3-10$ .

45 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una ausencia de CPNM, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica una ausencia de CPNM en el individuo y en donde  $N = 3-10$ .

50 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una ausencia de CPNM, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de biomarcadores seleccionado del grupo de paneles proporcionado en las tablas 2 -11, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica una ausencia de CPNM en el individuo.

55 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar CPNM en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde el individuo se clasifica como aquejado de CPNM basándose en una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en donde  $N = 2-10$ .

60 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una ausencia de CPNM en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en donde dicho individuo se clasifica como no aquejado de CPNM basándose en una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en donde  $N = 2-10$ .

65

5 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para indicar una probabilidad de CPNM. El método comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores, en donde N es como se ha definido anteriormente, seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1; realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de los valores de biomarcadores; e indicar una probabilidad de que el individuo tenga CPNM basándose en una pluralidad de clasificaciones.

10 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para clasificar a un individuo como aquejado o no aquejado de CPNM. El método comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1; realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de los valores de biomarcadores; e indicar si el individuo tiene CPNM basándose en una pluralidad de clasificaciones.

15 En otro aspecto, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de CPNM. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores, en donde N es como se ha  
20 definido anteriormente, en la muestra biológica seleccionada del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1; y código que ejecuta un método de clasificación que indica una probabilidad de que el individuo tenga CPNM en función de los valores de biomarcadores.

25 En otro aspecto, se proporciona un producto de programa informático para indicar un estado de CPNM de un individuo. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores en la muestra biológica seleccionados del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1; y código que ejecuta un  
30 método de clasificación que indica un estado de CPNM del individuo en función de los valores de biomarcadores.

35 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para indicar una probabilidad de CPNM. El método comprende recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1; realizar con el ordenador una clasificación del valor de biomarcador; e indicar una probabilidad de que el individuo tenga CPNM basándose en la clasificación.

40 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para clasificar a un individuo como aquejado o no aquejado de CPNM. El método comprende recuperar de un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1; realizar con el ordenador una clasificación del valor de biomarcador; e indicar si el individuo tiene CPNM basándose en la clasificación.

45 En otro aspecto más, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de CPNM. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1; y código que ejecuta un método de clasificación que indica una probabilidad de que el  
50 individuo tenga CPNM en función del valor de biomarcador.

55 En otro aspecto más, se proporciona un producto de programa informático para indicar un estado de CPNM de un individuo. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1; y código que ejecuta un método de clasificación que indica un estado de CPNM del individuo en función del valor de biomarcador.

60 Aunque determinados biomarcadores descritos también son útiles solos para detectar y diagnosticar cáncer general, se describen en el presente documento métodos para el agrupamiento de múltiples subconjuntos de los biomarcadores que son útiles como un panel de biomarcadores para detectar y diagnosticar cáncer en general. Una vez que se ha identificado un biomarcador individual o un subconjunto de biomarcadores, puede conseguirse la detección o el diagnóstico de cáncer en un individuo usando cualquier plataforma o formato de ensayo que sea  
65 capaz de medir diferencias en los niveles del biomarcador o los biomarcadores seleccionados en una muestra biológica.

5 Sin embargo, solamente usando el método de identificación de biomarcadores basado en aptámeros descrito en el presente documento, en donde se exploraron individualmente más de 1000 valores de biomarcadores potenciales separados de un gran número de individuos a los que se había diagnosticado previamente que tenían o no cáncer fue posible identificar los biomarcadores de cáncer desvelados en el presente documento. Este enfoque de descubrimiento está en claro contraste con el descubrimiento de biomarcadores de medio acondicionado o células lisadas ya que consulta un sistema más pertinente para el paciente que no requiere traducción a la patología humana.

10 Por lo tanto, en un aspecto de la presente solicitud, se proporcionan uno o más biomarcadores para su uso solos o en diversas combinaciones para diagnosticar cáncer. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen los biomarcadores proporcionados en la Tabla 19, que se identificaron usando un ensayo basado en aptámeros múltiple, como se describe en general en el Ejemplo 1 y más específicamente en el Ejemplo 6. Los marcadores proporcionados en la Tabla 19 son útiles para distinguir individuos que tienen cáncer de los que no tienen cáncer.

15 Aunque determinados biomarcadores de cáncer descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar cáncer, también se describen en el presente documento métodos para el agrupamiento de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de cáncer que son cada uno útiles como un panel de tres o más biomarcadores. Por lo tanto, diversas realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en donde N es al menos tres biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 20 3-23 biomarcadores.

25 En otras realizaciones más, N se selecciona para que sea cualquier número de 2-5, 2-10, 2-15, 2-20 o 2-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 3-5, 3-10, 3-15, 3-20 o 3-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 4-5, 4-10, 4-15, 4-20 o 4-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 5-10, 5-15, 5-20 o 5-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 6-10, 6-15, 6-20 o 6-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 7-10, 7-15, 7-20 o 7-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 8-10, 8-15, 8-20 o 8-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 9-10, 9-15, 9-20 o 9-23. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 10-15, 10-20 o 10-23. Se apreciará que N puede seleccionarse para abarcar intervalos similares, pero de mayor orden.

30 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos un valor de biomarcador correspondiente a al menos un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionados en la Tabla 19, en donde el individuo se clasifica como aquejado de cáncer basándose en al menos un valor de biomarcador.

35 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde la probabilidad de que el individuo tenga cáncer se determina basándose en los valores de biomarcadores.

40 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde el individuo se clasifica como aquejado de cáncer basándose en los valores de biomarcadores y en donde N = 3-10.

45 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde la probabilidad de que el individuo tenga cáncer se determina basándose en los valores de biomarcadores y en donde N = 3-10.

50 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar que un individuo no tiene cáncer, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos un valor de biomarcador correspondiente a al menos un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde el individuo se clasifica como no aquejado de cáncer basándose en al menos un valor de biomarcador.

55 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar que un individuo no tiene cáncer, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde el individuo se clasifica como no aquejado de cáncer basándose en los valores de biomarcadores y en donde N = 3-10.

60 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene cáncer y en donde N = 3-10.

En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de biomarcadores seleccionado del grupo de paneles expuesto en las tablas 20 -29 en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene cáncer.

5 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una ausencia de cáncer, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en donde los biomarcadores se seleccionan del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica una ausencia de cáncer en el individuo y en donde N = 3-10.

10 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una ausencia de cáncer, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de biomarcadores seleccionado del grupo de paneles proporcionado en las tablas 20 -29, en donde una clasificación de los valores de biomarcadores indica una ausencia de cáncer en el individuo.

15 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar cáncer en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde el individuo se clasifica como aquejado de cáncer basándose en una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en donde N = 3-10.

20 En otro aspecto, se proporciona un método para diagnosticar una ausencia de cáncer en un individuo, incluyendo el método detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en donde dicho individuo se clasifica como no aquejado de cáncer basándose en una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en donde N = 3-10.

25 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para indicar una probabilidad de cáncer. El método comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores, en donde N es como se ha definido anteriormente, seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19; realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de los valores de biomarcadores; e indicar una probabilidad de que el individuo tenga cáncer basándose en una pluralidad de clasificaciones.

30 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para clasificar a un individuo como aquejado o no aquejado de cáncer. El método comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19; realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de los valores de biomarcadores; e indicar si el individuo tiene cáncer basándose en una pluralidad de clasificaciones.

35 En otro aspecto, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de cáncer. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores, en donde N es como se ha definido anteriormente, en la muestra biológica seleccionada del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19; y código que ejecuta un método de clasificación que indica una probabilidad de que el individuo tenga cáncer en función de los valores de biomarcadores.

40 En otro aspecto, se proporciona un producto de programa informático para indicar un estado de cáncer de un individuo. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores en la muestra biológica seleccionados del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19; y código que ejecuta un método de clasificación que indica un estado de cáncer del individuo en función de los valores de biomarcadores.

45 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para indicar una probabilidad de cáncer. El método comprende recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19; realizar con el ordenador una clasificación del valor de biomarcador; e indicar una probabilidad de que el individuo tenga cáncer basándose en la clasificación.

50 En otro aspecto, se proporciona un método implementado por ordenador para clasificar a un individuo como

aquejado o no aquejado de cáncer. El método comprende recuperar de un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19; realizar con el ordenador una clasificación del valor de biomarcador; e indicar si el individuo tiene cáncer basándose en la clasificación.

5 En otro aspecto más, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de cáncer. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19; y código que ejecuta un método de clasificación que indica una probabilidad de que el individuo tenga cáncer en función del valor de biomarcador.

15 En otro aspecto más, se proporciona un producto de programa informático para indicar un estado de cáncer de un individuo. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19; y código que ejecuta un método de clasificación que indica un estado de cáncer del individuo en función del valor de biomarcador.

**Breve descripción de los dibujos**

25 La Figura 1A es un diagrama de flujo para un método a modo de ejemplo para detectar CPNM en una muestra biológica.  
 La Figura 1B es un diagrama de flujo para un método a modo de ejemplo para detectar CPNM en una muestra biológica usando un método de clasificación bayesiana simple.  
 La Figura 2 muestra una curva de ROC para un único biomarcador, MMP7, usando un clasificador bayesiano simple para un ensayo que detecta CPNM.  
 30 La Figura 3 muestra curvas de ROC para paneles de biomarcadores de dos a diez biomarcadores usando clasificadores bayesianos simples para un ensayo que detecta CPNM.  
 La Figura 4 ilustra el aumento de la puntuación de clasificación (ABC) a medida que aumenta el número de biomarcadores de uno a diez usando clasificación bayesiana simple para un panel de CPNM.  
 35 La Figura 5 muestra las distribuciones de biomarcadores medidas para MMP7 como una función de distribución acumulada (fda) en UFR transformadas por log para los fumadores y controles de nódulos pulmonares benignos combinados (línea continua) y el grupo de enfermedad CPNM (línea de puntos) junto con sus ajustes de curva a una fda (líneas discontinuas) usado para entrenar los clasificadores bayesianos simples.  
 La Figura 6 ilustra un sistema informático a modo de ejemplo para su uso con diversos métodos implementados por ordenador descritos en el presente documento.  
 40 La Figura 7 es un diagrama de flujo para un método para indicar la probabilidad de que un individuo tenga CPNM de acuerdo con una realización.  
 La Figura 8 es un diagrama de flujo para un método para indicar la probabilidad de que un individuo tenga CPNM de acuerdo con una realización.  
 La Figura 9 ilustra un ensayo de aptámeros a modo de ejemplo que puede usarse para detectar uno o más biomarcadores de CPNM en una muestra biológica.  
 45 La Figura 10 muestra un histograma de frecuencias para el que se usaron biomarcadores para construir clasificadores para distinguir entre CPNM y los fumadores y el grupo de control de nódulos pulmonares benignos de un conjunto agregado de biomarcadores potenciales.  
 La Figura 11A muestra un par de histogramas que resumen todas las puntuaciones posibles de clasificadores bayesianos simples (ABC) de una única proteína usando los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 (negro) y un conjunto de marcadores aleatorios (gris).  
 50 La Figura 11B muestra un par de histogramas que resumen todas las puntuaciones posibles de clasificadores bayesianos simples (ABC) de dos proteínas usando los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 (negro) y un conjunto de marcadores aleatorios (gris).  
 La Figura 11C muestra un par de histogramas que resumen todas las puntuaciones posibles de clasificadores bayesianos simples de tres proteínas (ABC) usando los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 (negro) y un conjunto de marcadores aleatorios (gris).  
 55 La Figura 12 muestra la ABC para clasificadores bayesianos simples usando de 2 a 10 marcadores seleccionados del panel completo y las puntuaciones obtenidas descartando los mejores 5, 10 y 15 marcadores durante la generación de clasificadores.  
 60 La Figura 13A muestra un conjunto de curvas de ROC modeladas a partir de los datos en la Tabla 14 para paneles de dos a cinco marcadores.  
 La Figura 13B muestra un conjunto de curvas de ROC calculadas a partir de los datos de entrenamiento para paneles de dos a cinco marcadores como en la Figura 12A.  
 65 La Figura 14 muestra una curva de ROC calculada a partir del panel de biomarcadores clínicos descrito en el Ejemplo 5.

Las Figuras 15A y 15B muestran una comparación de rendimiento entre diez biomarcadores de cáncer seleccionados por un procedimiento de selección ávido descrito en el Ejemplo 6 (Tabla 19) y 1000 conjuntos de diez biomarcadores «no marcadores» muestreados aleatoriamente. La ABC media para los diez biomarcadores de cáncer en la Tabla 19 se muestra como una línea vertical de puntos. En la Figura 15A, se seleccionaron aleatoriamente conjuntos de diez «no marcadores» que no se seleccionaron por el procedimiento ávido descrito en el Ejemplo 6. En la Figura 15B, se usó el mismo procedimiento que 15A; sin embargo, la toma de muestras se restringió a los 49 biomarcadores de CPNM restantes de la Tabla 1 que no se seleccionaron por el procedimiento ávido descrito en el Ejemplo 6.

La Figura 16 muestra curvas de características operativas receptoras (ROC) para los 3 clasificadores bayesianos simples expuestos en la Tabla 31. Para cada estudio, el área bajo la curva (ABC) también se presenta junto a la leyenda.

### Descripción detallada

Ahora se hará referencia en detalle a aspectos representativos de la divulgación. La invención se describe por las reivindicaciones adjuntas.

El experto en la materia reconocerá muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrían utilizarse en y están en el ámbito de la práctica de la presente invención. La presente invención no está limitada en modo alguno por los métodos y materiales descritos.

Salvo que definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque algunos métodos, dispositivos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o el ensayo de la invención, los métodos, dispositivos y materiales preferidos se describen a continuación.

Todas las publicaciones, los documentos de patente publicados y solicitudes de patente citados en la presente divulgación son indicativos del nivel de experiencia en la técnica o las técnicas a las que pertenece la solicitud.

Como se usa en la presente solicitud, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «uno/una», y «el/la» incluyen referencias plurales, a menos que el contenido imponga claramente otra cosa, y se usan indistintamente con «al menos uno» y «uno o más». Por lo tanto, la referencia a «un aptámero» incluye mezclas de aptámeros, la referencia a «una sonda» incluye mezclas de sondas, y similares.

Como se usa en el presente documento, el término «aproximadamente» representa una modificación o variación insignificante del valor numérico de modo que la función básica del elemento con el que se relaciona el valor numérico no cambia.

Como se usa en el presente documento, las expresiones «comprende», «que comprende», «incluye», «que incluye», «contiene», «que contiene», y cualquier variación de las mismas, están destinados a cubrir una inclusión no exclusiva, de modo que un proceso, método, producto por proceso o composición de la materia que comprende, incluye o contiene un elemento o lista de elementos no incluye solo esos elementos, sino que puede incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, método, producto por proceso o composición de la materia.

La presente divulgación incluye biomarcadores, métodos, dispositivos, reactivos, sistemas y kits para la detección y el diagnóstico de CPNM y cáncer más en general.

En un aspecto, se proporcionan uno o más biomarcadores para su uso solos o en diversas combinaciones para diagnosticar CPNM, permitir el diagnóstico diferencial de CPNM de afecciones no malignas halladas en individuos con nódulos pulmonares indeterminados identificados con una exploración de TC u otro método de captura de imágenes, exploración de fumadores de alto riesgo para CPNM y diagnóstico de un individuo con CPNM, supervisar la reaparición de CPNM o abordar otras indicaciones clínicas. Como se describe en detalle posteriormente, las realizaciones a modo de ejemplo incluyen los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, que se identificaron usando un ensayo basado en aptámeros múltiple que se describe en general en el Ejemplo 1 y más específicamente en el Ejemplo 2.

La Tabla 1 expone los hallazgos obtenidos del análisis de cientos de muestras de sangre individuales de casos de CPNM y cientos de muestras de sangre de control individuales equivalentes de fumadores de alto riesgo y nódulos pulmonares benignos. El grupo de control de nódulos pulmonares benignos y fumadores se diseñó para ajustarse a las poblaciones con las que un ensayo de diagnóstico de CPNM puede tener el mayor beneficio, incluyendo individuos asintomáticos e individuos sintomáticos. Estos casos y controles se obtuvieron de múltiples sitios clínicos para imitar la gama de condiciones del mundo real en las que puede aplicarse dicho ensayo. Los biomarcadores potenciales se midieron en muestras individuales en lugar de agrupando la sangre de enfermedad y de control; esto permitió un mejor entendimiento de las variaciones individuales y de grupo en los fenotipos asociados con la

presencia y ausencia de enfermedad (en este caso CPNM). Ya que se realizaron más de 1000 mediciones de proteínas en cada muestra y se midieron individualmente varios cientos de muestras de cada una de las poblaciones de enfermedad y de control, la Tabla 1, resultó de un análisis de un conjunto de datos inusualmente grande. Las mediciones se analizaron usando los métodos descritos en la sección, «Clasificación de biomarcadores y cálculo de puntuaciones de enfermedad» en el presente documento. La Tabla 1 enumera los 59 biomarcadores que se ha descubierto que son útiles para distinguir muestras obtenidas de individuos con CPNM de muestras «de control» obtenidas de fumadores y nódulos pulmonares benignos.

Aunque determinados biomarcadores de CPNM descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar CPNM, también se describen en el presente documento métodos para el agrupamiento de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de CPNM, en los que cada agrupamiento o selección de subconjunto es útil como un panel de tres o más biomarcadores, denominado indistintamente en el presente documento «panel de biomarcadores» y un panel. Por lo tanto, diversas realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en donde N es al menos dos biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona de 2-59 biomarcadores.

En otras realizaciones más, N se selecciona para que sea cualquier número de 2-5, 2-10, 2-15, 2-20, 2-25, 2-30, 2-35, 2-40, 2-45, 2-50, 2-55 o 2-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 3-25, 3-30, 3-35, 3-40, 3-45, 3-50, 3-55 o 3-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 4-5, 4-10, 4-15, 4-20, 4-25, 4-30, 4-35, 4-40, 4-45, 4-50, 4-55 o 4-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55 o 5-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 6-10, 6-15, 6-20, 6-25, 6-30, 6-35, 6-40, 6-45, 6-50, 6-55 o 6-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 7-10, 7-15, 7-20, 7-25, 7-30, 7-35, 7-40, 7-45, 7-50, 7-55 o 7-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 8-10, 8-15, 8-20, 8-25, 8-30, 8-35, 8-40, 8-45, 8-50, 8-55 o 8-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 9-10, 9-15, 9-20, 9-25, 9-30, 9-35, 9-40, 9-45, 9-50, 9-55 o 9-59. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 10-15, 10-20, 10-25, 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-55 o 10-59. Se apreciará que N puede seleccionarse para abarcar intervalos similares, pero de mayor orden.

En una realización, el número de biomarcadores útiles para un subconjunto o panel de biomarcadores se basa en el valor de sensibilidad y especificidad para la combinación particular de valores de biomarcadores. Los términos «sensibilidad» y «especificidad» se usan en el presente documento con respecto a la capacidad para clasificar correctamente a un individuo, basándose en uno o más valores de biomarcadores detectados en su muestra biológica, como aquejados de CPNM o no aquejados de CPNM. La «sensibilidad» indica el rendimiento del biomarcador o los biomarcadores con respecto a la clasificación correcta de individuos que tienen CPNM. La «especificidad» indica el rendimiento del biomarcador o los biomarcadores con respecto a la clasificación correcta de individuos que no tienen CPNM. Por ejemplo, una especificidad del 85 % y sensibilidad del 90 % para un panel de marcadores usado para ensayar un conjunto de muestras de control y muestras de CPNM indica que el 85 % de las muestras de control se clasificaron correctamente como muestras de control por el panel, y el 90 % de las muestras de CPNM se clasificaron correctamente como muestras de CPNM por el panel. El valor mínimo deseado o preferido puede determinarse como se describe en el Ejemplo 3. Se exponen paneles representativos en las tablas 4-11, que exponen una serie de 100 paneles diferentes de 3-10 biomarcadores, que tienen los niveles indicados de especificidad y sensibilidad para cada panel. El número total de apariciones de cada marcador en cada uno de estos paneles se indica en la Tabla 12.

En un aspecto, se detecta o diagnostica CPNM en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno a al menos uno de los biomarcadores MMP7, CLIC1 o STX1A y al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la lista de biomarcadores en la Tabla 1, en la que N es igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. En un aspecto adicional, se detecta o diagnostica CPNM en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno a los biomarcadores MMP7, CLIC1 o STX1A y uno de al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la lista de biomarcadores en la Tabla 1, en la que N es igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. En un aspecto adicional, se detecta o diagnostica CPNM en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno al biomarcador MMP7 y uno de al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la lista de biomarcadores en la Tabla 1, en la que N es igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. En un aspecto adicional, se detecta o diagnostica CPNM en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno al biomarcador CLIC1 y uno de al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la lista de biomarcadores en la Tabla 1, en la que N es igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. En un aspecto adicional, se detecta o diagnostica CPNM en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno al biomarcador STX1A y uno de al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la lista de biomarcadores en la Tabla 1, en la que N es igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.

Los biomarcadores de CPNM identificados en el presente documento representan un número relativamente grande de opciones para subconjuntos o paneles de biomarcadores que pueden usarse para detectar o diagnosticar eficazmente CPNM. La selección del número deseado de dichos biomarcadores depende de la combinación

específica de biomarcadores elegidos. Es importante recordar que los paneles de biomarcadores para detectar o diagnosticar CPNM también pueden incluir biomarcadores no hallados en la Tabla 1 y que la inclusión de biomarcadores adicionales no hallados en la Tabla 1 puede reducir el número de biomarcadores en el subconjunto o panel particular que se selecciona de la Tabla 1. El número de biomarcadores de la Tabla 1 usados en un subconjunto o panel también puede reducirse junto con los valores de biomarcadores para establecer valores de sensibilidad y especificidad para un ensayo dado.

Otro factor que puede afectar al número de biomarcadores puede usarse en un subconjunto o panel de biomarcadores es los procedimientos usados para obtener muestras biológicas de individuos que se diagnostican con respecto a CPNM. En un ambiente de adquisición de muestras cuidadosamente controlado, el número de biomarcadores necesario para alcanzar los valores de sensibilidad y especificidad deseados será menor que en una situación en la que puede haber más variación en la recogida, la manipulación y el almacenamiento de muestras. En el desarrollo de la lista de biomarcadores expuesta en la Tabla 1, se utilizaron múltiples sitios de recogida de muestras para recoger datos para entrenamiento de clasificadores. Esto proporciona biomarcadores más robustos que son menos sensibles a variaciones en la recogida, la manipulación y el almacenamiento de muestras, pero también puede requerir que el número de biomarcadores en un subconjunto o panel sea mayor que si los datos de entrenamiento se obtuvieron todos en condiciones muy similares.

Un aspecto de la presente solicitud puede describirse en general en referencia a las Figuras 1A y 1B. Se obtiene una muestra biológica de un individuo o individuos de interés. La muestra biológica se ensaya después para detectar la presencia de uno o más (N) biomarcadores de interés y para determinar un valor de biomarcador para cada uno de dichos N biomarcadores (indicado en la Figura 1B como UFR de marcador). Una vez que se ha detectado un biomarcador y se ha asignado un valor de biomarcador cada marcador se puntúa o clasifica como se describe en detalle en el presente documento. Las puntuaciones de marcadores se combinan después para proporcionar una puntuación de diagnóstico total, que indica la probabilidad de que el individuo de quien se obtuvo la muestra tenga CPNM.

Como se usa en el presente documento, «de pulmón» puede denominarse indistintamente «pulmonar».

Como se usa en el presente documento, «fumador» se refiere a un individuo que tiene un historial de inhalación de humo de tabaco.

«Muestra biológica», «muestra» y «muestra de ensayo» se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier material, fluido biológico, tejido o célula obtenido o derivado de otro modo de un individuo. Esto incluye sangre (incluyendo sangre completa, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, capa leucocítica, plasma y suero), esputo, lágrimas, moco, lavados nasales, aspirado nasal, aliento, orina, semen, saliva, lavados peritoneales, líquido quístico, líquido meníngeo, líquido amniótico, líquido glandular, líquido linfático, líquido citológico, líquido ascítico, líquido pleural, aspirado del pezón, aspirado bronquial, cepillado bronquial, líquido sinovial, aspirado de la articulación, secreciones de órganos, células, un extracto celular y líquido cefalorraquídeo. Esto incluye también fracciones separadas experimentalmente de todo lo anterior. Por ejemplo, una muestra de sangre puede fraccionarse en suero, plasma o en fracciones que contienen tipos particulares de células sanguíneas, tales como glóbulos rojos o glóbulos blancos (leucocitos). Si se desea, una muestra puede ser una combinación de muestras de un individuo, tal como una combinación de una muestra tisular y líquida. La expresión «muestra biológica» también incluye materiales que contienen material sólido homogeneizado, tal como de una muestra de heces, una muestra tisular o una biopsia tisular, por ejemplo. La expresión «muestra biológica» también incluye materiales obtenidos de un cultivo tisular o un cultivo celular. Puede emplearse cualquier método adecuado para obtener una muestra biológica; los métodos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, flebotomía, hisopo (por ejemplo, hisopo bucal) y un procedimiento de biopsia de aspiración con aguja fina. Los tejidos a modo de ejemplo susceptibles de aspiración con aguja fina incluyen ganglio linfático, pulmón, lavados pulmonares, LBA (lavado broncoalveolar), pleura, tiroides, mama, páncreas e hígado. También pueden recogerse muestras, por ejemplo, por microdissección (por ejemplo, microdissección de captura por láser (MCL) o microdissección por láser (MDL)), lavado de vejiga, frotis (por ejemplo, un frotis de PAP) o lavado ductal. Una «muestra biológica» obtenida o derivada de un individuo incluye cualquiera de dichas muestras que se haya procesado de cualquier manera adecuada después de obtenerse del individuo.

Además, se debería tener en cuenta que puede obtenerse una muestra biológica tomando muestras biológicas de varios individuos y agrupándolas o agrupando una alícuota de una muestra biológica de cada individuo. La muestra agrupada puede tratarse como una muestra de un único individuo y si se establece la presencia de cáncer en la muestra agrupada, entonces cada muestra biológica individual puede volver a ensayarse para determinar qué individuo o individuos tienen CPNM.

Para los fines de la presente memoria descriptiva, se entiende que la expresión «datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo» significa que los datos de alguna forma se obtuvieron de, o se generaron usando, la muestra biológica del individuo. Los datos pueden haberse reformateado, revisado o alterado matemáticamente en algún grado después de haberse generado, tal como por conversión de unidades en un sistema de medición a unidades en otro sistema de medición; pero, se entiende que los datos se han obtenido de, o se generaron usando,

la muestra biológica.

«Diana», «molécula diana» y «analito» se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier molécula de interés que pueda estar presente en una muestra biológica. Una «molécula de interés» incluye cualquier variación menor de una molécula particular, tal como, en el caso de una proteína, por ejemplo, variaciones menores en la secuencia de aminoácidos, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje, que no altera sustancialmente la identidad de la molécula. Una «molécula diana», «diana» o «analito» es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula o estructura multimolecular. «Moléculas diana», «dianas» y «analitos» se refieren a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Las moléculas diana a modo de ejemplo incluyen proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, polisacáridos, glucoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, aficuerpos, autoanticuerpos, miméticos de anticuerpos, virus, patógenos, sustancias tóxicas, sustratos, metabolitos, análogos de estado de transición, cofactores, inhibidores, fármacos, colorantes, nutrientes, factores de crecimiento, células, tejidos y cualquier fragmento o parte de cualquiera de los anteriores.

Como se usa en el presente documento, «polipéptido», «péptido», y «proteína» se usan indistintamente en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por compuestos distintos de aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que se ha modificado de manera natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen en la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ser monocatenarios o cadenas asociadas. También se incluyen en la definición preproteínas y proteínas maduras intactas; péptidos o polipéptidos derivados de una proteína madura; fragmentos de una proteína; variantes de corte y empalme; formas recombinantes de una proteína; variantes proteicas con modificaciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos; productos de digestión; y modificaciones postraduccionales, tales como glucosilación, acetilación, fosforilación y similares.

Como se usa en el presente documento, «marcador» y «biomarcador» se usan indistintamente para referirse a una molécula diana que indica o es una señal de un proceso normal o anómalo en un individuo o de una enfermedad u otra afección en un individuo. Más específicamente, un «marcador» o «biomarcador» es un parámetro anatómico, fisiológico, bioquímico o molecular asociado con la presencia de un estado o proceso fisiológico específico, bien normal o bien anómalo y, si es anómalo, bien crónico o agudo. Los biomarcadores son detectables y medibles por diversos métodos incluyendo ensayos de laboratorio y captura de imágenes médica. Cuando un biomarcador es una proteína, también es posible usar la expresión del gen correspondiente como una medida afín de la cantidad o presencia o ausencia del biomarcador proteico correspondiente en una muestra biológica o estado de metilación del gen que codifica el biomarcador o proteínas que controlan la expresión del biomarcador.

Como se usa en el presente documento, «valor de biomarcador», «valor», «nivel de biomarcador» y «nivel» se usan indistintamente para referirse a una medición que se realiza usando cualquier método analítico para detectar el biomarcador en una muestra biológica y que indica la presencia, ausencia, cantidad absoluta o concentración, cantidad relativa o concentración, título, un nivel, un nivel de expresión, una relación de niveles medidos, o similares, de, para o correspondientes al biomarcador en la muestra biológica. La naturaleza exacta del «valor» o «nivel» depende del diseño específico y componentes del método analítico particular empleado para detectar el biomarcador.

Cuando un biomarcador indica o es una señal de un proceso anómalo o una enfermedad u otra afección en un individuo, el biomarcador se describe en general como sobreexpresado o infraexpresado en comparación con un nivel de expresión o valor del biomarcador que indica o es una señal de un proceso normal o una ausencia de una enfermedad u otra afección en un individuo. «Regulación positiva», «regulado positivamente», «sobreexpresión», «sobreexpresado» y cualquier variación de las mismas se usan indistintamente para referirse a un valor o nivel de un biomarcador en una muestra biológica que es mayor que un valor o nivel (o intervalo de valores o niveles) del biomarcador que se detecta normalmente en muestras biológicas similares de individuos sanos o normales. Las expresiones también pueden referirse a un valor o nivel de un biomarcador en una muestra biológica que es mayor que un valor o nivel (o intervalo de valores o niveles) del biomarcador que puede detectarse en un estadio diferente de una enfermedad particular.

«Regulación negativa», «regulado negativamente», «infraexpresión», «infraexpresado» y cualquier variación de las mismas se usan indistintamente para referirse a un valor o nivel de un biomarcador en una muestra biológica que es menor que un valor o nivel (o intervalo de valores o niveles) del biomarcador que se detecta normalmente en muestras biológicas similares de individuos sanos o normales. Las expresiones también pueden referirse a un valor o nivel de un biomarcador en una muestra biológica que es menor que un valor o nivel (o intervalo de valores o niveles) del biomarcador que puede detectarse en un estadio diferente de una enfermedad particular.

Además, un biomarcador que se sobreexpresa o infraexpresa puede indicarse también como «expresado diferencialmente» o que tiene un «nivel diferencial» o «valor diferencial» en comparación con un nivel o valor de

expresión «normal» del biomarcador que indica o es una señal de un proceso normal o una ausencia de una enfermedad u otra afección en un individuo. Por lo tanto, la «expresión diferencial» de un biomarcador también puede indicarse como una variación con respecto a un nivel de expresión «normal» del biomarcador.

5 La expresión «expresión génica diferencial» y «expresión diferencial» se usan indistintamente para referirse a un gen (o su producto de expresión proteico correspondiente) cuya expresión se activa hasta un nivel mayor o menor en un sujeto que padece una enfermedad específica, en relación con su expresión en un sujeto normal o de control. Las expresiones también incluyen genes (o los productos de expresión proteicos correspondientes) cuya expresión se activa hasta un nivel mayor o menor en diferentes estadios de la misma enfermedad. También se entiende que un gen expresado diferencialmente puede activarse o inhibirse en los ácidos nucleicos o proteínas, o puede someterse a corte y empalme alternativo para dar como resultado un producto polipeptídico diferente. Dichas diferencias pueden demostrarse por diversos cambios incluyendo niveles de ARNm, expresión en superficie, secreción u otra división de un polipéptido. La expresión génica diferencial puede incluir una comparación de expresión entre dos o más genes o sus productos génicos; o una comparación de las relaciones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos; o incluso una comparación de dos productos procesados de forma diferente del mismo gen, que difieren entre sujetos normales y sujetos que padecen una enfermedad; o entre diversos estadios de la misma enfermedad. La expresión diferencial incluye diferencias tanto cuantitativas, como cualitativas, en el patrón de expresión temporal o celular en un gen su sus productos de expresión entre, por ejemplo, células normales y enfermas o entre células que han experimentado diferentes acontecimientos de enfermedad o estadios de enfermedad.

Como se usa en el presente documento, «individuo» se refiere a un sujeto o paciente de ensayo. El individuo puede ser un mamífero o uno distinto de un mamífero. En diversas realizaciones, el individuo es un mamífero. Un individuo mamífero puede ser un ser humano o uno distinto de ser humano. En diversas realizaciones, el individuo es un ser humano. Un individuo sano o normal es un individuo en que la enfermedad o afección de interés (incluyendo, por ejemplo, enfermedades de pulmón, enfermedades asociadas a pulmón u otras afecciones pulmonares) no es detectable por métodos de diagnóstico convencionales.

«Diagnosticar», «diagnosticando», «diagnóstico» y variaciones de los mismos se refieren a la detección, la determinación o el reconocimiento de un estado de salud o condición de un individuo basándose en una o más señales, síntomas, datos u otra información relacionados con ese individuo. El estado de salud de un individuo puede diagnosticarse como sano / normal (es decir, un diagnóstico de ausencia de una enfermedad o afección) o diagnosticarse como enfermo / anómalo (es decir, un diagnóstico de la presencia, o una evaluación de las características, de una enfermedad o afección). Los términos «diagnosticar», «diagnosticando», «diagnóstico», etc., abarcan, con respecto a una enfermedad o afección particular, la detección inicial de la enfermedad; la caracterización o clasificación de la enfermedad; la detección de la progresión, remisión o reaparición de la enfermedad; y la detección de una respuesta a enfermedad después de la administración de un tratamiento o una terapia al individuo. El diagnóstico de CPNM incluye distinguir individuos que tienen cáncer de individuos que no. Incluye además distinguir fumadores y nódulos pulmonares benignos de CPNM.

«Pronosticar», «pronosticando», «pronóstico» y variaciones de los mismos se refieren a la predicción de un ciclo futuro de una enfermedad o afección en un individuo que tiene la enfermedad o afección (por ejemplo, predicción de la supervivencia de un paciente), y dichos términos abarcan la evaluación de respuesta a enfermedad después de la administración de un tratamiento o terapia al individuo.

«Evaluar», «evaluando», «evaluación» y variaciones de los mismos abarcan tanto «diagnosticar» como «pronosticar» y también abarcan determinaciones o predicciones acerca de la evolución futura de una enfermedad o afección en un individuo que no tiene la enfermedad así como determinaciones o predicciones con respecto a la probabilidad de que una enfermedad o afección reaparecerá en un individuo que aparentemente se ha curado de la enfermedad. El término «evaluar» también abarca evaluar una respuesta del individuo a una terapia, tal como, por ejemplo, predecir si un individuo probablemente responda de forma favorable a un agente terapéutico o es poco probable que responda a un agente terapéutico (o experimentará efectos secundarios tóxicos u otros indeseables, por ejemplo), seleccionar un agente terapéutico para administración a un individuo o supervisar o determinar la respuesta de un individuo a una terapia que se ha administrado al individuo. Por lo tanto, «evaluar» CPNM puede incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes: pronosticar la evolución futura de CPNM en un individuo; predecir la reaparición de CPNM en un individuo que aparentemente se ha curado de CPNM; o determinar o predecir la respuesta de un individuo a un tratamiento de CPNM o seleccionar un tratamiento de CPNM para administrar a un individuo basándose en una determinación de los valores de biomarcadores derivados de la muestra biológica del individuo.

Puede indicarse que cualquiera de los ejemplos siguientes «diagnostica» o «evalúa» CPNM: detectar inicialmente la presencia o ausencia de CPNM; determinar un estadio específico, tipo o subtipo, u otra clasificación o característica de CPNM; determinar si un nódulo o una masa de pulmón sospechoso es CPNM benigno o maligno; o detectar/supervisar la progresión de CPNM (por ejemplo, supervisar el crecimiento tumoral o la propagación metastásica), remisión o reaparición.

Como se usa en el presente documento, «información biomédica adicional» se refiere a una o más evaluaciones de un individuo, distinta del uso de cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento, que se asocian con el riesgo de cáncer o, más específicamente, riesgo de CPNM. «Información biomédica adicional» incluye cualquiera de los siguientes: descriptores físicos de un individuo, descriptores físicos de un nódulo pulmonar observado por captura de imágenes de TC, la altura y/o el peso de un individuo, el sexo de un individuo, la etnia de un individuo, historial de tabaquismo, historial ocupacional, exposición a carcinógenos conocidos (por ejemplo, exposición a cualquiera de amianto, gas radón, sustancias químicas, humo de fuegos y contaminación del aire, que pueden incluir emisiones de fuentes estacionarias o móviles tales como emisiones industriales/de fábricas o de automóviles/barcos/aviones), exposición a humo ajeno, historial familiar de CPNM (u otro cáncer), la presencia de nódulos pulmonares, el tamaño de nódulos, la localización de nódulos, la morfología de nódulos (por ejemplo, como se observa mediante captura de imágenes de TC, opacidad de vidrio deslustrado (OVD), sólido, no sólido), características del borde del nódulo (por ejemplo, liso, lobulado, agudo y liso, espiculado, infiltrante) y similares. El historial de tabaquismo se cuantifica habitualmente con respecto a «paquete años», que se refiere al número de años que una persona ha fumado multiplicado por el número promedio de paquetes fumados al día. Por ejemplo, se indica que una persona que ha fumado, en promedio, un paquete de cigarrillos al día durante 35 años tiene 35 paquetes años de historial de tabaquismo. Puede obtenerse información biomédica adicional de un individuo usando técnicas rutinarias conocidas en este campo, tal como de los individuos en sí mismos mediante el uso de un cuestionario de pacientes rutinario o cuestionario de historial de salud, etc., o de un practicante médico, etc. Como alternativa, puede obtenerse información biomédica adicional de técnicas de captura de imágenes rutinarias, incluyendo captura de imágenes de TC (por ejemplo, captura de imágenes de TC de dosis baja) y radiografía. El ensayo de niveles de biomarcadores en combinación con una evaluación de cualquier información biomédica adicional puede, por ejemplo, mejorar la sensibilidad, especificidad y/o ABC para detectar CPNM (u otros usos relacionados con CPNM) en comparación con ensayo de biomarcadores solo o evaluación de cualquier elemento particular de información biomédica adicional sola (por ejemplo, captura de imágenes de TC sola).

La expresión «área bajo la curva» o «ABC» se refiere al área bajo la curva de una curva de característica operativa receptora (ROC), ambas bien conocidas en la materia. Las medidas de ABC son útiles para comparar la precisión de un clasificador a través del intervalo de datos completo. Los clasificadores con una ABC tienen una mayor capacidad para clasificar desconocidos correctamente entre dos grupos de interés (por ejemplo, muestras de CPNM y muestras normales o de control). Las curvas de ROC son útiles para representar el rendimiento de un elemento particular (por ejemplo, cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento y/o cualquier elemento de información biomédica adicional) en la distinción entre dos poblaciones (por ejemplo, casos que tienen CPNM y controles sin CPNM). Normalmente, los datos de elementos a lo largo de la población completa (por ejemplo, los casos y controles) se clasifican en orden ascendente basándose en el valor de un único elemento. Después, para cada valor para ese elemento, se calculan las tasas de verdadero positivo y falso positivo para los datos. La tasa de verdaderos positivos se determina contando el número de casos por encima del valor para ese elemento y dividiendo después por el número total de casos. La tasa de falsos positivos se determina contando el número de controles por encima del valor para ese elemento y dividiendo después por el número total de controles. Aunque esta definición se refiere a escenarios en los que un elemento está elevado en casos comparados con controles, esta definición también se aplica a escenarios en los que un elemento es más bajo en casos comparados con los controles (en dicho escenario se contarían muestras por debajo del valor para ese elemento). Pueden generarse curvas de ROC para un único elemento así como para otros resultados individuales, por ejemplo, una combinación de dos o más elementos puede combinarse matemáticamente (por ejemplo, sumarse, restarse, multiplicarse, etc.) para proporcionar un único valor de suma, y este único valor de suma puede representarse en una curva de ROC. Adicionalmente, cualquier combinación de múltiples elementos, en los que la combinación deriva un único valor de resultado, puede representarse en una curva de ROC. Estas combinaciones de elementos pueden comprender un ensayo. La curva de ROC es la representación de la tasa de verdadero positivo (sensibilidad) de un ensayo frente a la tasa de falso positivo (1-especificidad) del ensayo.

Como se usa en el presente documento, «detectar» o «determinar» con respecto a un valor de biomarcador incluye el uso tanto del instrumento requerido para observar y registrar una señal correspondiente a un valor de biomarcador como del material o los materiales requeridos para generar esa señal. En diversas realizaciones, el valor de biomarcador se detecta usando cualquier método adecuado, incluyendo fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial, ondas acústicas de superficie, espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja, espectroscopia de Raman, microscopia de fuerza atómica, microscopia de efecto túnel, métodos de detección electroquímica, resonancia magnética nuclear, puntos cuánticos y similares.

«Soporte sólido» se refiere en el presente documento a cualquier sustrato que tenga una superficie a la que puedan unirse moléculas, directa o indirectamente, mediante enlaces covalentes o no covalentes. Un «soporte sólido» puede tener diversos formatos físicos, que pueden incluir, por ejemplo, una membrana; un chip (por ejemplo, un chip de proteínas); un portaobjetos (por ejemplo, un portaobjetos o cubreobjetos de vidrio); una columna; una partícula hueca, sólida, semisólida, que contiene poros o cavidades, tal como, por ejemplo, una perla; un gel; una fibra, incluyendo un material de fibra óptica; una matriz; y un receptáculo de muestras. Los receptáculos de muestras a modo de ejemplo incluyen pocillos de muestras, tubos, capilares, viales y cualquier otro vaso, surco o hendidura capaz de contener una muestra. Un receptáculo de muestra puede estar contenido en una plataforma multimuestra, tal como una placa de microtitulación, un portaobjetos, un dispositivo de microfluidos y similares. Un soporte puede

estar compuesto de un material natural o sintético, un material orgánico o inorgánico. La composición del soporte sólido en el que se unen los reactivos de captura generalmente depende del método de unión (por ejemplo, unión covalente). Otros receptáculos a modo de ejemplo incluyen microgotas y emulsiones de aceite/acuosas controladas por microfluidos o a granel en las que pueden realizarse ensayos y manipulaciones relacionadas. Los soportes sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, vidrio funcionalizado, silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, membranas, nailon, fibras naturales (tales como, por ejemplo, seda, lana y algodón), polímeros y similares. El material que comprende el soporte sólido puede incluir grupos reactivos tales como, por ejemplo, grupos carboxi, amino o hidroxilo, que se usan para unión de los reactivos de captura. Los soportes sólidos poliméricos pueden incluir, por ejemplo, poliestireno, tetraftalato de polietilenglicol, acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliacrilonitrilo, metacrilato de polimetilo, politetrafluoroetileno, caucho de butilo, caucho de estirenbutadieno, caucho natural, polietileno, polipropileno, (poli)tetrafluoroetileno, (poli)vinilidenfluoruro, policarbonato y polimetilpenteno. Las partículas de soporte sólido adecuadas que pueden usarse incluyen, por ejemplo, partículas codificadas, tales como partículas codificadas de tipo Luminex, partículas magnéticas y partículas de vidrio.

### Usos de biomarcadores a modo de ejemplo

En diversas realizaciones a modo de ejemplo, se proporcionan métodos para diagnosticar CPNM en un individuo detectando uno o más valores de biomarcadores correspondientes a uno o más biomarcadores que están presentes en la circulación de un individuo, tal como en suero o plasma, por cualquiera de varios métodos analíticos, incluyendo cualquiera de los métodos analíticos descritos en el presente documento. Estos biomarcadores, por ejemplo, se expresan diferencialmente en individuos con CPNM en comparación con individuos sin CPNM. Puede usarse detección de la expresión diferencial de un biomarcador en un individuo, por ejemplo, para permitir el diagnóstico temprano de CPNM, para distinguir entre un nódulo pulmonar benigno y maligno (tal como, por ejemplo, un nódulo observado en una exploración de tomografía computarizada (TC)), para supervisar la reaparición de CPNM o para otras indicaciones clínicas.

Cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento puede usarse en diversas indicaciones clínicas para CPNM, incluyendo cualquiera de los siguientes: detección de CPNM (tal como en un individuo o población de alto riesgo); caracterización de CPNM (por ejemplo, determinar el tipo, subtipo o estadio de CPNM), tal como distinguiendo entre cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) y cáncer de pulmón microcítico (CPM) y/o entre adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas (o que facilite de otro modo la histopatología); determinar si un nódulo pulmonar es un nódulo benigno o un tumor pulmonar maligno; determinar el pronóstico de CPNM; supervisar la progresión o remisión de CPNM; supervisar la reaparición de CPNM; supervisar la metástasis; selección de tratamiento; supervisar la respuesta a un agente terapéutico u otro tratamiento; estratificación de individuos para exploración por tomografía computarizada (TC) (por ejemplo, identificar los individuos con mayor riesgo de CPNM y por lo tanto con mayor probabilidad de beneficiarse de la exploración de TC espiral, aumentando de este modo el valor predictivo positivo de TC); combinar ensayos de biomarcadores con información biomédica adicional, tal como historial de tabaquismo, etc., o con el tamaño del nódulo, la morfología, etc. (tal como para proporcionar un ensayo con rendimiento de diagnóstico mejorado en comparación con ensayos de TC o ensayos de biomarcadores solamente); facilitar el diagnóstico de un nódulo pulmonar como maligno o benigno; facilitar la toma de decisiones clínicas una vez que se ha observado un nódulo pulmonar en TC (por ejemplo, pidiendo la repetición de exploraciones de TC si se considera que el nódulo es de riesgo bajo, tal como si un ensayo basado en biomarcadores es negativo, con o sin categorización del tamaño del nódulo, o considerando la biopsia si se interpreta que el nódulo es de riesgo medio a alto, tal como si un ensayo basado en biomarcador es positivo, con o sin categorización del tamaño del nódulo); y facilitar decisiones con respecto al seguimiento clínico (por ejemplo, si implementar exploraciones de TC repetidas, biopsia con aguja fina, resección de nódulos o toracotomía después de observar un nódulo no calcificado en TC). El ensayo de biomarcadores puede mejorar el valor predictivo positivo (VPP) con respecto a TC o exploración por radiografía de tórax de individuos de alto riesgo solamente. Además de sus utilidades junto con exploración de TC, los biomarcadores descritos en el presente documento también pueden usarse junto con cualquier otra modalidad de captura de imágenes usada para CPNM, tal como radiografía de tórax, broncoscopia o broncoscopia fluorescente, exploración de IRM o TEP. Además, los biomarcadores descritos también pueden ser útiles para permitir algunos de estos usos antes de detectarse indicaciones de CPNM capturando imágenes de modalidades u otros correlacionados clínicos, o antes de que aparezcan síntomas. Incluye además distinguir individuos con nódulos pulmonares indeterminados identificados con una exploración de TC u otro método de captura de imágenes, exploración de fumadores de alto riesgo para CPNM y diagnóstico de un individuo con CPNM.

Como un ejemplo de la manera en que cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento pueden usarse para diagnosticar CPNM, la expresión diferencial de uno o más de los biomarcadores descritos en un individuo que no se sabe que tenga CPNM puede indicar que el individuo tiene CPNM, permitiendo de este modo la detección de CPNM en un estadio temprano de la enfermedad cuando el tratamiento es más eficaz, quizás antes de detectarse el CPNM por otros medios o antes de que aparezcan síntomas. La sobreexpresión de uno o más de los biomarcadores durante el transcurso de CPNM puede ser indicativa de progresión de CPNM, por ejemplo, un tumor de CPNM crece y/o se metastatiza (y por lo tanto indica un mal pronóstico), mientras que una reducción en el grado en que uno o más de los biomarcadores se expresa diferencialmente (es decir, en ensayos de biomarcadores

posteriores, el nivel de expresión en el individuo se mueve hacia o se acerca a un nivel de expresión «normal») puede ser indicativa de remisión de CPNM, por ejemplo, un tumor de CPNM está encogiéndose (y por lo tanto indica un pronóstico bueno o mejor). De forma similar, un aumento en el grado en que uno o más de los biomarcadores se expresa diferencialmente (es decir, en ensayos de biomarcadores posteriores, el nivel de expresión en el individuo se aleja de un nivel de expresión «normal») durante el transcurso del tratamiento de CPNM puede indicar que el CPNM está progresando y por lo tanto indica que el tratamiento es ineficaz, mientras que una reducción en la expresión diferencial de uno o más de los biomarcadores durante el transcurso del tratamiento de CPNM puede ser indicativa de la remisión de CPNM y por lo tanto indica que el tratamiento está funcionando con éxito. Adicionalmente, un aumento o una reducción en la expresión diferencial de uno o más de los biomarcadores después de que un individuo se ha curado aparentemente de CPNM puede ser indicativo de la reaparición de CPNM. En una situación como esta, por ejemplo, el individuo puede reiniciar la terapia (o el régimen terapéutico modificado tal como para aumentar la cantidad y/o frecuencia de dosificación, si el individuo ha mantenido la terapia) en un estadio más temprano que si la reaparición de CPNM no se detectó hasta más tarde. Además, un nivel de expresión diferencial de uno o más de los biomarcadores en un individuo puede ser predictivo de la respuesta del individuo a un agente terapéutico particular. Para supervisar la reaparición o progresión de CPNM, los cambios en los niveles de expresión de biomarcadores pueden indicar la necesidad de repetir la captura de imágenes (por ejemplo, repetir la exploración de TC), tal como para determinar la actividad de CPNM o para determinar la necesidad de cambios en el tratamiento.

La detección de cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento puede ser particularmente útil después de, o junto con, tratamiento de CPNM, tal como para evaluar el éxito del tratamiento o para supervisar la remisión, reaparición y/o progresión (incluyendo metástasis) de CPNM después del tratamiento. El tratamiento de CPNM puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico al individuo, la realización de cirugía (por ejemplo, resección quirúrgica de al menos una parte de un tumor de CPNM o retirada de CPNM y tejido circundante), la administración de radioterapia o cualquier otro tipo de tratamiento de CPNM usado en la técnica, y cualquier combinación de estos tratamientos. El tratamiento de cáncer de pulmón puede incluir, por ejemplo, la administración de un agente terapéutico al individuo, la realización de cirugía (por ejemplo, resección quirúrgica de al menos una parte de un tumor de pulmón), la administración de radioterapia o cualquier otro tipo de tratamiento de CPNM usado en la técnica, y cualquier combinación de estos tratamientos. Por ejemplo, las moléculas de ARNip son moléculas de ARN bicatenarias sintéticas que inhiben la expresión génica y pueden actuar como productos terapéuticos de cáncer de pulmón dirigidos. Por ejemplo, cualquiera de los biomarcadores puede detectarse al menos una vez después del tratamiento o puede detectarse múltiples veces después del tratamiento (tal como a intervalos periódicos) o puede detectarse tanto antes como después del tratamiento. Los niveles de expresión diferencial de cualquiera de los biomarcadores en un individuo a lo largo del tiempo pueden ser indicativos de progresión, remisión o reaparición de CPNM, cuyos ejemplos incluyen cualquiera de los siguientes: un aumento o una reducción en el nivel de expresión de los biomarcadores después del tratamiento en comparación con el nivel de expresión del biomarcador antes del tratamiento; un aumento o una reducción en el nivel de expresión del biomarcador en un punto temporal posterior después del tratamiento en comparación con el nivel de expresión del biomarcador en un punto temporal más temprano después del tratamiento; y un nivel de expresión diferencial del biomarcador en un único punto temporal después del tratamiento en comparación con niveles normales del biomarcador.

Como un ejemplo específico, los niveles de biomarcadores para cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento pueden determinarse en muestras de suero o plasma precirugía y postcirugía (por ejemplo, 2-16 semanas después de la cirugía). Un aumento en el nivel o los niveles de expresión de biomarcadores en la muestra postcirugía en comparación con la muestra precirugía puede indicar la progresión de CPNM (por ejemplo, cirugía sin éxito), mientras que una reducción en el nivel o los niveles de expresión de biomarcadores en la muestra postcirugía en comparación con la muestra precirugía puede indicar regresión de CPNM (por ejemplo, la cirugía retiró con éxito el tumor pulmonar). Pueden llevarse a cabo análisis similares de los niveles de biomarcadores antes y después de otras formas de tratamiento, tal como antes y después de la radioterapia o administración de un agente terapéutico o una vacuna contra el cáncer.

Además de ensayar los niveles de biomarcadores como un ensayo de diagnóstico independiente, los niveles de biomarcadores también pueden realizarse junto con la determinación de SNP u otras lesiones genéticas o variabilidad que son indicativos de aumento de riesgo de susceptibilidad de enfermedad. (Véase, por ejemplo, Amos *et al.*, *Nature Genetics* 40, 616-622 (2009)).

Además de ensayar los niveles de biomarcadores como un ensayo de diagnóstico independiente, los niveles de biomarcadores también pueden realizarse junto con exploración radiológica, tal como exploración de TC. Por ejemplo, los biomarcadores pueden facilitar la justificación médica y económica para implementar la exploración de TC, tal como para explorar grandes poblaciones asintomáticas en riesgo de CPNM (por ejemplo, fumadores). Por ejemplo, podría usarse un ensayo «pre TC» de los niveles de biomarcadores para estratificar individuos de alto riesgo para exploración de TC, tal como para identificar los que tienen mayor riesgo de CPNM basándose en sus niveles de biomarcadores y que deberían priorizarse para exploración de TC. Si se implementa un ensayo de TC, pueden medirse los niveles de biomarcadores (por ejemplo, como se determina mediante un ensayo de aptámeros de muestras de suero o plasma) de uno o más biomarcadores y la puntuación de diagnóstico podría evaluarse junto

con información biomédica adicional (por ejemplo, parámetros tumorales determinados mediante ensayo de TC) para potenciar el valor predictivo positivo (VPP) con respecto a TC o ensayo de biomarcadores solamente. Un panel de aptámeros «post TC» para determinar niveles de biomarcadores puede usarse para determinar la probabilidad de que un nódulo pulmonar observado por TC (u otra modalidad de captura de imágenes) sea maligno o benigno.

5 La detección de cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento puede ser útil para ensayos post TC. Por ejemplo, los ensayos de biomarcadores pueden eliminar o reducir un número significativo de ensayos de falsos positivos con respecto a TC solo. Además, los ensayos de biomarcadores pueden facilitar el tratamiento de  
10 pacientes. A modo de ejemplo, si un nódulo de pulmón es de menos de 5 mm de tamaño, los resultados de ensayos de biomarcadores pueden hacer avanzar a los pacientes desde «observación y espera» a biopsia en un momento más temprano; si un nódulo de pulmón es de 5-9 mm, los ensayos de biomarcadores pueden eliminar el uso de una biopsia o toracotomía en exploraciones de faso positivo; y si un nódulo de pulmón es de más de 10 mm, los ensayos de biomarcadores pueden eliminar la cirugía para una subpoblación de estos pacientes con nódulos benignos. La eliminación de la necesidad de biopsia en algunos pacientes basándose en ensayos de biomarcadores sería  
15 beneficiosa porque hay morbilidad significativa asociada con biopsia de nódulos y dificultad en la obtención de tejido de nódulos dependiendo de la localización del nódulo. De forma similar, la eliminación de la necesidad de cirugía en algunos pacientes, tales como aquellos cuyos nódulos son de hecho benignos, evitaría riesgos y costes innecesarios asociados con cirugía.

20 Además de ensayar niveles de biomarcadores junto con exploración radiológica en individuos de alto riesgo (por ejemplo, evaluando niveles de biomarcadores junto con el tamaño u otras características de un nódulo o masa de pulmón observado en una exploración de captura de imágenes), también puede evaluarse información con respecto a los biomarcadores evaluados junto con otros tipos de datos, particularmente datos que indican el riesgo de un individuo de CPNM (por ejemplo, historial clínico del paciente, historial de exposición ocupacional, síntomas, historial  
25 familiar de cáncer, factores de riesgo tales como si el individuo era o no fumador y/o el estado de otros biomarcadores, etc.). Estos diversos datos pueden evaluarse por métodos automáticos, tales como un programa/software informático, que puede incorporarse en un ordenador u otro aparato/dispositivo.

30 También puede usarse cualquiera de los biomarcadores descritos en ensayos de captura de imágenes. Por ejemplo, un agente de captura de imágenes puede acoplarse a cualquiera de los biomarcadores descritos, que pueden usarse para ayudar en el diagnóstico de CPNM, para supervisar la progresión/remisión de enfermedad o metástasis, para supervisar la reaparición de enfermedad o para supervisar la respuesta a terapia, entre otros usos.

### 35 **Detección y determinación de biomarcadores y valores de biomarcadores**

Un valor de biomarcador para los biomarcadores descritos en el presente documento puede detectarse usando cualquiera de diversos métodos analíticos conocidos. En una realización, un valor de biomarcador se detecta usando un reactivo de captura. Como se usa en el presente documento, un «agente de captura» o «reactivo de captura» se refiere a una molécula que es capaz de unirse específicamente con un biomarcador. En diversas realizaciones, el  
40 reactivo de captura puede exponerse al biomarcador en solución o puede exponerse al biomarcador mientras que el reactivo de captura se inmoviliza en un soporte sólido. En otras realizaciones, el reactivo de captura contiene un elemento que es reactivo con un elemento secundario en un soporte sólido. En estas realizaciones, el reactivo de captura puede exponerse al biomarcador en solución, y después el elemento en el reactivo de captura puede usarse junto con el elemento secundario en el soporte sólido para inmovilizar el biomarcador en el soporte sólido. El reactivo de captura se selecciona basándose en el tipo de análisis para realizar. Los reactivos de captura incluyen, pero sin limitación, aptámeros, anticuerpos, antígenos, adnectinas, anquirinas, otros miméticos de anticuerpos y otros  
45 armazones proteicos, autoanticuerpos, quimeras, moléculas pequeñas, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento de anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fv monocatenario, un ácido nucleico, una lectina, un receptor de unión a ligando, anticuerpos, nanocuerpos, polímeros impresos, avímeros, peptidomiméticos, un receptor de hormona, un receptor de citocina y receptores sintéticos, y modificaciones y fragmentos de estos.

En algunas realizaciones, un valor de biomarcador se detecta usando un complejo de biomarcador/reactivo captura.

55 En otras realizaciones, el valor de biomarcador se obtiene del complejo de biomarcador/reactivo de captura y se detecta indirectamente, tal como, por ejemplo, como resultado de una reacción que es posterior a la interacción de biomarcador/reactivo de captura, pero depende de la formación del complejo de biomarcador/reactivo de captura.

En algunas realizaciones, el valor de biomarcador se detecta directamente del biomarcador en una muestra biológica.

60 En una realización, los biomarcadores se detectan usando un formato múltiple que permite la detección simultánea de dos o más biomarcadores en una muestra biológica. En una realización del formato múltiple, los reactivos de captura se inmovilizan, directa o indirectamente, de forma covalente o no covalente, en localizaciones discretas en un soporte sólido. En otra realización, un formato múltiple usa soportes sólidos discretos en los que cada soporte  
65 sólido tiene un reactivo de captura único asociado con ese soporte sólido, tal como, por ejemplo puntos cuánticos. En otra realización, se usa un dispositivo individual para la detección de cada uno de múltiples biomarcadores para

detectar en una muestra biológica. Pueden configurarse dispositivos individuales para permitir que cada biomarcador en la muestra biológica se procese simultáneamente. Por ejemplo, puede usarse una placa de microtitulación de modo que cada pocillo en la placa se use para analizar de forma única uno de múltiples biomarcadores para detectar en una muestra biológica.

5 En una o más de las realizaciones anteriores, puede usarse un marcador fluorescente para marcar un componente del complejo de biomarcador/captura para permitir la detección del valor de biomarcador. En diversas realizaciones, el marcador fluorescente puede conjugarse con un reactivo de captura específico para cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento usando técnicas conocidas, y el marcador fluorescente puede usarse después para detectar el valor de biomarcador correspondiente. Los marcadores fluorescentes adecuados incluyen quelados de tierras raras, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, alofococianina, PBXL-3, Qdot 605, Lisamina, ficoeritrina, Texas Red y otros de dichos compuestos.

15 En una realización, el marcador fluorescente es una molécula colorante fluorescente. En algunas realizaciones, la molécula colorante fluorescente incluye al menos un sistema anular de indolio sustituido en el que el sustituyente en el carbono 3 del anillo de indolio contiene un grupo químicamente reactivo o una sustancia conjugada. En algunas realizaciones, la molécula colorante incluye una molécula de AlexaFluor, tal como, por ejemplo, AlexaFluor 488, AlexaFluor 532, AlexaFluor 647, AlexaFluor 680 o AlexaFluor 700. En otras realizaciones, la molécula colorante incluye un primer tipo y un segundo tipo de molécula colorante, tal como, por ejemplo, dos moléculas de AlexaFluor diferentes. En otras realizaciones, la molécula colorante incluye un primer tipo y un segundo tipo de molécula colorante, y las dos moléculas colorantes tienen diferentes espectros de emisión.

25 La fluorescencia puede medirse con diversas instrumentaciones compatibles con una amplia serie de formatos de ensayo. Por ejemplo, se han diseñado espectrofluorímetros para analizar placas de microtitulación, portaobjetos de microscopio, matrices impresas, cubetas, etc. Véase Principles of Fluorescence Spectroscopy, por J. R. Lakowicz, Springer Science + Business Media, Inc., 2004. Véase Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications; Philip E. Stanley y Larry J. Kricka editores, World Scientific Publishing Company, enero de 2002.

30 En una o más de las realizaciones anteriores, puede usarse un marcador de quimioluminiscencia para marcar un componente del complejo de biomarcador/captura para permitir la detección de un valor de biomarcador. Los materiales quimioluminiscentes adecuados incluyen cualquiera de cloruro de oxalilo, Rodamina 6G, Ru(bipi)<sub>3</sub><sup>2+</sup>, TMAE (tetraquis(dimetilamino)etileno), Pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno), Lucigenina, peroxioxalatos, oxalatos de arilo, ésteres de acridinio, dioxetanos y otros.

35 En otras realizaciones más, el método de detección incluye una combinación de enzima/sustrato que genera una señal detectable que corresponde al valor de biomarcador. En general, la enzima cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que puede medirse usando diversas técnicas, incluyendo espectrofotometría, fluorescencia y quimioluminiscencia. Las enzimas adecuadas incluyen, por ejemplo, luciferasas, luciferina, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa de rábano picante (HRPO), fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, uricasa, xantina oxidasa, lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares.

45 En otras realizaciones más, el método de detección puede ser una combinación de fluorescencia, quimioluminiscencia, radionúclido o combinaciones de enzima/sustrato que generan una señal medible. La señalización multimodal podría tener características únicas y ventajosas en formatos de ensayo de biomarcadores.

Más específicamente, los valores de biomarcadores para los biomarcadores descritos en el presente documento pueden detectarse usando métodos analíticos conocidos incluyendo, ensayos de aptámeros sencillos, ensayos de aptámeros múltiples, inmunoensayos sencillos o múltiples, perfiles de expresión de ARNm, perfiles de expresión de miARN, análisis de espectrometría de masas, métodos histológicos/citológicos, etc. como se detalla posteriormente.

#### **Determinación de valores de biomarcadores usando ensayos basados en aptámeros**

55 Los ensayos dirigidos a la detección y cuantificación de moléculas fisiológicamente significativas en muestras biológicas y otras muestras son herramientas importantes en la investigación científica y el campo de los cuidados sanitarios. Una clase de dichos ensayos implica el uso de una micromatriz que incluye uno o más aptámeros inmovilizados en un soporte sólido. Los aptámeros son capaces cada uno de unirse con una molécula diana de una manera altamente específica y con afinidad muy alta. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.475.096 titulada «Nucleic Acid Ligands»; véase también, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 6.242.246, patente de los Estados Unidos n.º 6.458.543 y patente de los Estados Unidos n.º 6.503.715, cada una de las cuales se titula «Nucleic Acid Ligand Diagnostic Biochip». Una vez que la micromatriz se pone contacto con una muestra, los aptámeros se unen con sus moléculas diana respectivas presentes en la muestra y de este modo permiten una determinación de un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador.

65 Como se usa en el presente documento, un «aptámero» se refiere a un ácido nucleico que tiene una afinidad de unión específica por una molécula diana. Se reconoce que las interacciones de afinidad son una cuestión de grado;

sin embargo, en este contexto, la «afinidad de unión específica» de un aptámero por su diana significa que el aptámero se une a su diana en general con un grado mucho más alto de afinidad que si se une a otros componentes en una muestra de ensayo. Un «aptámero» es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos, incluyendo cualquier número de nucleótidos modificados químicamente. «Aptámeros» se refiere a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo o diferente número de nucleótidos. Los aptámeros puede ser ADN o ARN o ácidos nucleicos modificados químicamente y pueden ser monocatenarios, bicatenarios o contener regiones bicatenarias, y pueden incluir estructuras de mayor orden. Un aptámero también puede ser un fotoaptámero, donde se incluye un grupo funcional fotorreactivo o químicamente reactivo en el aptámero para permitir que se una covalentemente con su diana correspondiente. Cualquiera de los métodos de aptámeros desvelados en el presente documento puede incluir el uso de dos o más aptámeros que se unen específicamente con la misma molécula diana. Como se describe adicionalmente a continuación, un aptámero puede incluir un marcador. Si un aptámero incluye un marcador, no es necesario que todas las copias del aptámero tengan el mismo marcador. Además, si diferentes aptámeros incluyen cada uno un marcador, estos aptámeros diferentes pueden tener el mismo marcador o un marcador diferente.

Un aptámero puede identificarse usando cualquier método conocido, incluyendo el proceso SELEX. Una vez identificado, un aptámero puede prepararse o sintetizarse de acuerdo con cualquier método conocido, incluyendo métodos sintéticos químicos y métodos sintéticos enzimáticos.

Como se usa en el presente documento, un «SOMAmers» o aptámero modificado de tasa de disociación lenta se refiere a un aptámero que tiene características de tasa de disociación mejorada. Se pueden generar SOMAmers usando los métodos SELEX mejorados descritos en la publicación de los Estados Unidos n.º 2009/0004667, titulada «Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates».

Las expresiones "SELEX" y "proceso SELEX" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse en general a una combinación de (1) la selección de aptámeros que interactúan con una molécula diana de una forma deseable, por ejemplo, unión con alta afinidad a una proteína, con (2) la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. El proceso SELEX se puede utilizar para identificar aptámeros con alta afinidad por una diana o un biomarcador específico.

En general, SELEX incluye preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, unir la mezcla candidata a la molécula diana deseada para formar un complejo de afinidad, separar los complejos de afinidad de los ácidos nucleicos candidatos no unidos, separar y aislar el ácido nucleico del complejo de afinidad, purificar el ácido nucleico e identificar una secuencia de aptámero específica. El proceso puede incluir múltiples ciclos para perfeccionar adicionalmente la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir etapas de amplificación en uno o más puntos en el proceso. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 5.475.096, titulada «Nucleic Acid Ligands». El proceso SELEX se puede utilizar para generar un aptámero que se une covalentemente a su diana así como un aptámero que se une no covalentemente a su diana. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.705.337 titulada «Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX.»

El proceso SELEX se puede utilizar para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas en el aptámero, tales como, por ejemplo, características de administración mejoradas o estabilidad *in vivo* mejorada. Los ejemplos de dichas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de base y/o ribosa y/o fosfato. Se describen aptámeros identificados con el proceso SELEX que contienen nucleótidos modificados en la patente de los Estados Unidos n.º 5.660.985, titulada «High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides», que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos modificados químicamente en las posiciones 5' y 2' de pirimidinas. La patente de los Estados Unidos n.º 5.580.737, véase anteriormente, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro (2'F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). Véase también, la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2009/0098549, titulada «SELEX and PHOTOSELEX», que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades químicas y físicas expandidas y su uso en SELEX y photoSELEX.

También puede utilizarse SELEX para identificar aptámeros que tienen características de tasa de disociación deseables. Véase la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2009/0004667, titulada «Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates», que describe métodos SELEX mejorados para generar aptámeros que pueden unirse a moléculas diana. Se describen métodos para producir aptámeros y fotoaptámeros que tienen tasas más lentas de disociación de sus respectivas moléculas diana. Los métodos implican poner en contacto la mezcla candidata con la molécula diana, permitir que se produzca la formación de complejos ácido nucleico-diana y realizar un proceso de enriquecimiento de tasa de disociación lenta en donde los complejos ácido nucleico-diana con tasas de disociación rápidas se disocian y no se vuelvan a formar, mientras que los complejos con tasa de disociación lenta permanecen intactos. Adicionalmente, los métodos incluyen el uso de nucleótidos modificados en la producción de mezclas de ácidos nucleicos candidatos para generar aptámeros con rendimiento de tasa de disociación mejorado.

- Una variación de este ensayo emplea aptámeros que incluyen grupos funcionales fotorreactivos que permiten que los aptámeros se unan covalentemente o «fotorreticulen» con sus moléculas diana. Véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos n.º 6.544.776 titulada «Nucleic Acid Ligands Diagnostic Biochip». Estos aptámeros fotorreactivos también se denominan fotoaptámeros. Véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 5.763.177, patente de los Estados Unidos n.º 6.001.577 y patente de los Estados Unidos n.º 6.291.184, cada una de las cuales se titula «Systematic Evolution of Nucleic Acid Ligands by Exponential Enrichment: Photoselection of Nucleic Acid Ligands and Solution SELEX»; véase también, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 6.458.539, titulada «Photoselection of Nucleic Acid Ligands». Después que la micromatriz ha entrado en contacto con la muestra y los fotoaptámeros han tenido la oportunidad de unirse con sus moléculas diana, los fotoaptámeros se fotoactivan y el soporte sólido se lava para retirar cualquier molécula unida de forma no específica. Pueden usarse condiciones de lavado rigurosas, ya que las moléculas diana que se unen a los fotoaptámeros en general no se retiran, debido a los enlaces covalentes creados por el grupo o los grupos funcionales en los fotoaptámeros. De esta manera, el ensayo permite la detección de un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador en la muestra de ensayo.
- En ambos de estos formatos de ensayo, los aptámeros se inmovilizan en el soporte sólido antes de ponerse en contacto con la muestra. En determinadas circunstancias, sin embargo, la inmovilización de los aptámeros antes del contacto con la muestra puede no proporcionar un ensayo óptimo. Por ejemplo, la preinmovilización de los aptámeros puede dar como resultado una mezcla ineficaz de los aptámeros con las moléculas diana en la superficie del soporte sólido, lo que conduce quizás a tiempos de reacción largos y, por lo tanto, periodos de incubación prolongados para permitir la unión eficaz de los aptámeros con sus moléculas diana. Además, cuando se emplean fotoaptámeros en el ensayo y dependiendo del material utilizado como un soporte sólido, el soporte sólido tiende a dispersar o absorber la luz usada para efectuar la formación de enlaces covalentes entre los fotoaptámeros y sus moléculas diana. Además, dependiendo del método empleado, la detección de moléculas diana unidas a sus aptámeros puede estar sometida a imprecisión, ya que la superficie del soporte sólido también puede estar expuesta a y ser afectada por cualquier agente de marcaje que se use. Finalmente, la inmovilización de los aptámeros en el soporte sólido implica en general una etapa de preparación de aptámeros (es decir, la inmovilización) antes de exposición de los aptámeros a la muestra, y esta etapa de preparación puede afectar a la actividad o funcionalidad de los aptámeros.
- También se han descrito ensayos de aptámeros que permiten que un aptámero capture su diana en solución y después emplean etapas de separación que se diseñan para retirar componentes específicos de la mezcla de aptámero-diana antes de la detección (véase la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos 2009/0042206, titulada «Multiplexed Analyses of Test Samples»). Los métodos de ensayo de aptámeros descritos permiten la detección y cuantificación de una diana distinta de ácido nucleico (por ejemplo, una diana proteica) en una muestra de ensayo detectando y cuantificando un ácido nucleico (es decir, un aptámero). Los métodos descritos crean un sustituto de ácido nucleico (es decir, el aptámero) para detectar y cuantificar una diana distinta de ácido nucleico, permitiendo de este modo que se aplique la amplia diversidad de tecnologías de ácido nucleico, incluyendo amplificación, a una amplia serie de dianas deseadas, incluyendo dianas proteicas.
- Pueden construirse aptámeros para facilitar la separación de los componentes de ensayo de un complejo de biomarcador de aptámero (o complejo covalente de biomarcador de fotoaptámero) y permitir el aislamiento del aptámero para detección y/o cuantificación. En una realización, estas construcciones pueden incluir un elemento escindible o liberable en la secuencia de aptámero. En otras realizaciones, puede introducirse funcionalidad adicional en el aptámero, por ejemplo, un componente marcado o detectable, un componente espaciador o un marcador de unión específica o elemento de inmovilización. Por ejemplo, el aptámero puede incluir un marcador conectado con el aptámero mediante un resto escindible, un marcador, un componente espaciador que separa el marcador y el resto escindible. En una realización, un elemento escindible es un enlazador fotoescindible. El enlazador fotoescindible puede unirse con un resto de biotina y una sección espaciadora, puede incluir un grupo de NHS para derivatización de aminas, y puede usarse para introducir un grupo de biotina en un aptámero, permitiendo de este modo la liberación del aptámero más tarde en el método de ensayo.
- Los ensayos homogéneos, realizados con todos los componentes de ensayo en solución, no requieren separación de muestra y reactivos antes de la detección de señal. Estos métodos son rápidos y fáciles de usar. Estos métodos generan señal basándose en un reactivo de captura o unión molecular que reacciona con su diana específica. Para CPNM, los reactivos de captura molecular serían un aptámero o un anticuerpo o similares y la diana específica sería un biomarcador de CPNM de la Tabla 1.
- En una realización, un método para generación de señal aprovecha el cambio de señal de anisotropía debido a la interacción de un reactivo de captura marcado con fluoróforo con su diana de biomarcador específica. Cuando la captura marcada reacciona con su diana, el peso molecular aumentado provoca que el movimiento rotacional del fluoróforo unido al complejo se vuelva mucho más lento cambiando el valor de anisotropía. Supervisando el cambio de anisotropía, pueden usarse acontecimientos de unión para medir cuantitativamente los biomarcadores en soluciones. Otros métodos incluyen ensayos de polarización de fluorescencia, métodos de baliza molecular, interrupción de fluorescencia resuelta en el tiempo, quimioluminiscencia, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, y similares.

Un ensayo de aptámero basado en solución a modo de ejemplo que puede usarse para detectar un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador en una muestra biológica incluye lo siguiente: (a) preparar una mezcla poniendo en contacto la muestra biológica con un aptámero que incluye un primer marcador y tiene una afinidad específica por el biomarcador, en donde se forma un complejo de afinidad de aptámero cuando el biomarcador está presente en la muestra; (b) exponer la mezcla a un primer soporte sólido que incluye un primer elemento de captura y permitir que el primer marcador se asocie con el primer elemento de captura; (c) retirar cualquier componente de la mezcla no asociado con el primer soporte sólido; (d) unir un segundo marcador con el componente de biomarcador del complejo de afinidad de aptámero; (e) liberar el complejo de afinidad de aptámero del primer soporte sólido; (f) exponer el complejo de afinidad de aptámero liberado a un segundo soporte sólido que incluye un segundo elemento de captura y permitir que el segundo marcador se asocie con el segundo elemento de captura; (g) retirar cualquier aptámero no en complejo de la mezcla separando el aptámero no en complejo del complejo de afinidad de aptámero; (h) eluir el aptámero del soporte sólido; y (i) detectar el biomarcador detectando el componente de aptámero del complejo de afinidad de aptámero.

Cualquier medio conocido en la técnica puede usarse para detectar un valor de biomarcador detectando el componente de aptámero de un complejo de afinidad de aptámero. Pueden usarse varios métodos de detección diferentes para detectar el componente de aptámero de un complejo de afinidad, tales como, por ejemplo, ensayos de hibridación, espectroscopia de masas o QPCR. En algunas realizaciones, pueden usarse métodos de secuenciación de ácidos nucleicos para detectar el componente de aptámero de un complejo de afinidad de aptámero y de este modo detectar un valor de biomarcador. Brevemente, una muestra de ensayo puede someterse a cualquier tipo de método de secuenciación de ácidos nucleicos para identificar y cuantificar la secuencia o las secuencias de uno o más aptámeros presentes en la muestra de ensayo. En algunas realizaciones, la secuencia incluye la molécula de aptámero completa o cualquier parte de la molécula que puede usarse para identificar de forma única la molécula. En otras realizaciones, la secuenciación de identificación es una secuencia específica añadida al aptámero; dichas secuencias se denominan con frecuencia «marcadores», «códigos de barras» o «códigos postales». En algunas realizaciones, el método de secuenciación incluye etapas enzimáticas para amplificar la secuencia de aptámero o convertir cualquier tipo de ácido nucleico, incluyendo ARN y ADN que contienen modificaciones químicas en cualquier posición, en cualquier otro tipo de ácido nucleico apropiado para secuenciación.

En algunas realizaciones, el método de secuenciación incluye una o más etapas de clonación. En otras realizaciones el método de secuenciación incluye un método de secuenciación directo sin clonación.

En algunas realizaciones, el método de secuenciación incluye un enfoque dirigido con cebadores específicos que se dirigen a uno o más aptámeros en la muestra de ensayo. En otras realizaciones, el método de secuenciación incluye un enfoque aleatorio que se dirige a todos los aptámeros en la muestra de ensayo.

En algunas realizaciones, el método de secuenciación incluye etapas enzimáticas para amplificar la molécula diana para secuenciación. En otras realizaciones, el método de secuenciación secuencia directamente moléculas individuales. Un método basado en secuenciación de ácidos nucleicos a modo de ejemplo que puede usarse para detectar un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador en una muestra biológica incluye lo siguiente: (a) convertir una mezcla de aptámeros que contienen nucleótidos modificados químicamente en ácidos nucleicos no modificados con una etapa enzimática; (b) secuenciar de forma aleatoria los ácidos nucleicos no modificados resultantes con una plataforma de secuenciación en paralelo masiva tal como, por ejemplo, el sistema de secuenciación 454 (454 Life Sciences/Roche), el sistema de secuenciación Illumina (Illumina), el sistema de secuenciación ABI SOLiD (Applied Biosystems), el secuenciador de moléculas individuales HeliScope (Helicos Biosciences), o el sistema de secuenciación de moléculas individuales en tiempo real Pacific Biosciences (Pacific BioSciences) o el sistema de secuenciación Polonator G (Dover Systems); y (c) identificar y cuantificar los aptámeros presentes en la mezcla por secuencia específica y recuento de secuencia.

#### **Determinación de valores de biomarcadores usando inmunoensayos**

Los métodos de inmunoensayo se basan en la reacción de un anticuerpo a su diana o analito correspondiente y pueden detectar el analito en una muestra dependiendo del formato de ensayo específico. Para mejorar la especificidad y sensibilidad de un método de ensayo basado en la inmunorreactividad, se usan con frecuencia anticuerpos monoclonales debido a su reconocimiento de epítopos específico. También se han usado con éxito anticuerpos policlonales en diversos inmunoensayos debido a su afinidad aumentada por la diana en comparación con anticuerpos monoclonales. Se han diseñado inmunoensayos para su uso con una amplia serie de matrices de muestras biológicas. Se han diseñado formatos de inmunoensayo para proporcionar resultados cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos.

Se generan resultados cuantitativos mediante el uso de una curva patrón creada con concentraciones conocidas del analito específico para detectar. La respuesta o señal de una muestra desconocida se representa en la curva patrón y se establece una cantidad o un valor correspondiente a la diana en la muestra desconocida.

Se han diseñado numerosos formatos de inmunoensayo. ELISA o EIA pueden ser cuantitativos para la detección de

un analito. Este método se basa en la unión de un marcador con el analito o el anticuerpo y el componente de marcador incluye, bien directa o bien indirectamente, una enzima. Los ensayos de ELISA pueden formatearse para detección directa, indirecta, competitiva o de tipo sándwich del analito. Otros métodos se basan en marcadores tales como, por ejemplo, radioisótopos (1125) o fluorescencia. Las técnicas adicionales incluyen, por ejemplo,

5 algutinación, nefelometría, turbidimetría, transferencia de Western, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, citometría de flujo, serología, ensayo de Luminex y otros (véase *ImmunoAssay: A Practical Guide*, editado por Brian Law, publicado por Taylor & Francis, Ltd., edición de 2005).

Los formatos de ensayo a modo de ejemplo incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo, fluorescentes, quimioluminiscencia y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) o inmunoensayos de FRET resuelta en el tiempo (TR-FRET). Los ejemplos de procedimientos para detectar biomarcadores incluyen inmunoprecipitación de biomarcadores seguida de métodos cuantitativos que permiten diferenciación del tamaño y el nivel de péptido, tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar, electrocromatografía plana y similares.

Los métodos de detección y/o cuantificación de un marcador detectable o material generador de señal dependen de la naturaleza del marcador. Los productos de reacciones catalizadas por enzimas apropiadas (donde el marcador detectable es una enzima; véase anteriormente) pueden ser, sin limitación, fluorescentes, luminiscentes o radiactivos o pueden absorber luz visible o ultravioleta. Los ejemplos de detectores adecuados para detectar dichos marcadores detectables incluyen, sin limitación, película radiográfica, contadores de radiactividad, contadores de centelleo, espectrofotómetros, colorímetros, fluorómetros, luminómetros y densitómetros.

Cualquiera de los métodos para detección puede realizarse en cualquier formato que permita cualquier preparación, procesamiento y análisis adecuado de las reacciones. Esto puede ser, por ejemplo, en placas de ensayo multipocillo (por ejemplo, 96 pocillos o 384 pocillos) o usando cualquier matriz o micromatriz adecuada. Pueden realizarse soluciones de reserva para diversos agentes manualmente o de forma robótica, y todo el pipeteo, la dilución, el mezclado, la distribución, el lavado, la incubación, la lectura de muestras, la recopilación de datos y el análisis posteriores pueden realizarse de forma robótica usando software de análisis disponible en el mercado, robótica e instrumentación de detección capaz de detectar un marcador detectable.

### **Determinación de valores de biomarcadores usando perfiles de expresión génica**

La medición de ARNm en una muestra biológica puede usarse como un sustituto para la detección del nivel de la proteína correspondiente en la muestra biológica. Por lo tanto, cualquiera de los biomarcadores o paneles de biomarcadores descritos en el presente documento pueden también detectarse detectando el ARN apropiado.

Los niveles de expresión de ARNm se miden por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (RT-PCR seguido de qPCR). Se usa RT-PCR para crear un ADNc a partir del ARNm. El ADNc puede usarse en un ensayo de qPCR para producir fluorescencia a medida que el proceso de amplificación de ADN progresa. En comparación con una curva patrón, qPCR puede producir una medición absoluta tal como número de copias de ARNm por célula. Se han usado transferencias de Northern, micromatrices, ensayos de Invader y RT-PCR combinada con electroforesis capilar todos para medir los niveles de expresión de ARNm en una muestra. Véase *Gene Expression Profiling: Methods and Protocols*, Richard A. Shinkets, editor, Humana Press, 2004.

Las moléculas de miARN son ARN pequeños que no son codificantes pero pueden regular la expresión génica. También puede usarse cualquiera de los métodos adecuados para la medición de niveles de expresión de ARNm para el ARNm correspondiente. Recientemente muchos laboratorios han investigado el uso de miARN como biomarcadores para enfermedad. Muchas enfermedades implican regulación de la transcripción generalizada y no es sorprendente que miARN pudieran encontrar un papel como biomarcadores. La relación entre las concentraciones de miARN y la enfermedad está con frecuencia aun menos clara que las relaciones entre los niveles de proteínas y la enfermedad, pero el valor de los biomarcadores de miARN podría ser sustancial. Por supuesto, como con cualquier ARN expresado diferencialmente durante la enfermedad, los problemas a los que se enfrenta el desarrollo de un producto de diagnóstico *in vitro* incluirán el requisito de que los miARN sobrevivan en la célula enferma y se extraigan fácilmente para análisis o que los miARN se liberen a sangre u otras matrices donde deben sobrevivir el suficiente tiempo para que se midan. Los biomarcadores proteicos tienen requisitos similares, aunque muchos biomarcadores proteicos potenciales se secretan intencionadamente en el sitio de patología y función, durante la enfermedad, de una manera paracrina. Muchos biomarcadores proteicos potenciales se diseñan para actuar fuera de las células dentro de las cuales se sintetizan esas proteínas.

### **Detección de biomarcadores usando tecnologías de captura de imágenes moleculares *in vivo***

También puede usarse cualquiera de los biomarcadores descritos (véase Tabla 1) en ensayos de captura de imágenes moleculares. Por ejemplo, un agente de captura de imágenes puede acoplarse a cualquiera de los biomarcadores descritos, que pueden usarse para ayudar en el diagnóstico de CPNM, para supervisar la progresión/remisión de enfermedad o metástasis, para supervisar la reaparición de enfermedad o para supervisar la respuesta a terapia, entre otros usos.

Las tecnologías de captura de imágenes *in vivo* proporcionan métodos no invasivos para determinar el estado de una enfermedad particular en el cuerpo de un individuo. Por ejemplo, partes completas del cuerpo, o incluso el cuerpo completo, pueden verse como una imagen tridimensional, proporcionando de este modo información valiosa con respecto a morfología y estructuras en el cuerpo. Dichas tecnologías pueden combinarse con la detección de los biomarcadores descritos en el presente documento para proporcionar información con respecto al estado de cáncer, en particular el estado de CPNM, de un individuo.

El uso de tecnologías de captura de imágenes moleculares *in vivo* se está expandiendo debido a diversos avances en la tecnología. Estos avances incluyen el desarrollo de nuevos agentes de contraste o marcadores, tales como radiomarcadores y/o marcadores fluorescentes, que pueden proporcionar fuertes señales en el cuerpo; y el desarrollo de nueva tecnología de captura de imágenes potente, que puede detectar y analizar estas señales desde fuera del cuerpo, con suficiente sensibilidad y precisión para proporcionar información útil. El agente de contraste puede visualizarse en un sistema de captura de imágenes apropiado, proporcionando de este modo una imagen de la parte o las partes del cuerpo en las que se localiza el agente de contraste. El agente de contraste puede unirse con o asociarse con un reactivo de captura, tal como un aptámero o un anticuerpo, por ejemplo, y/o con un péptido o proteína, o un oligonucleótido (por ejemplo, para la detección de la expresión génica) o un complejo que contiene cualquiera de estos con una o más macromoléculas y/u otras formas en partículas.

El agente de contraste también puede presentar un átomo radiactivo que es útil en la captura de imágenes. Los átomos radiactivos adecuados incluyen tecnecio 99m o yodo 123 para estudios escintigráficos. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcadores de espín para captura de imágenes mediante resonancia magnética (IRM) tales como, por ejemplo, yodo 123 de nuevo, yodo 131, indio 111, flúor 19, carbono 13, nitrógeno 15, oxígeno 17, gadolinio, manganeso o hierro. Dichos marcadores se conocen bien en la técnica y un experto habitual en la materia podría seleccionarlos fácilmente.

Las técnicas de captura de imágenes convencionales incluyen pero sin limitación captura de imágenes por resonancia magnética, exploración por tomografía computarizada, tomografía de emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT) y similares. Para captura de imágenes *in vivo* de diagnóstico, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor importante en la selección de un agente de contraste dado, tal como un radionúclido dado y el biomarcador particular que se usa para diana (proteína, ARNm y similares). El radionúclido elegido normalmente tiene un tipo de degradación que es detectable por un tipo de instrumento dado. Además, cuando se selecciona un radionúclido para diagnóstico *in vivo*, su semivida debería ser suficientemente larga para permitir la detección en el momento de máxima captación por el tejido diana pero suficientemente corta para que la radiación deletérea del hospedador se minimice.

Las técnicas de captura de imágenes a modo de ejemplo incluyen pero sin limitación TEP y SPECT, que son técnicas de captura de imágenes en las que un radionúclido se administra sintéticamente y localmente a un individuo. La captación posterior del radioindicador se mide a lo largo del tiempo y se usa para obtener información acerca del tejido diana y el biomarcador. Debido a las emisiones de alta energía (rayos gamma) de los isótopos específicos empleados y la sensibilidad y sofisticación de los instrumentos usados para detectarlos, la distribución bidimensional de radiactividad puede inferirse desde fuera del cuerpo.

Los núclidos emisores de positrones usados habitualmente en TEP incluyen, por ejemplo, carbono 11, nitrógeno 13, oxígeno 15 y flúor 18. Los isótopos que se degradan por captura de electrones y/o emisión gamma se usan en SPECT e incluyen, por ejemplo yodo 123 y tecnecio 99m. Un método a modo de ejemplo para marcar aminoácidos con tecnecio 99m es la reducción de ion pertecnetato en presencia de un precursor quelante para formar el complejo de tecnecio 99m-precursor lábil, que, a su vez, reacciona con el grupo de unión a metal de un péptido quimiotáctico modificado de forma bifuncional para formar un conjugado de tecnecio 99m-péptido quimiotáctico.

Los anticuerpos se usan con frecuencia para dichos métodos de diagnóstico de captura de imágenes *in vivo*. La preparación y el uso de anticuerpos para diagnóstico *in vivo* se conoce bien en la técnica. Pueden inyectarse anticuerpos marcados que se unen específicamente con cualquiera de los biomarcadores en la Tabla 1 en un individuo que se sospecha que tiene un tipo de cáncer determinado (por ejemplo, CPNM), detectable según el biomarcador particular usado, para el fin de diagnosticar o evaluar el estado de enfermedad del individuo. El marcador usado se seleccionará de acuerdo con la modalidad de captura de imágenes para usar, como se ha descrito previamente. La localización del marcador permite la determinación de la propagación del cáncer. La cantidad de marcador dentro de un órgano o tejido también permite la determinación de la presencia o ausencia de cáncer en ese órgano o tejido.

De forma similar, pueden usarse aptámeros para dichos métodos de diagnóstico de captura de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, un aptámero que se usó para identificar un biomarcador particular descrito en la Tabla 1 (y por lo tanto se une específicamente con ese biomarcador particular) puede marcarse de forma apropiada e inyectarse en un individuo que se sospecha que tiene CPNM, detectable según el biomarcador particular, para el fin de diagnosticar o evaluar el estado de CPNM del individuo. El marcador usado se seleccionará de acuerdo con la modalidad de captura de imágenes para usar, como se ha descrito previamente. La localización del marcador permite la determinación de la propagación del cáncer. La cantidad de marcador dentro de un órgano o tejido también permite

la determinación de la presencia o ausencia de cáncer en ese órgano o tejido. Los agentes de captura de imágenes dirigidos a aptámeros podrían tener características únicas y ventajosas relacionadas con la penetración tisular, distribución tisular, cinética, eliminación, potencia y selectividad en comparación con otros agentes de captura de imágenes.

5 Dichas técnicas también pueden realizarse opcionalmente con oligonucleótidos marcados, por ejemplo, para detección de la expresión génica mediante captura de imágenes con oligonucleótidos antisentido. Estos métodos se usan para hibridación *in situ*, por ejemplo, con moléculas fluorescentes o radionúclidos como el marcador. Otros métodos para detección de la expresión génica incluyen, por ejemplo, detección de la actividad de un gen indicador.

10 Otro tipo general de tecnología de captura de imágenes es la captura de imágenes óptica, en la que se detectan señales fluorescentes en el sujeto mediante un dispositivo óptico que es externo al sujeto. Estas señales pueden deberse a la fluorescencia real y/o a la bioluminiscencia. Las mejoras en la sensibilidad de los dispositivos de detección óptica han aumentado la utilidad de la captura de imágenes óptica para ensayos de diagnóstico *in vivo*.

15 El uso de captura de imágenes de biomarcadores moleculares *in vivo* está aumentando, incluyendo para ensayos clínicos, por ejemplo, para medir más rápidamente la eficacia clínica en ensayos para nuevas terapias de cáncer y/o para evitar el tratamiento prolongado con un placebo para las enfermedades, tales como esclerosis múltiple, en las que dicho tratamiento prolongado puede considerarse éticamente cuestionable.

20 Para una revisión de otras técnicas, véase N. Blow, Nature Methods, 6, 465-469, 2009.

#### **Determinación de valores de biomarcadores usando métodos de histología/citología**

25 Para evaluación de CPNM, puede usarse diversas muestras tisulares en métodos histológicos o citológicos. La selección de muestras depende de la localización del tumor primario y los sitios de metástasis. Por ejemplo, pueden usarse biopsias endo y transbronquiales, aspirados con aguja fina, agujas de corte y biopsias con aguja gruesa para histología. Puede usarse lavado y cepillado bronquial, aspiración pleural, líquido pleural y esputo para la citología. Aunque aún se usa análisis citológico en el diagnóstico de CPNM, se sabe que los métodos histológicos

30 proporcionan mejor sensibilidad para la detección del cáncer. Puede usarse cualquiera de los biomarcadores identificados en el presente documento que se ha mostrado que están regulados positivamente (Tabla 1) en los individuos con CPNM para teñir una muestra de ensayo histológica con una indicación de enfermedad.

35 En una realización, se usan uno o más reactivos de captura específicos para el biomarcador o los biomarcadores correspondientes en una evaluación citológica de una muestra de células de tejido pulmonar y pueden incluir uno o más de los siguientes: recoger una muestra de células, fijar la muestra de células, deshidratar, aclarar, inmovilizar la muestra de células en un portaobjetos de microscopio, permeabilizar la muestra de células, tratar para recuperación de analito, teñir, desteñir, lavar, bloquear y hacer reaccionar con uno o más reactivos de captura en una solución tamponada. En otra realización, la muestra de células se produce a partir de un bloque de células.

40 En otra realización, se usan uno o más reactivos de captura específicos para el biomarcador o los biomarcadores correspondientes en una evaluación histológica de una muestra de tejido pulmonar y pueden incluir uno o más de los siguientes: recoger una muestra de ensayo tisular, fijar la muestra de tejido, deshidratar, aclarar, inmovilizar la muestra de tejido en un portaobjetos de microscopio, permeabilizar la muestra de tejido, tratar para recuperación de analito, teñir, desteñir, lavar, bloquear, rehidratar y hacer reaccionar con reactivo o reactivos de captura en una solución tamponada. En otra realización, la fijación y deshidratación se reemplazan con congelación.

45 En otra realización, el o los aptámeros específicos para el biomarcador o los biomarcadores correspondientes se hacen reaccionar con la muestra histológica o citológica y pueden actuar como la diana de ácido nucleico en un método de amplificación de ácido nucleico. Los métodos de amplificación de ácido nucleico adecuados incluyen, por ejemplo, PCR, replicasa q-beta, amplificación por círculo rodante, desplazamiento de cadena, amplificación dependiente de helicasa, amplificación isotérmica mediada por bucle, reacción en cadena de la ligasa y amplificación por círculo rodante asistida por restricción y circularización.

50 En una realización, el o los reactivos de captura específicos para los biomarcadores correspondientes para su uso en la evaluación histológica o citológica se mezclan en una solución tamponada que puede incluir cualquiera de los siguientes: materiales de bloqueo, competidores, detergentes, estabilizantes, ácido nucleico vehículo, materiales polianiónicos, etc.

60 Un «protocolo de citología» generalmente incluye recogida de muestras, fijación de muestras, inmovilización de muestras y tinción. La «preparación celular» puede incluir varias etapas de procesamiento después de la recogida de muestras, incluyendo el uso de uno o más aptámeros de velocidad de disociación lenta para la tinción de las células preparadas.

65 La recogida de muestras puede incluir colocar directamente la muestra en un recipiente de transporte no tratado, colocar la muestra en un recipiente de transporte que contiene algún tipo de medio o colocar la muestra

directamente en un portaobjetos (inmovilización) sin ningún tratamiento o fijación.

La inmovilización de muestras puede mejorarse aplicando una parte de la muestra de ensayo recogida a un portaobjetos de vidrio que se trata con polilisina, gelatina o un silano. Pueden prepararse portaobjetos extendiendo una capa fina y uniforme de células a lo largo del portaobjetos. Se tiene cuidado en general de minimizar la distorsión mecánica y los artefactos de secado. Las muestras de ensayo líquidas pueden procesarse en un método de bloque de células. O, como alternativa, pueden mezclarse muestras de ensayo líquidas 1:1 con la solución fijadora durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente.

Pueden prepararse bloques de células a partir de efusiones residuales, esputo, sedimentos de orina, líquidos gastrointestinales, líquidos pulmonares, raspados celulares o aspirados por aguja fina. Las células se concentran o se empaquetan por centrifugación o filtración por membrana. Se han desarrollado varios métodos para la preparación de bloques de células. Los procedimientos representativos incluyen los métodos de sedimento fijado, agar bacteriano o filtración por membrana. En el método de sedimento fijado, el sedimento celular se mezcla con un fijador como Bouins, ácido pícrico o formalina tamponada y después la mezcla se centrifuga para sedimentar las células fijadas. Se retira el sobrenadante, secando el sedimento celular tan completamente como sea posible. El sedimento se recoge y se envuelve en papel óptico y después se coloca en un casete tisular. El casete tisular se coloca en un frasco con un fijador adicional y se procesa como una muestra tisular. El método de agar es muy similar pero el sedimento se retira y se seca en una toalla de papel y después se corta por la mitad. El lado cortado se coloca en una gota de agar fundido en un portaobjeto de vidrio y después el sedimento se cubre con agar asegurando que no se formen burbujas en el agar. Se permite que el agar se endurezca y después se recorta cualquier exceso de agar. Este se coloca en un casete tisular y se completa el proceso tisular. Como alternativa, El sedimento puede suspenderse directamente en agar líquido 2 % a 65 °C y centrifugarse la muestra. Se permite que el sedimento celular de agar se solidifique durante una hora a 4 °C. El agar sólido puede retirarse del tubo de centrifuga y cortarse por la mitad. El agar se envuelve en papel de filtro y después el casete tisular. El procesamiento desde este punto en adelante es como se ha descrito anteriormente. La centrifugación puede reemplazarse en cualquiera de estos procedimientos con filtración de membrana. Cualquiera de estos procesos puede usarse para generar una «muestra de bloque de células».

Los bloques de células pueden prepararse usando resina especializada incluyendo resinas Lowicryl, LR White, LR Gold, Unicryl y MonoStep. Estas resinas tienen baja viscosidad y pueden polimerizarse a temperaturas bajas y con luz ultravioleta (UV). El proceso de inclusión se basa en el enfriamiento progresivo de la muestra durante la deshidratación, la transferencia de la muestra a la resina y la polimerización de un bloque a la temperatura baja final a la longitud de onda UV apropiada.

Las secciones de bloques de células pueden teñirse con hematoxilina-eosina para examen citomorfológico mientras que se usan secciones adicionales para el examen de marcadores específicos.

Sea el proceso citológico o histológico, la muestra puede fijarse antes del procesamiento adicional para evitar la degradación de muestras. Este proceso se denomina «fijación» y describe una amplia serie de materiales y procedimientos que pueden usarse indistintamente. El protocolo de fijación de muestras y reactivos se seleccionan mejor de forma empírica basándose en las dianas para detectar y el tipo celular/tisular para analizar. La fijación de muestras se basa en reactivos tales como etanol, polietilenglicol, metanol, formalina o isopropanol. Las muestras deberían fijarse tan pronto después de la recogida y fijación al portaobjetos como sea posible. Sin embargo, el fijador seleccionado puede introducir cambios estructurales en diversas dianas moleculares haciendo su detección posterior más difícil. Los procesos de fijación e inmovilización y su secuencia pueden modificar la apariencia de la célula y estos cambios deben ser anticipados y reconocidos por el citotecnólogo. Los fijadores pueden provocar encogimiento de determinados tipos celulares y provocar que el citoplasma parezca granular o reticular. Muchos fijadores actúan reticulando componentes celulares. Esto puede dañar o modificar epítomos específicos, generar nuevos epítomos, provocar asociaciones moleculares y reducir la permeabilidad de membrana. La fijación con formalina es uno de los enfoques citológicos/histológicos más comunes. La formalina forma enlaces de metilo entre proteínas adyacentes o dentro de proteínas. También se usa precipitación o coagulación para fijación y se usa con frecuencia etanol en este tipo de fijación. También puede usarse una combinación de reticulación y precipitación para fijación. Un proceso de fijación fuerte es mejor para conservar la información morfológica mientras que un proceso de fijación más débil es mejor para la conservación de dianas moleculares.

Un fijador representativo es etanol absoluto al 50 %, polietilenglicol (PEG) 2 mM, formaldehído 1,85 %. Las variaciones de esta formulación incluyen etanol (50 % a 95 %), metanol (20 % - 50 %) y formalina (formaldehído) solamente. Otro fijador común es PEG 1500 2 %, etanol 50 % y metanol 3 %. Los portaobjetos se colocan en el fijador durante aproximadamente 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y después se retiran y se permite que se sequen. Una vez que los portaobjetos se fijan, pueden aclararse con una solución tamponada como PBS.

Puede usarse una amplia serie de colorantes para destacar diferencialmente y contrastar o «teñir» elementos celulares, subcelulares y tisulares o estructuras morfológicas. Se usa hematoxilina para teñir los núcleos de un color azul o negro. Tanto Orange G-6 como Eosin Azure tiñen el citoplasma de la célula. Orange G tiñe células que contienen queratina y glucógeno de amarillo. Se usa eosina Y para teñir nucleolos, cilios, glóbulos rojos y células

escamosas epiteliales superficiales. Se usan cepas de Romanowsky para portaobjetos secados al aire y son útiles para potenciar el pleomorfismo y distinguir material extracelular de intracitoplasmático.

5 El proceso de tinción puede incluir un tratamiento para aumentar la permeabilidad de las células a la tinción. El tratamiento de las células con un detergente puede usarse para aumentar la permeabilidad. Para aumentar la permeabilidad celular y tisular, las muestras fijadas pueden tratarse adicionalmente con disolventes, saponinas o detergentes no iónicos. La digestión enzimática también puede mejorar la accesibilidad de dianas específicas en una muestra tisular.

10 Después de la tinción, la muestra se deshidrata usando una sucesión de lavados con alcohol con una concentración de alcohol creciente. El lavado final se realiza con xileno o un sustituto de xileno, tal como un terpeno de cítrico, que tiene un índice refractario cercano al del cubreobjetos para aplicar al portaobjetos. Esta etapa final se denomina aclaramiento. Una vez que la muestra se ha deshidratado y aclarado, se aplica un medio de montaje. El medio de montaje se selecciona para tener un índice refractario cercano al vidrio y es capaz de unir el cubreobjetos con el  
15 portaobjetos. También inhibirá el secado adicional, encogimiento o decoloración de la muestra celular.

Independientemente de las tinciones o el procesamiento usado, la evaluación final de la muestra de ensayo citológica de pulmón se realiza por algún tipo de microscopio para permitir una inspección visual de la morfología y una determinación de la presencia o ausencia del marcador. Los métodos microscópicos a modo de ejemplo  
20 incluyen campo claro, contraste de fases, fluorescencia y contraste de interferencia diferencial.

Si son necesarios ensayos secundarios en la muestra después del examen, el cubreobjetos puede retirarse y el portaobjetos desteñirse. La destinción implica usar los sistemas disolventes originales usados en la tinción del portaobjetos originalmente sin el colorante añadido y en un orden inverso al procedimiento de tinción original. La  
25 destinción también puede completarse empapando el portaobjetos en alcohol ácido hasta que las células son incoloras. Una vez que son incoloras los portaobjetos se aclaran bien en un baño de agua y se aplica el segundo procedimiento de tinción.

Además, la diferenciación molecular específica puede ser posible junto con el análisis morfológico celular mediante el uso de reactivos moleculares específicos tales como anticuerpos o sondas de ácido nucleico o aptámeros. Esto mejora la precisión de citología de diagnóstico. Puede usarse microdissección para aislar un subconjunto de células para evaluación adicional, en particular, para evaluación genética de cromosomas anómalos, expresión génica o mutaciones.  
30

35 La preparación de una muestra tisular para evaluación histológica implica fijación, deshidratación, infiltración, inclusión y sección. Los reactivos de fijación usados en histología son muy similares o idénticos a los usados en citología y tienen los mismos problemas de conservación de elementos morfológicos a costa de los moleculares tales como proteínas individuales. Puede ahorrarse tiempo si la muestra titular no se fija e hidrata sino que en su lugar se congela y después se secciona congelada. Este es un procedimiento de procesamiento más suave y puede  
40 conservar marcadores más individuales. Sin embargo, el congelamiento no es aceptable para almacenamiento a largo plazo de una muestra tisular ya que se pierde información subcelular debido a la introducción de cristales de hielo. El hielo en la muestra de tejido congelado también evita que el proceso de seccionamiento produzca un corte muy fino y por lo tanto puede perderse algo de resolución microscópica y captura de imágenes de estructuras subcelulares. Además de la fijación de formalina, se usa tetróxido de osmio para fijar y teñir fosfolípidos  
45 (membranas).

Se consigue deshidratación de tejidos con lavados sucesivos de concentración de alcohol creciente. El aclaramiento emplea un material que es miscible con alcohol y el material de inclusión e implica un proceso por etapas que comienza a alcohol:reactivo de aclaramiento 50:50 y después 100 % de agente de aclaramiento (xileno o sustituto  
50 de xileno). La infiltración implica incubar el tejido con una forma líquida del agente de inclusión (cera caliente, solución de nitrocelulosa) primero a agente de inclusión:agente de aclaramiento 50:50 y después 100 % de agente de inclusión. La inclusión se completa colocando el tejido en un molde o casete y rellenando con agente de inclusión fundido tal como cera, agar o gelatina. Se permite que el agente de inclusión se endurezca. La muestra tisular endurecida puede después colocarse en sección fina para tinción y examen posterior.  
55

Antes de la tinción, la sección tisular se desparafina y se rehidrata. Se usa xileno para desparafinar la sección, pueden usarse uno o más cambios de xileno y el tejido se rehidrata por lavados sucesivos en alcohol de concentración decreciente. Antes de la desparafinación, la sección tisular puede inmovilizarse por calor en un portaobjetos de vidrio a aproximadamente 80 °C durante aproximadamente 20 minutos.  
60

La microdissección de captura por láser permite el aislamiento de un subconjunto de células para análisis adicional de una sección tisular.

65 Como en citología, para potenciar la visualización de los elementos microscópicos, la sección tisular o el corte puede teñirse con diversas tinciones. Puede usarse un gran menú de tinciones disponibles en el mercado para potenciar o identificar elementos específicos.

Para aumentar adicionalmente la interacción de reactivos moleculares con muestras citológicas/histológicas, se han desarrollado varias técnicas para la «recuperación de analitos». La primera de dichas técnicas usa calentamiento a alta temperatura de una muestra fijada. Este método también se denomina recuperación de epítipo inducida por calor o REIC. Se han usado diversas técnicas de calentamiento, incluyendo calentamiento por vapor, microondas, autoclave, baños de agua y cocinado a presión o una combinación de estos métodos de calentamiento. Las soluciones de recuperación de analitos incluyen, por ejemplo, agua, citrato y tampones salinos normales. La clave para la recuperación de analitos es el tiempo a alta temperatura pero también se han usado con éxito menores temperaturas durante tiempos más largos. Otra clave para la recuperación de analitos es el pH de la solución de calentamiento. Se ha descubierto que el pH bajo proporciona la mejor inmunotinción pero también da lugar a fondos que con frecuencia requieren el uso de una segunda sección tisular como control negativo. El beneficio más uniforme (inmunotinción aumentada sin aumento en el fondo) se obtiene en general con una solución de pH alto independientemente de la composición del tampón. El proceso de recuperación de analitos para una diana específica se optimiza de forma empírica para la diana usando calor, tiempo, pH y composición de tampón como variables para la optimización del proceso. El uso del método de recuperación de analitos por microondas permite la tinción secuencial de diferentes dianas con reactivos de anticuerpo. No obstante también se ha mostrado que el tiempo requerido para conseguir complejos de anticuerpos y enzimas entre las etapas de tinción degrada analitos de membrana celular. Los métodos de calentamiento por microondas han mejorado también los métodos de hibridación in situ.

Para iniciar el proceso de recuperación de analitos, la sección primero se desparafina y se hidrata. El portaobjetos se coloca después en tampón de citrato de sodio 10 mM pH 6,0 en una placa o un frasco. Un procedimiento representativo usa un microondas a 1100 W y calienta por microondas el portaobjetos a 100 % de potencia durante 2 minutos seguido de calentamiento por microondas de los portaobjetos usando 20 % de potencia durante 18 minutos después de comprobar para asegurar que el portaobjetos permanezca cubierto de líquido. Después se deja enfriar el portaobjetos en el recipiente descubierto y después se aclara con agua destilada. Puede usarse REIC en combinación con una digestión enzimática para mejorar la reactividad de la diana a reactivos inmunológicos.

Uno de dichos protocolos de digestión enzimática usa proteinasa K. Se prepara una concentración de 20 g/ml de proteinasa K en base Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,5 %, tampón de pH 8,0. El proceso implica en primer lugar desparafinar secciones en 2 cambios de xileno, de 5 minutos cada uno. Después la muestra se hidrata en 2 cambios de etanol 100 % durante 3 minutos cada uno, etanol 95 % y 80 % durante 1 minutos cada uno y después se aclara en agua destilada. Las secciones se cubren con solución de trabajo de proteinasa K y se incuban durante 10-20 minutos a 37 °C en una cámara humidificada (el tiempo de incubación óptimo puede variar dependiendo del tipo de tejido y grado de fijación). Las secciones se enfrían a temperatura ambiente durante 10 minutos y después se aclaran en PBS Tween 20 durante 2x2 min. Si se desea, pueden bloquearse secciones para eliminar interferencia potencial de compuestos endógenos y enzimas. La sección se incuba después con anticuerpo primario a dilución apropiada en tampón de dilución de anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente o durante una noche a 4 °C. La sección se aclara después con PBS Tween 20 durante 2x2 min. Puede realizarse bloqueo adicional, si es necesario para la aplicación específica, seguido de aclarado adicional con PBS Tween 20 durante 3x2 min y después completarse finalmente el protocolo de inmunotinción.

También se ha demostrado que un tratamiento sencillo con SDS 1 % a temperatura ambiente mejora la tinción inmunohistoquímica. Se han aplicado métodos de recuperación de analitos a secciones montadas en portaobjetos así como secciones flotantes. Otra opción de tratamiento es colocar el portaobjetos en un frasco que contiene ácido cítrico y Nonident P40 0,1 a pH 6,0 y calentar a 95 °C. El portaobjetos se lava después con una solución de tampón como PBS.

Para la tinción inmunológica de tejidos puede ser útil bloquear la asociación no específica del anticuerpo con proteínas tisulares empapando la sección en una solución proteica como suero o leche en polvo desnatada.

Las reacciones de bloqueo pueden incluir la necesidad de reducir el nivel de biotina endógena; eliminar efectos de carga endógena; inactivar nucleasas endógenas; y/o inactivar enzimas endógenas como peroxidasa y fosfatasa alcalina. Las nucleasas endógenas pueden inactivarse por degradación con proteinasa K, por tratamiento térmico, uso de un agente quelante tal como EDTA o EGTA, la introducción de ADN o ARN vehículo, tratamiento con un caótropro tal como urea, tiourea, hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, perclorato de litio, etc., o pirocarbonato de dietilo. La fosfatasa alcalina puede inactivarse por HCl 0,1 N durante 5 minutos a temperatura ambiente o tratamiento con levamisol 1 mM. La actividad peroxidasa puede eliminarse mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno 0,03 %. La biotina endógena puede bloquearse empapando el portaobjetos o la sección en una solución de avidina (puede sustituirse con estreptavidina, neutravidina) durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente. El portaobjetos o la sección se lava después durante al menos 10 minutos en tampón. Esto puede repetirse al menos tres veces. Después el portaobjetos o la sección se empapa en una solución de biotina durante 10 minutos. Esto puede repetirse al menos tres veces con una solución de biotina nueva cada vez. Se repite el procedimiento de lavado de tampón. Los protocolos de bloqueo deberían minimizarse para evitar dañar la estructura celular o tisular o la diana o dianas de interés pero uno o más de estos protocolos podrían combinarse para «bloquear» un portaobjetos o una sección antes de la reacción con uno o más aptámeros de velocidad de

disociación lenta. Véase Basic Medical Histology: the Biology of Cells, Tissues and Organs, escrito por Richard G. Kessel, Oxford University Press, 1998.

#### **Determinación de valores de biomarcadores usando métodos de espectrometría de masas**

5 Puede usarse diversas configuraciones de espectrómetros de masas para detectar valores de biomarcadores. Están disponibles varios tipos de espectrómetros de masas o pueden producirse con diversas configuraciones. En general, un espectrómetro de masas tiene los siguientes componentes principales: una entrada de muestras, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío y sistema de control de instrumentos y un sistema de datos. La diferencia en la entrada de muestras, la fuente de iones y el analizador de masas define en general el tipo de instrumento y sus capacidades. Por ejemplo, una entrada puede ser una fuente de cromatografía líquida en columna capilar o puede ser una sonda directa o plataforma tal como se usa en desorción de láser asistida por matriz. Las fuentes de iones habituales son, por ejemplo, electropulverización, incluyendo nanopulverización y micropulverización o desorción por láser asistida por matriz. Los analizadores de masas habituales incluyen un filtro de masas cuadrípolos, analizador de masas de trampa iónica y analizador de masas de tiempo de vuelo. Se conocen bien en la técnica métodos de espectrometría de masas adicionales (véase Burlingame *et al.* Anal. Chem. 70:647 R-716R (1998); Kinter y Sherman, Nueva York (2000)).

20 Los biomarcadores proteicos y valores de biomarcadores pueden detectarse y medirse por cualquiera de los siguientes: espectrometría de masas de ionización por electronebulización (ESI-MS), ESI-MS/MS, ESI-MS/(MS)<sub>n</sub>, espectrometría de masas de desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI - TOF - MS), espectrometría de masas de desorción/ionización por láser potenciada en superficie-tiempo de vuelo (SELDI-TOF-MS), desorción/ionización en silicio (DIOS), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), cuadrípolo-tiempo de vuelo (Q-TOF), tecnología de tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), denominada TOF/TOF ultraflex III, 25 espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica (APCI-MS), APCI-MS/MS, APCI-(MS)<sub>N</sub>, espectrometría de masas de fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS), APPI-MS/MS y APPI-(MS)<sub>N</sub>, espectrometría de masas de cuadrípolo, espectrometría de masas de transformada de Fourier (FTMS), espectrometría de masas cuantitativa y espectrometría de masas de trampa iónica.

30 Se usan estrategias de preparación de muestras para marcar y enriquecer muestras antes de la caracterización espectroscópica de masas de biomarcadores proteicos y determinación de valores de biomarcadores. Los métodos de marcaje incluyen, pero sin limitación, marcador isobárico para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) y marcaje de isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular (SILAC). Los reactivos de captura usados para enriquecer selectivamente muestras con respecto a proteínas biomarcadoras candidatas antes del análisis 35 espectroscópico de masas incluyen, pero sin limitación, aptámeros, anticuerpos, sonda de ácido nucleico, quimeras, moléculas pequeñas, un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento de anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fv monocatenario, un ácido nucleico, una lectina, un receptor de unión a ligando, anticuerpos, nanocuerpos, anquirinas, anticuerpos de dominio, armazones de anticuerpos alternativos (por ejemplo diacuerpos, etc.), polímeros impresos, avímeros, peptidomiméticos, peptoides, ácidos nucleicos peptídicos, ácido nucleico de treosa, un receptor de hormona, un receptor de citocina y receptores sintéticos, y modificaciones y fragmentos de 40 estos.

#### **Determinación de valores de biomarcadores usando un ensayo de ligamiento de proximidad**

45 Puede usarse un ensayo de ligamiento de proximidad para determinar valores de biomarcadores. Brevemente, se pone en contacto una muestra de ensayo con un par de sondas de afinidad que pueden ser un par de anticuerpos o un par de aptámeros, con cada miembro del par extendido con un oligonucleótido. Las dianas para el par de sondas de afinidad pueden ser dos determinados distintos en una proteína o un determinado en cada una de dos proteínas diferentes, que pueden existir como complejos homo o heteromultiméricos. Cuando las sondas se unan con los 50 determinados diana, los extremos libres de las extensiones oligonucleotídicas se ponen en proximidad suficientemente estrecha para hibridar entre sí. La hibridación de las extensiones oligonucleotídicas se facilita por un oligonucleótido conector común que actúa para enlazar entre sí las extensiones oligonucleotídicas cuando se sitúan suficientemente próximas. Una vez que las extensiones oligonucleotídicas de las sondas se han hibridado, los extremos de las extensiones se unen entre sí mediante ligamiento de ADN enzimático.

55 Cada extensión oligonucleotídica comprende un sitio de cebador para amplificación por PCR. Una vez que se han ligado las extensiones oligonucleotídicas entre sí, los oligonucleótidos forman una secuencia de ADN continua que, mediante amplificación por PCR, revela información con respecto a la identidad y cantidad de la proteína diana, así como, información con respecto a interacciones proteína-proteína cuando los determinados diana están en dos 60 proteínas diferentes. El ligamiento de proximidad puede proporcionar un ensayo altamente sensible y específico para información de concentración e interacción de proteínas en tiempo real mediante el uso de PCR en tiempo real. Las sondas que no se unen con los determinados de interés no tienen las extensiones oligonucleotídicas correspondientes puestas en proximidad y no puede producirse ligamiento ni amplificación por PCR, lo que da como resultado que no se produzca señal.

65 Los ensayos anteriores permiten la detección de valores de biomarcadores que son útiles en métodos para

diagnosticar CPNM, donde los métodos comprenden detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos N valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, en donde una clasificación, como se describe en detalle posteriormente, usando los valores de biomarcadores indica si el individuo tiene CPNM. Aunque determinados biomarcadores de CPNM descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar CPNM, también se describen en el presente documento métodos para el agrupamiento de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de CPNM que son cada uno útiles como un panel de tres o más biomarcadores. Por lo tanto, diversas realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en donde N es al menos tres biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 2-59 biomarcadores. Se apreciará que N puede seleccionarse para ser cualquier número de cualquiera de los intervalos descritos anteriormente, así como intervalos similares, pero de mayor orden. De acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los valores de biomarcadores pueden detectarse y clasificarse individualmente o pueden detectarse y clasificarse colectivamente, como por ejemplo en un formato de ensayo múltiple.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para detectar una ausencia de CPNM, comprendiendo los métodos detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos N valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, en donde una clasificación, como se describe en detalle posteriormente, de los valores de biomarcadores indica una ausencia de CPNM en el individuo. Aunque determinados biomarcadores de CPNM descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar la ausencia de CPNM, también se describen en el presente documento métodos para el agrupamiento de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de CPNM que son cada uno útiles como un panel de tres o más biomarcadores. Por lo tanto, diversas realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en donde N es al menos tres biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona para que sea cualquier número de 2-59 biomarcadores. Se apreciará que N puede seleccionarse para ser cualquier número de cualquiera de los intervalos descritos anteriormente, así como intervalos similares, pero de mayor orden. De acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en el presente documento, los valores de biomarcadores pueden detectarse y clasificarse individualmente o pueden detectarse y clasificarse colectivamente, como por ejemplo en un formato de ensayo múltiple.

### **30 Clasificación de biomarcadores y cálculo de puntuaciones de enfermedad**

Un «distintivo» de biomarcador para un ensayo de diagnóstico dado contiene un conjunto de marcadores, teniendo cada marcador diferentes niveles en las poblaciones de interés. Diferentes niveles, en este contexto, pueden referirse a diferentes medias de los niveles de marcadores para los individuos en dos o más grupos, o diferentes varianzas en los dos o más grupos, o una combinación de ambos. Para la forma más sencilla de un ensayo de diagnóstico, estos marcadores pueden usarse para asignar una muestra desconocida de un individuo a uno de dos grupos, bien enfermo o bien no enfermo. La asignación de una muestra a uno de dos o más grupos se conoce como clasificación, y el procedimiento usado para conseguir esta asignación se conoce como un clasificador o un método de clasificación. Los métodos de clasificación también pueden denominarse métodos de puntuación. Hay muchos métodos de clasificación que pueden usarse para construir un clasificador de diagnóstico de un conjunto de valores de biomarcadores. En general, los métodos de clasificación se realizan más fácilmente usando técnicas de aprendizaje supervisadas donde se recoge un conjunto de datos usando muestras obtenidas de individuos en dos (o más, para múltiples estados de clasificación) grupos distintos que se desea distinguir. Ya que la clase (grupo o población) a la que pertenece cada muestra se conoce previamente para cada muestra, el método de clasificación puede entrenarse para proporcionar la respuesta de clasificación deseada. También es posible usar técnicas de aprendizaje no supervisadas para producir un clasificador de diagnóstico.

Los enfoques comunes para el desarrollo de clasificadores de diagnóstico incluyen árboles de decisión; agregación, refuerzo, bosques y bosques aleatorios; aprendizaje basado en inferencia de normas; ventanas de Parzen; modelos lineales; logística; métodos de redes neurales; agrupamiento no supervisado; K-medias; jerárquico ascendente/descendente; aprendizaje semisupervisado; métodos de prototipos; vecino más cercano; estimación de densidad de kernel; máquinas de vectores de soporte; modelos de Markov ocultos; aprendizaje de Boltzmann; y pueden combinarse clasificadores de manera sencilla o en formas que minimicen funciones objetivas particulares. Para una revisión, véase, por ejemplo, *Pattern Classification*, R. O. Duda, *et al.*, editores, John Wiley & Sons, 2ª edición, 2001; véase también, *The Elements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and Prediction*, T. Hastie, *et al.*, editores, Springer Science+Business Media, LLC, 2ª edición, 2009; cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad.

Para producir un clasificador usando técnicas de aprendizaje supervisado, se obtiene un conjunto de muestras denominado datos de entrenamiento. En el contexto de ensayos de diagnóstico, los datos de tratamiento incluyen muestras de los grupos definidos (clases) a los que se asignarán posteriormente muestras desconocidas. Por ejemplo, las muestras recogidas de individuos en una población de control e individuos en una población de enfermedad particular pueden constituir datos de entrenamiento para desarrollar un clasificador que pueda clasificar muestras desconocidas (o, más particularmente, los individuos de los que se obtuvieron las muestras) como aquejados de la enfermedad o exentos de la enfermedad. El desarrollo del clasificador a partir de los datos de entrenamiento se conoce como entrenamiento del clasificador. Los detalles específicos sobre entrenamiento de

clasificadores dependen de la naturaleza de la técnica de aprendizaje supervisado. Para fines ilustrativos, se describirá posteriormente un ejemplo de entrenamiento de un clasificador bayesiano simple (véase, por ejemplo, Pattern Classification, R. O. Duda, *et al.*, editores, John Wiley & Sons, 2ª edición, 2001; véase también, The Elements of Statistical Learning - Data Mining, Inference, and Prediction, T. Hastie, *et al.*, editores, Springer Science+Business Media, LLC, 2ª edición, 2009).

Ya que normalmente hay muchos más valores de biomarcadores potenciales que muestras en un conjunto de entrenamiento, debe tenerse cuidado para evitar el sobreajuste. Se produce sobreajuste cuando un modelo estadístico describe error aleatorio o ruido en lugar de la relación subyacente. El sobreajuste puede evitarse de diversas maneras, incluyendo, por ejemplo, limitando el número de marcadores usados en el desarrollo del clasificador, suponiendo que las respuestas de marcadores sean independientes entre sí, limitando la complejidad del modelo estadístico subyacente empleado y asegurando que el modelo estadístico subyacente se ajusta a los datos.

Un ejemplo ilustrativo del desarrollo de un ensayo de diagnóstico usando un conjunto de biomarcadores incluye la aplicación de un clasificador bayesiano simple, un clasificador probabilístico sencillo basado en el teorema de Bayes con tratamiento independiente estricto de los biomarcadores. Cada biomarcador se describe por una función de densidad de probabilidad (fdp) dependiente de clase para los valores de UFR medidos o valores de UFR (unidades de fluorescencia relativa) logarítmicos en cada clase. Se supone que las fdp unidas para el conjunto de marcadores en una clase es el producto de las fdp dependientes de clase individuales para cada biomarcador. El entrenamiento de un clasificador bayesiano simple en este contexto equivale a asignar parámetros («parametrización») para caracterizar las fdp dependientes de clase. Puede usarse cualquier modelo subyacente para las fdp dependientes de clase, pero el modelo debería ajustarse en general a los datos observados en el conjunto de entrenamiento.

Específicamente, la probabilidad dependiente de clase de medir un valor  $x_i$  para el biomarcador  $i$  en la clase de enfermedad se escribe como  $p(x_i|d)$  y la probabilidad bayesiana simple general de observar  $n$  marcadores con

$$p(\tilde{x}|d) = \prod_{i=1}^n p(x_i|d)$$

valores  $\tilde{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$  se escribe como  $p(\tilde{x}|d)$  donde los  $x_i$ s individuales son los niveles de biomarcadores medidos en UFR o UFR log. La asignación de clasificación para un desconocido se facilita calculando la probabilidad de estar enfermo  $p(d|\tilde{x})$  habiendo medido  $\tilde{x}$  en comparación con la probabilidad de estar exento de enfermedad (control)  $p(c|\tilde{x})$  para los mismos valores medidos. La relación de estas probabilidades se calcula a partir de las fdp dependientes de clase por aplicación del teorema de Bayes, es decir,

$$\frac{p(d|\tilde{x})}{p(c|\tilde{x})} = \frac{p(\tilde{x}|d)p(d)}{p(\tilde{x}|c)(1-p(d))}$$

donde  $p(d)$  es la prevalencia de la enfermedad en la población apropiada para el ensayo. Tomando el logaritmo de ambos lados de esta relación y sustituyendo las probabilidades dependientes de clase bayesianas simples de antes se obtiene

$$\ln \left( \frac{p(d|\tilde{x})}{p(c|\tilde{x})} \right) = \sum_{i=1}^n \ln \left( \frac{p(x_i|d)}{p(x_i|c)} \right) + \ln \left( \frac{p(d)}{1-p(d)} \right).$$

Esta forma se conoce como la relación de probabilidad logarítmica e indica sencillamente la probabilidad logarítmica de estar exento de la enfermedad particular frente a tener la enfermedad y está compuesta principalmente por la suma de relaciones de probabilidad logarítmica individuales de los  $n$  biomarcadores individuales. En su forma más sencilla, una muestra desconocida (o, más particularmente, el individuo del que se obtuvo la muestra) se clasifica como exento de la enfermedad si la relación anterior es mayor que cero y como aquejado de la enfermedad si la relación es menor que cero.

En una realización a modo de ejemplo, se supone que las fdp de biomarcadores dependientes de clase  $p(x_i|c)$  y  $p(x_i|d)$  son distribuciones normales o normales logarítmicas en los valores de UFR medidos  $x_i$ , es decir

$$p(x_i|c) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{c,i}} \exp \left( -\frac{(x_i - \mu_{c,i})^2}{2\sigma_{c,i}^2} \right),$$

con una expresión similar para  $p(x_i|d)$  con  $\mu_d$  y  $\sigma_d$ . La parametrización del modelo requiere la estimación de dos parámetros para cada fdp dependiente de clase, una media  $\mu$  y una varianza  $\sigma^2$ , a partir de los datos de entrenamiento. Esto puede conseguirse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, por estimaciones de máxima probabilidad, por mínimos cuadrados y por cualquier otro método conocido por los expertos en la materia. La sustitución de las distribuciones normales para  $\mu$  y  $\sigma$  en la relación de probabilidad logarítmica anterior proporciona la siguiente expresión:

$$\ln\left(\frac{p(d|\tilde{x})}{p(c|\tilde{x})}\right) = \sum_{i=1}^n \ln\left(\frac{\sigma_{c,i}}{\sigma_{d,i}}\right) - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \left[ \left(\frac{x_i - \mu_{d,i}}{\sigma_{d,i}}\right)^2 - \left(\frac{x_i - \mu_{c,i}}{\sigma_{c,i}}\right)^2 \right] + \ln\left(\frac{p(d)}{1-p(d)}\right)$$

Una vez que se ha definido un conjunto de  $\mu$ s y  $\sigma^2$ s para cada fdp en cada clase de los datos de entrenamiento y se ha especificado la prevalencia de enfermedad en la población, el clasificador bayesiano se determina completamente y puede usarse para clasificar muestras desconocidas con valores  $x$  medidos.

El rendimiento del clasificador bayesiano simple depende del número y la calidad de los biomarcadores usados para construir y entrenar el clasificador. Un único biomarcador rendirá de acuerdo con su distancia KS (Kolmogorov-Smirnov), como se define en el Ejemplo 3, posteriormente. Si una medida de rendimiento de un clasificador se define como el área bajo la curva (ABC) de la característica operadora receptora, un clasificador perfecto tendrá una puntuación de 1 y un clasificador aleatorio, en promedio, tendrá una puntuación de 0,5. La definición de la distancia KS entre dos conjuntos  $A$  y  $B$  de tamaños  $n$  y  $m$  es el valor,  $D_{n,m} = \sup_x |F_{A,n}(x) - F_{B,m}(x)|$ , que es la mayor diferencia entre dos funciones de distribución acumulada (fda) empíricas. La fda empírica para un conjunto  $A$  de  $n$

$$F_{A,n}(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{X_i \leq x}$$

observaciones  $X_i$  se define como, donde  $I_{X_i \leq x}$  es la función indicadora que es igual a 1 si  $X_i < x$  y es por lo demás igual a 0. Por definición, este valor está acotado entre 0 y 1, donde una distancia KS de 1 indica que las distribuciones empíricas no solapan.

La adición de marcadores posteriores con buenas distancias KS (>0,3, por ejemplo), en general, mejorará el rendimiento de clasificación si los marcadores añadidos posteriormente son independientes del primer marcador. Usando el área bajo la curva (ABC) de ROC como una puntuación de clasificador, es sencillo generar muchos clasificadores de alta puntuación con una variación de un algoritmo ávido. (Un algoritmo ávido es cualquier algoritmo que siga la metaheurística de resolución de problemas de tomar la decisión localmente óptima en cada estadio con la esperanza de encontrar el óptimo global).

El enfoque de algoritmo usado aquí se describe en detalle en el Ejemplo 4. Brevemente, todos los clasificadores de análisis individuales se generan a partir de una tabla de biomarcadores potenciales y se añaden a una lista. A continuación, se realizan entonces todas las posibles adiciones de un segundo análisis a cada uno de los clasificadores de análisis individuales almacenados, guardando un número predeterminado de los pares de mejor puntuación, como, por ejemplo, mil, en una lista nueva. Se exploran todos los clasificadores de tres marcadores posibles usando esta nueva lista de los mejores clasificadores de dos marcadores, guardando de nuevo los mil mejores de estos. Este proceso continúa hasta que la puntuación alcanza un nivel estable o comienza a deteriorarse a medida que se añaden marcadores adicionales. Los clasificadores de alta puntuación que permanecen después de la convergencia pueden evaluarse con respecto al rendimiento deseado para un uso pretendido. Por ejemplo, en una aplicación de diagnóstico, los clasificadores con una alta sensibilidad y especificidad moderada pueden ser más deseables que sensibilidad moderada y alta especificidad. En otra aplicación de diagnóstico, los clasificadores con una alta especificidad y una sensibilidad modesta pueden ser más deseables. El nivel deseado de rendimiento se selecciona en general basándose en una contrapartida que debe darse entre el número de falsos positivos y falsos negativos que pueden tolerarse cada uno para la aplicación de diagnóstico particular. Dichas contrapartidas dependen en general de las consecuencias médicas de un error, bien falso positivo o bien falso negativo.

Se conocen en la materia diversas otras técnicas y pueden emplearse para generar muchos clasificadores potenciales de una lista de biomarcadores usando un clasificador bayesiano simple. En una realización, puede usarse lo que se denomina un algoritmo genético para combinar diferentes marcadores usando la puntuación de ajuste como se ha definido anteriormente. Los algoritmos genéticos se ajustan particularmente bien a la exploración de una población diversa grande de clasificadores potenciales. En otra realización, puede usarse la denominada optimización de colonia de hormigas para generar conjuntos de clasificadores. También pueden emplearse otras estrategias que se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, otras estrategias evolutivas así como hibridación simulada y otros métodos de búsqueda estocásticos. También pueden emplearse métodos metaheurísticos tales como, por ejemplo, búsqueda de armonía.

Las realizaciones a modo de ejemplo usan cualquier número de los biomarcadores de CPNM enumerados en la Tabla 1 en diversas combinaciones para producir ensayos de diagnóstico para detectar CPNM (véase Ejemplo 2 para una descripción detallada de cómo se identificaron estos biomarcadores). En una realización, un método de diagnóstico de CPNM usa un método de clasificación bayesiano simple junto con cualquiera de varios biomarcadores de CPNM enumerados en la Tabla 1. En un ejemplo ilustrativo (Ejemplo 3), el ensayo más sencillo para detectar CPNM de una población de fumadores y nódulos pulmonares benignos puede construirse usando un único biomarcador, por ejemplo, MMP7 que se expresa diferencialmente en CPNM con una distancia KS de 0,59. Usando los parámetros,  $\mu_{c,i}$ ,  $\sigma_{c,i}$ ,  $\mu_{d,i}$ , y  $\sigma_{d,i}$  para MMP7 de la Tabla 16 y la ecuación para la probabilidad logarítmica

descrita anteriormente, puede obtenerse un ensayo de diagnóstico con una ABC de 0,803, véase Tabla 15. La curva de ROC para este ensayo se presenta en la Figura 2.

- 5 La adición del biomarcador CLIC1, por ejemplo, con una distancia KS de 0,53, mejora significativamente el rendimiento del clasificador a una ABC de 0,883. Obsérvese que la puntuación para un clasificador construido por dos biomarcadores no es una sencilla suma de las distancias KS; las distancias KS no son aditivas cuando se combinan biomarcadores y son necesarios muchos más marcadores débiles para conseguir el mismo nivel de rendimiento que un marcador fuerte. La adición de un tercer marcador, STX1A, por ejemplo, refuerza el rendimiento del clasificador a una ABC de 0,901. La adición de biomarcadores adicionales, tales como, por ejemplo, CHRDL1, 10 PA2G4, SERPINA1, BDNF, GHR, TGFBI y NME2, produce una serie de ensayos de CPNM resumidos en la Tabla 15 y presentados como una serie de curvas de ROC en la Figura 3. La puntuación de los clasificadores en función del número de analitos usados en la construcción de clasificador se presenta en la Figura 4. La ABC de este clasificador de diez marcadores a modo de ejemplo es 0,948.
- 15 Los marcadores enumerados en la Tabla 1 pueden combinarse de muchas maneras para producir clasificadores para diagnosticar CPNM. En algunas realizaciones, los paneles de biomarcadores están comprendidos por diferentes números de analitos dependiendo de un criterio de rendimiento de diagnóstico específico que se selecciona. Por ejemplo, determinadas combinaciones de biomarcadores producirán ensayos que son más sensibles (o más específicos) que otras combinaciones.
- 20 Una vez que se ha definido que un panel incluye un conjunto particular de biomarcadores de la Tabla 1 y se ha construido un clasificador a partir de un conjunto de datos de entrenamiento, la definición del ensayo de diagnóstico está completa. En una realización, el procedimiento usado para clasificar una muestra desconocida se perfila en la Figura 1A. En otra realización el procedimiento usado para clasificar una muestra desconocida se perfila en la Figura 25 1B. La muestra biológica se diluye de forma apropiada y después se procesa en uno o más ensayos para producir los niveles de biomarcadores cuantitativos relevantes usados para clasificación. Los niveles de biomarcadores medidos se usan como entrada para el método de clasificación que produce una clasificación y una puntuación opcional para la muestra que refleja la confianza de la asignación de clase.
- 30 La Tabla 1 identifica 59 biomarcadores que son útiles para diagnosticar CPNM. Este es un número sorprendentemente mayor de lo esperado en comparación con lo que se encuentra normalmente durante los intentos de descubrimiento de biomarcadores y puede ser atribuible a la escala del estudio descrito, que abarcó más de 1000 proteínas medidas en cientos de muestras individuales, en algunos casos a concentraciones en el intervalo 35 femtomolar bajo. Supuestamente, el gran número de biomarcadores descubiertos refleja las diversas rutas bioquímicas implicadas tanto en la biología tumoral como en la respuesta del cuerpo a la presencia del tumor; cada ruta y proceso implica muchas proteínas. Los resultados muestran que ninguna proteína individual de un grupo pequeño de proteínas es informativa de forma única acerca de dichos procesos complejos; más bien, múltiples proteínas están implicadas en procesos relevantes, tales como la apoptosis o la reparación de matriz extracelular, por ejemplo.
- 40 Dados los numerosos biomarcadores identificados durante el estudio descrito, se esperaría poder obtener grandes números de clasificadores de alto rendimiento que pueden usarse en diversos métodos de diagnóstico. Para comprobar esta idea, se evaluaron decenas de miles de clasificadores usando los biomarcadores en la Tabla 1. Como se describe en el Ejemplo 4, muchos subconjuntos de los biomarcadores presentados en la Tabla 1 pueden 45 combinarse para generar clasificadores útiles. A modo de ejemplo, se proporcionan descripciones para clasificadores que contienen 1, 2 y 3 biomarcadores para detección de CPNM. Como se describe en el Ejemplo 4, todos los clasificadores que se construyeron usando los biomarcadores en la Tabla 1 rindieron notablemente mejor que clasificadores que se construyeron usando «no marcadores».
- 50 El rendimiento de clasificadores obtenidos excluyendo aleatoriamente algunos de los marcadores en la Tabla 1, que dio como resultado subconjuntos más pequeños a partir de los que construir los clasificadores, también se ensayó. Como se describe en el Ejemplo 4, los clasificadores que se construyeron a partir de subconjuntos aleatorios de los marcadores en la Tabla 1 rindieron de forma similar a clasificadores óptimos que se construyeron usando la lista 55 completa de marcadores en la Tabla 1.
- 55 El rendimiento de clasificadores de diez marcadores obtenido excluyendo los «mejores» marcadores individuales de la agregación de diez marcadores también se ensayó. Como se describe en el Ejemplo 4, los clasificadores 60 construidos con los «mejores» marcadores en la Tabla 1 también rindieron bien. Muchos subconjuntos de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 rindieron casi óptimamente, incluso después de retirar los 15 superiores de los marcadores enumerados en la Tabla. Esto implica que las características de rendimiento de cualquier clasificador particular probablemente no se deban a algún grupo central pequeño de biomarcadores y que el proceso de enfermedad probablemente influya en numerosas rutas bioquímicas, lo que altera el nivel de expresión de muchas proteínas.
- 65 Los resultados del Ejemplo 4 sugieren algunas posibles conclusiones: En primer lugar, la identificación de un gran número de biomarcadores permite su agregación en un amplio número de clasificadores que ofrecen un rendimiento

alto similar. En segundo lugar, pueden construirse clasificadores de modo que puedan sustituirse biomarcadores particulares por otros biomarcadores de una manera que refleje las redundancias que indudablemente existen en las complejidades de los procesos de enfermedad subyacentes. Es decir, la información acerca de la enfermedad aportada por cualquier biomarcador individual identificado en la Tabla 1 solapa con la información aportada por otros biomarcadores, de modo que puede suceder que no deba incluirse ningún biomarcador o grupo pequeño de biomarcadores particular en la Tabla 1 en ningún clasificador.

Las realizaciones a modo de ejemplo usan clasificadores bayesianos simples construidos a partir de los datos en la Tabla 16 para clasificar una muestra desconocida. El procedimiento se perfila en las Figuras 1A y 1B. En una realización, la muestra biológica se diluye opcionalmente y se procesa en un ensayo de aptámeros múltiple. Los datos del ensayo se normalizan y se calibran como se perfila en el Ejemplo 3 y los niveles de biomarcadores resultantes se usan como entrada en un esquema de clasificación bayesiano. La relación de probabilidad logarítmica se calcula para cada biomarcador medido individualmente y después se suma para producir una puntuación de clasificación final, que también se denomina puntuación de diagnóstico. Puede indicarse la asignación resultante así como la puntuación de clasificación general. Opcionalmente, los factores de riesgo de probabilidad logarítmica individuales calculados para cada nivel de biomarcador también pueden indicarse. Los detalles del cálculo de la puntuación de clasificación se presentan en el Ejemplo 3.

#### Kits

Puede detectarse cualquier combinación de los biomarcadores de la tabla 1 (así como información biomédica adicional) usando un kit adecuado, tal como para su uso en la realización de los métodos desvelados en el presente documento. Además, cualquier kit puede contener uno o más marcadores detectables como se describe en el presente documento, tal como un resto fluorescente, etc.

En una realización, un kit incluye (a) uno o más reactivos de captura (tales como, por ejemplo, al menos un aptámero o anticuerpo) para detectar uno o más biomarcadores en una muestra biológica, en donde los biomarcadores incluyen cualquiera de los biomarcadores expuestos en la tabla 1, y opcionalmente (b) uno o más productos de programas informáticos o software para clasificar al individuo del que se obtuvo la muestra biológica como aquejado o no aquejado de CPNM o para determinar la probabilidad de que el individuo tenga CPNM, como se describe adicionalmente en el presente documento. Como alternativa, en lugar de uno o más productos de programas informáticos, pueden proporcionarse una o más instrucciones para que un ser humano realice manualmente las etapas anteriores.

La combinación de un soporte sólido con un reactivo de captura correspondiente y un material generador de señal se denomina en el presente documento «dispositivo de detección» o «kit». El kit también puede incluir instrucciones para usar los dispositivos y reactivos, manipular la muestra y analizar los datos. Además el kit puede usarse con un sistema informático o software para analizar y presentar el resultado del análisis de la muestra biológica.

Los kits también pueden contener uno o más reactivos (por ejemplo, tampones de solubilización, detergentes, lavados o tampones) para procesar una muestra biológica. Cualquiera de los kits descritos en el presente documento también puede incluir, por ejemplo, tampones, agentes de bloqueo, materiales de matriz de espectrometría de masas, agentes de captura de anticuerpos, muestras de control positivo, muestras de control negativo, software e información tales como protocolos, orientación y datos de referencia.

En un aspecto, la invención proporciona kits para el análisis del estado de CPNM. Los kits incluyen cebadores de PCR para uno o más biomarcadores seleccionados de la Tabla 1. El kit puede incluir además instrucciones de uso y correlación de los biomarcadores con CPNM. El kit también puede incluir una matriz de ADN que contiene el complemento de uno o más de los biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, reactivos y/o enzimas para amplificar o aislar ADN de muestra. Los kits pueden incluir reactivos para PCR en tiempo real, por ejemplo, sondas y/o cebadores TaqMan y enzimas.

Por ejemplo, un kit puede comprender (a) reactivos que comprenden al menos reactivo de captura para cuantificar uno o más biomarcadores en una muestra de ensayo, en donde dichos biomarcadores comprenden los biomarcadores expuestos en la Tabla 1, cualquier otro biomarcador o paneles de biomarcadores descritos en el presente documento, y opcionalmente (b) uno o más algoritmos o programas informáticos para realizar las etapas de comparar la cantidad de cada biomarcador cuantificado en la muestra de ensayo con uno o más puntos de corte predeterminados y asignar una puntuación para cada biomarcador cuantificado basándose en dicha comparación, combinar las puntuaciones asignadas para cada biomarcador cuantificado para obtener una puntuación total, comparar la puntuación total con una puntuación predeterminada y usar dicha comparación para determinar si un individuo tiene CPNM. Como alternativa, en lugar de uno o más algoritmos o programas informáticos, pueden proporcionarse una o más instrucciones para que un ser humano realice manualmente las etapas anteriores.

**Métodos informáticos y software**

Una vez que se ha seleccionado un biomarcador o panel de biomarcadores, un método para diagnosticar a un individuo puede comprender lo siguiente: 1) recoger u obtener de otro modo una muestra biológica; 2) realizar un método analítico para detectar y medir el biomarcador o biomarcadores en el panel en la muestra biológica; 3) realizar cualquier normalización o unificación de datos requeridas para el método usado para recoger valores de biomarcadores; 4) calcular la puntuación de marcador; 5) combinar las puntuaciones de marcadores para obtener una puntuación de diagnóstico total; y 6) presentar la puntuación de diagnóstico del individuo. En este enfoque, la puntuación de diagnóstico puede ser un único número determinado a partir de la suma de todos los cálculos de marcadores que se compara con un valor umbral predeterminado que es una indicación de la presencia o ausencia de enfermedad. O la puntuación de diagnóstico puede ser una serie de barras que representan cada una un valor de biomarcador y el patrón de las respuestas puede compararse con un patrón predeterminado para la determinación de la presencia o ausencia de enfermedad.

Pueden implementarse al menos algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento con el uso de un ordenador. Se muestra un ejemplo de un sistema informático 100 en la Figura 6. Con referencia a la Figura 6, se muestra el sistema 100 que comprende elementos de hardware que se acoplan eléctricamente mediante bus 108, incluyendo un procesador 101, dispositivo de entrada 102, dispositivo de salida 103, dispositivo de almacenamiento 104, lector de medio de almacenamiento leíble por ordenador 105a, sistema de comunicaciones 106 que procesa la aceleración (por ejemplo, DSP procesadores especializados) 107 y memoria 109. El lector de medio de almacenamiento leíble por ordenador 105a se acopla adicionalmente a medio de almacenamiento leíble por ordenador 105b, representando la combinación de forma exhaustiva dispositivos de almacenamiento remotos, locales, fijos y/o desmontables más medio de almacenamiento, memoria, etc. para contener temporal y/o más permanentemente información leíble por ordenador, que puede incluir dispositivo de almacenamiento 104, memoria 109 y/o cualquier otro de dichos recursos de sistema accesible 100. El sistema 100 también comprende elementos de software (mostrados como localizados actualmente en la memoria de trabajo 191) incluyendo un sistema operativo 192 y otro código 193, tal como programas, datos y similares.

Con respecto a la Figura 6, el sistema 100 tiene flexibilidad y capacidad de configuración extensivas. Por lo tanto, por ejemplo, podría utilizarse una única arquitectura para implementar uno o más servidores que pueden configurarse adicionalmente de acuerdo con protocolos deseables actualmente, variaciones de protocolos, extensiones, etc. Sin embargo, resultará evidente para los expertos en la materia que pueden utilizarse realizaciones de acuerdo con requisitos de aplicación más específicos. Por ejemplo, podrían implementarse uno o más elementos de sistema como subelementos en un componente de sistema 100 (por ejemplo, en sistema de comunicaciones 106). También podría utilizarse hardware adaptado y/o podrían implementarse elementos particulares en hardware, software o ambos. Además, aunque puede emplearse conexión con otros dispositivos informáticos tales como dispositivos de entrada/salida de redes (no mostrados), debe entenderse que también podrían utilizarse conexión o conexiones por cable, sin cable, por módem y/u otras con otros dispositivos informáticos.

En un aspecto, el sistema puede comprender una base de datos que contiene elementos de biomarcadores característicos de CPNM. Los datos de biomarcadores (o información de biomarcadores) pueden utilizarse como una entrada en el ordenador para su uso como parte de un método implementado por ordenador. Los datos de biomarcadores pueden incluir los datos como se describen en el presente documento.

En un aspecto, el sistema comprende además uno o más dispositivos para proporcionar datos de entrada a uno o más procesadores.

El sistema comprende además una memoria para almacenar un conjunto de datos de elementos de datos clasificados.

En otro aspecto, el dispositivo para proporcionar datos de entrada comprende un detector para detectar la característica del elemento de datos, por ejemplo, tal como un espectrómetro de masas o lector de chips génicos.

El sistema puede comprender adicionalmente un sistema de control de base de datos. Las peticiones o consultas de usuarios pueden formatearse en un lenguaje apropiado entendido por el sistema de control de base de datos que procesa la consulta para extraer la información relevante de la base de datos de conjuntos de entrenamiento.

El sistema puede ser conectable a una red con la que se conectan un servidor de red y uno o más clientes. La red puede ser una red de área local (LAN) o una red de área amplia (WAN), como se conoce en la técnica. Preferentemente, el servidor incluye el hardware necesario para ejecutar productos de programas informáticos (por ejemplo, software) para acceder a datos de la base de datos para procesar peticiones de usuarios.

El sistema puede incluir un sistema operativo (por ejemplo, UNIX o Linux) para ejecutar instrucciones de un sistema de control de base de datos. En un aspecto, el sistema operativo puede actuar en una red de comunicaciones global, tal como internet, y utilizar un servidor de red de comunicaciones global para conectar con dicha red.

- 5 El sistema puede incluir uno o más dispositivos que comprenden una interfaz de visualización gráfica que comprende elementos de interfaz tales como botones, menús desplegables, barras de desplazamiento, campos para introducir texto y similares como se encuentran rutinariamente en las interfaces gráficas de usuario conocidas en la técnica. Pueden transmitirse peticiones introducidas en una interfaz de usuario a un programa de aplicación en el sistema para formatear para buscar información relevante en una o más de las bases de datos del sistema. Las peticiones o consultas introducidas por un usuario pueden construirse en cualquier lenguaje de base de datos adecuado.
- 10 La interfaz gráfica de usuario puede generarse por un código de interfaz gráfica de usuario como parte del sistema operativo y puede usarse para introducir datos y/o presentar datos introducidos. El resultado de datos procesados puede presentarse en la interfaz, imprimirse en una impresora en comunicación con el sistema, guardarse en un dispositivo de memoria y/o transmitirse a través de la red o puede proporcionarse en forma del medio leíble por ordenador.
- 15 El sistema puede estar en comunicación con un dispositivo de entrada para proporcionar datos con respecto a elementos de datos al sistema (por ejemplo, valores de expresión). En un aspecto, el dispositivo de entrada puede incluir un sistema de perfil de expresión génica que incluye, por ejemplo, un espectrómetro de masas, lector de chip génico o matrices, y similares.
- 20 Los métodos y aparatos para analizar información de biomarcadores de CPNM según diversas realizaciones pueden implementarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, usando un programa informático que actúa en un sistema informático. Puede usarse un sistema informático convencional que comprende un procesador y una memoria de acceso directo, tal como un servidor de aplicación accesible de forma remota, servidor de red, ordenador personal o estación de trabajo. Los componentes de sistema informático adicionales pueden incluir dispositivos de memoria o sistemas de almacenamiento de información, tales como un sistema de almacenamiento masivo y una interfaz de usuario, por ejemplo un monitor convencional, teclado y dispositivo de seguimiento. El sistema informático puede ser un sistema independiente o parte de una red de ordenadores que incluye un servidor y una o más bases de datos.
- 25 El sistema de análisis de biomarcadores de CPNM puede proporcionar funciones y operaciones para completar análisis de datos, tal como recopilación de datos, procesamiento, análisis, presentación y/o diagnóstico. Por ejemplo, en una realización, el sistema informático puede ejecutar el programa informático que puede recibir, almacenar, buscar, analizar y presentar información relacionada con los biomarcadores de CPNM. El programa informático puede comprender múltiples módulos que realizan diversas funciones u operaciones, tales como un módulo de procesamiento para procesar datos sin procesar y generar datos complementarios y un módulo de análisis para analizar datos sin procesar y datos complementarios para generar un estado y/o diagnóstico de CPNM. El diagnóstico del estado de CPNM puede comprender generar o recoger cualquier otra información, incluyendo información biomédica adicional, con respecto a la condición del individuo en relación con la enfermedad, identificar si pueden ser deseables ensayos adicionales o evaluar de otro modo el estado de salud del individuo.
- 30 En referencia ahora a la Figura 7, puede verse un ejemplo de un método para utilizar un ordenador de acuerdo con principios de una realización desvelada. En la Figura 7, se muestra un diagrama de flujo 3000. En el bloque 3004, puede recuperarse información de biomarcadores para un individuo. La información de biomarcadores puede recuperarse de una base de datos informática, por ejemplo, después de realizarse ensayo de la muestra biológica del individuo. La información de biomarcadores puede comprender valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de un grupo que consiste en los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, en donde  $n = 2-59$ . En el bloque 3008, puede utilizarse un ordenador para clasificar cada uno de los valores de biomarcadores. Y, en el bloque 3012, puede realizarse una determinación con respecto a la probabilidad de que un individuo tenga CPNM basándose en una pluralidad de clasificaciones. La indicación puede extraerse a un monitor u otro dispositivo indicador de modo que sea visible por una persona. Por lo tanto, por ejemplo, se puede presentar en una pantalla de un ordenador u otro dispositivo de salida.
- 35 En referencia ahora a la Figura 8, puede ilustrarse un método alternativo para utilizar un ordenador de acuerdo con otra realización mediante el diagrama de flujo 3200. En el bloque 3204, puede utilizarse un ordenador para recuperar información de biomarcadores para un individuo. La información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1. En el bloque 3208, puede realizarse una clasificación del valor de biomarcador con el ordenador. Y, en el bloque 3212, puede realizarse una indicación con respecto a la probabilidad de que un individuo tenga CPNM basándose en la clasificación. La indicación puede extraerse a un monitor u otro dispositivo indicador de modo que sea visible por una persona. Por lo tanto, por ejemplo, se puede presentar en una pantalla de un ordenador u otro dispositivo de salida.
- 40 Algunas realizaciones descritas en el presente documento pueden implementarse para incluir un producto de programa informático. Un producto de programa informático puede incluir un medio leíble por ordenador que tenga código de programa leíble por ordenador incorporado en el medio para provocar que un programa de aplicación se ejecute en un ordenador con una base de datos.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Como se usa en el presente documento, un «producto de programa informático» se refiere a un conjunto organizado de instrucciones en forma de instrucciones en lenguaje natural o de programación que están contenidas en un medio físico de cualquier naturaleza (por ejemplo, escrito, electrónico, magnético, óptico u otro) y que puede usarse con un ordenador u otro sistema de procesamiento de datos automático. Dichas instrucciones en lenguaje de programación, cuando son ejecutadas por un ordenador o sistema de procesamiento de datos, provocan que el ordenador o sistema de procesamiento de datos actúe de acuerdo con el contenido particular de las instrucciones. Los productos de programas informáticos incluyen sin limitación: programas en bibliotecas de código fuente y objeto y/o ensayo o datos incluidas en un medio leíble por ordenador. Además, puede proporcionarse el producto de programa informático que permite que un sistema informático o dispositivo de equipamiento de procesamiento de datos actúe en modos preseleccionados de varias formas, incluyendo, pero sin limitación, código fuente original, código de ensamblaje, código objeto, lenguaje máquina, versiones encriptadas o comprimidas de lo anterior y todos y cada uno de los equivalentes.

En un aspecto, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de CPNM. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores en la muestra biológica seleccionados del grupo de biomarcadores proporcionado en la tabla 1, en donde  $n = 2-59$ ; y código que ejecuta un método de clasificación que indica un estado de CPNM del individuo en función de los valores de biomarcadores.

En otro aspecto más, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de CPNM. El producto de programa informático incluye un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden un valor de biomarcador que corresponde a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1; y código que ejecuta un método de clasificación que indica un estado de CPNM del individuo en función del valor de biomarcador.

Aunque se han descrito diversas realizaciones como métodos o aparatos, debería entenderse que pueden implementarse realizaciones mediante código junto con un ordenador, por ejemplo, código residente en un ordenador o accesible al ordenador. Por ejemplo, podrían utilizarse software y bases de datos para implementar muchos de los métodos analizados anteriormente. Por lo tanto, además de realizaciones realizadas por hardware, también debería observarse que estas realizaciones pueden realizarse mediante el uso de un artículo de fabricación comprendido en un medio leíble por ordenador que tiene un código de programa leíble por ordenador incorporado en el mismo, que provoca la habilitación de las funciones desveladas en esta descripción. Por lo tanto, se desea que las realizaciones también se consideren protegidas por esta patente en su medio de código de programa. Además, las realizaciones pueden incorporarse como código almacenado en una memoria leíble por ordenador de prácticamente cualquier tipo incluyendo, sin limitación, RAM, ROM, medio magnético, medio óptico o medio magneto-óptico. Aun más generalmente, las realizaciones podrían implementarse en software, o en hardware, o cualquier combinación de las mismas incluyendo, pero sin limitación, software que se ejecuta en un procesador de uso general, microcódigo, PLA o ASIC.

También se prevé que podrían realizarse realizaciones como señales informáticas incorporadas en una onda portadora, así como señales (por ejemplo, eléctrica y óptica) propagadas a través de un medio de transmisión. Por lo tanto, los diversos tipos de información analizados anteriormente podrían formatearse en una estructura, tal como una estructura de datos, y transmitirse como una señal eléctrica a través de un medio de transmisión o almacenarse en un medio leíble por ordenador.

También debe observarse que muchas de las estructuras, materiales y actos enumerados en el presente documento pueden enumerarse como un medio para realizar una función o una etapa para realizar una función. Por lo tanto, debería entenderse que dicho lenguaje tiene derecho a abarcar todas esas estructuras, materiales o actos desvelados en la presente memoria descriptiva y sus equivalentes, incluyendo la materia incorporada por referencia.

El proceso de identificación de biomarcadores, la utilización de los biomarcadores desvelados en el presente documento y los diversos métodos para determinar valores de biomarcadores se han descrito en detalle anteriormente con respecto a CPNM. Sin embargo, la aplicación del proceso, el uso de biomarcadores identificados y los métodos para determinar valores de biomarcadores son completamente aplicables a otros tipos de cáncer específicos, a cáncer en general, a cualquier otra enfermedad o afección médica o a la identificación de individuos que pueden beneficiarse o no por un tratamiento médico complementario. Excepto cuando se hace referencia a resultados específicos relacionados con CPNM, como resulta evidente a partir del contexto, puede entenderse que las referencias en el presente documento a CPNM incluyen otros tipos de cáncer, cáncer en general o cualquier otra enfermedad o afección médica.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la patente como se define por las reivindicaciones adjuntas. Todos los ejemplos descritos en el presente documento se llevaron a cabo usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la materia. Las técnicas de biología molecular rutinarias descritas en los siguientes ejemplos pueden llevarse a cabo como se describe en los manuales de laboratorio convencionales, tal como Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (2001).

### 10 Ejemplo 1. Análisis de aptámeros múltiple de muestras

Este ejemplo describe el ensayo de aptámeros múltiple usado para analizar las muestras y los controles para la identificación de los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 (véase Figura 9) y la identificación de los biomarcadores de cáncer expuestos en la Tabla 19. Para los estudios de CPNM, mesotelioma y carcinoma de células renales, el análisis múltiple utilizó 1.034 aptámeros, cada uno único de una diana específica.

En este método, las puntas de pipeta se cambiaron para cada adición de solución.

Además, a menos que se indique de otro modo, la mayoría de transferencias de solución y adiciones de lavado usaron el cabezal de 96 pocillos de un Beckman Biomek FxP. Las etapas del método pipeteadas manualmente usaron una Pipetteman P200 de doce canales (Rainin Instruments, LLC, Oakland, CA), a menos que se indique otra cosa. Se preparó un tampón adaptado denominado SB17 de forma interna, que comprendía HEPES 40 mM, NaCl 100 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, EDTA 1 mM a pH 7,5. Se preparó un tampón adaptado denominado SB18 de forma interna, que comprendía HEPES 40 mM, NaCl 100 mM, KCl 5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM a pH 7,5. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique otra cosa.

#### 1. Preparación de solución de reserva de aptámeros

Se prepararon soluciones de aptámeros de reserva adaptados para suero 5 %, 0,316 % y 0,01 % a concentración 2x en SB17 1x, Tween-20 0,05 %.

Estas soluciones se almacenan a -20 °C hasta su uso. El día del ensayo, cada mezcla de aptámeros se descongeló a 37 °C durante 10 minutos, se colocó en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se permitió que se enfriara hasta 25 °C durante 20 minutos con mezcla vigorosa entre cada etapa de calentamiento. Después de calentamiento-enfriamiento, se pipetearon manualmente 55 µl de cada mezcla de aptámeros 2x en una placa de Hybaid de 96 pocillos y la placa se precintó con papel de aluminio. El resultado final fue tres placas de Hybaid precintadas con papel de aluminio, de 96 pocillos, con mezclas de aptámeros de 5 %, 0,316 % o 0,01 %. La concentración de aptámeros individual fue 2x final o 1 nM.

#### 40 2. Preparación de muestras de ensayo

Se colocaron alícuotas congeladas de 100 % de suero o plasma, almacenadas a -80 °C en baño de agua a 25 °C durante 10 minutos. Las muestras descongeladas se colocaron en hielo, se agitaron vorticialmente suavemente (ajustado a 4) durante 8 segundos y después se recolocaron en hielo.

Se preparó una solución de muestras al 10 % (2x final) transfiriendo 8 µl de muestra usando un pipeteador que abarca 8 canales de 50 µl en placas de Hybaid de 96 pocillos, conteniendo cada pocillo 72 µl del diluyente de muestras apropiado a 4 °C (SB17 1x para suero o SB18 0,8x para plasma, más Tween-20 0,06 %, Z-block<sub>2</sub> 11,1 µM, MgCl<sub>2</sub> 0,44 mM, AEBSF 2,2 mM, EGTA 1,1 mM, EDTA 55,6 µM). Esta placa se almacenó en hielo hasta que las siguientes etapas de dilución de muestras se iniciaron en el robot BiomekFxP.

Para comenzar el equilibrado de muestras y aptámeros, la placa de muestras 10 % se centrifugó brevemente y se colocó en el Beckman FX donde se mezcló pipeteando arriba y abajo con el pipeteador de 96 pocillos. Después se preparó una placa de muestras 0,632 % (2x final) diluyendo 6 µl de la muestra 10 % en 89 µl de SB17 1x Tween-20 0,05 % con AEBSF 2 mM. A continuación, la dilución de 6 µl de la muestra 0,632 % resultante en 184 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % realizó una placa de muestras 0,02 % (2x final). Se realizaron diluciones en el Beckman Biomek FxP. Después de cada transferencia, las soluciones se mezclaron pipeteando arriba y abajo. Las 3 placas de dilución de muestras se transfirieron después a sus soluciones de aptámeros respectivos añadiendo 55 µl de la muestra a 55 µl de la mezcla de aptámeros 2x. Las soluciones de muestras y aptámeros se mezclaron en el robot pipeteando arriba y abajo.

#### 60 3. Unión de equilibrado de muestras

Las placas de muestras/aptámeros se precintaron con papel de aluminio y se colocaron en un incubador a 37 °C durante 3,5 horas antes de continuar a la etapa de Captura 1.

## 4. Preparación de placa de perlas de Captura 2

Se lavó una alícuota de 11 ml de perlas de estreptavidina C1 MyOne (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) (10 mg/ml) 2 veces con volúmenes iguales de NaOH 20 mM (incubación de 5 minutos para cada lavado), 3 veces con volúmenes iguales de SB17 1x, Tween-20 0,05 % y se resuspendió en 11 ml de SB17 1x, Tween-20 0,05 %. Usando un pipeteador multicanal de 12 canales, se pipetearon manualmente 50 µl de esta solución en cada pocillo de una placa de Hybaid de 96 pocillos. La placa se cubrió después con papel de aluminio y se almacenó a 4 °C para su uso en el ensayo.

## 10 5. Preparación de placa de perlas de Captura 1

Se equilibraron tres placas de Millipore HV de 0,45 µm (membrana Durapore, Cat n.º MAHVN4550) con 100 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % durante al menos 10 minutos. El tampón de equilibrado se filtró después a través de la placa y se añadieron 133,3 µl de una suspensión de perlas de estreptavidina-agarosa 7,5 % (en SB17 1x, Tween-20 0,05 %) a cada pocillo. Para mantener las perlas de estreptavidina-agarosa suspendidas mientras se transfieren a la placa de filtro, la solución de perlas se mezcló manualmente con un pipeteador de 12 canales de 200 µl, al menos 6 veces entre acontecimientos de pipeteo. Después de distribuirse las perlas a través de las 3 placas de filtro, se aplicó un vacío para retirar el sobrenadante de perlas. Finalmente, las perlas se lavaron en las placas de filtro con 200 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % y después se resuspendieron en 200 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 %. Los fondos de las placas de filtro se transfirieron y las placas se almacenaron para su uso en el ensayo.

## 6. Carga del Cytomat

El cytomat se cargó con todas las puntas, placas, todos los reactivos en canales (excepto reactivo de NHS-biotina que se preparó de nuevo justo antes de la adición a las placas), 3 placas de filtro de Captura 1 preparadas y 1 placa MyOne preparada.

## 7. Captura 1

Después de un tiempo de equilibrado de 3,5 horas, las placas de muestras/aptámeros se retiraron del incubador, se centrifugaron durante aproximadamente 1 minuto, se retiró la cubierta y se colocó en la plataforma del Beckman Biomek FxP. Se inició el programa de Beckman Biomek FxP. Todas las etapas posteriores en la Captura 1 fueron realizadas por el robot Beckman Biomek FxP a menos que se indique otra cosa. Dentro del programa, el vacío se aplicó a las placas de filtro de Captura 1 para retirar el sobrenadante de perlas. Se añadieron cien microlitros de cada una de las reacciones de unión de equilibrado 5 %, 0,316 % y 0,01 % a sus placas de filtración de Captura 1 respectivas, y cada placa se mezcló usando un agitador orbital en plataforma a 800 rpm durante 10 minutos.

Se retiró solución no unida mediante filtración al vacío. Las perlas de Captura 1 se lavaron con 190 µl de biotina 100 µM en SB17 1x, Tween-20 0,05 % seguido de 5x 190 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % distribuyendo la solución y extrayendo inmediatamente un vacío para filtrar la solución a través de la placa.

## 8. Marcaje

Se descongeló una alícuota de NHS-PEO4-biotina 100 mM en DMSO anhidro se descongeló a 37 °C durante 6 minutos y se diluyó después 1:100 con tampón de marcaje (SB17 a pH 7,25, Tween-20 0,05 %). Tras un impulso de robot, el reactivo de NHS-PEO4-biotina diluido se añadió manualmente a un surco en plataforma y el programa de robot se reinició manualmente para distribuir 100 µl de la NHS-PEO4-biotina en cada pocillo de cada placa de filtro de Captura 1. Se permitió que esta solución se incubara con perlas de Captura 1 agitando a 800 rpm durante 5 minutos en los agitadores orbitales.

## 9. Exposición cinética y fotoescisión

La reacción de marcaje se retiró por filtración al vacío y se detuvo mediante la adición de 150 µl de glicina 20 mM en SB17 1x, Tween-20 0,05 % a las placas de Captura 1. La solución de marcador de NHS/glicina se retiró mediante filtración al vacío. A continuación, se añadieron 1500 µl de glicina 20 mM (SB17 1x, Tween-20 0,05 %) a cada placa y se incubaron durante 1 minuto en agitadores orbitales a 800 rpm antes de retirada por filtración al vacío.

Los pocillos de las placas de Captura 1 se lavaron posteriormente tres veces añadiendo 190 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 %, seguido de filtración al vacío y después añadiendo 190 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % con agitación durante 1 minuto a 800 rpm seguido de filtración al vacío. Después del último lavado las placas se colocaron sobre una placa de pocillos de 1 ml de profundidad y se retiraron de la plataforma. Las placas de Captura 1 se centrifugaron a 1000 rpm durante 1 minuto para retirar tanto volumen superfluo de las perlas de agarosa antes de la elución como fuera posible.

Las placas se colocaron de nuevo en el Beckman Biomek FxP y 85 µl de DxSO4 10 mM en SB17 1x, se añadió Tween-20 0,05 % a cada pocillo de las placas de filtro.

Las placas de filtro se retiraron de la plataforma, se colocaron en un termoagitador Variomag (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA) bajo las fuentes de luz BlackRay (Ted Pella, Inc., Redding, CA) y se irradiaron durante 5 minutos agitando al mismo tiempo a 800 rpm. Después de la incubación de 5 minutos las placas se rotaron 180 grados y se irradiaron con agitación durante 5 minutos más.

5 Las soluciones fotoescindidas se eluyeron secuencialmente de cada placa de Captura 1 a una placa de pocillos profundos comunes colocando en primer lugar la placa de filtro de Captura 1 5 % sobre una placa de pocillos profundos de 1 ml y centrifugando a 1000 rpm durante 1 minuto. Las placas de Captura 1 0,316 % y 0,01 % se centrifugaron después secuencialmente en la misma placa de pocillos profundos.

10 10. Captura de perla de Captura 2

El bloque de pocillos de 1 ml de profundidad que contiene los eluatos combinados de Captura 1 se colocó en la plataforma del Beckman Biomek FxP para Captura 2.

15 El robot transfirió todo el eluato fotoescindido de la placa de pocillos de 1 ml de profundidad en la placa de Hybaid que contiene las perlas magnéticas MyOne de Captura 2 previamente preparadas (después de retirada del tampón MyOne mediante separación magnética).

20 La solución se incubó agitando al mismo tiempo a 1350 rpm durante 5 minutos a 25 °C en un termoagitador Variomag (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA).

El robot transfirió la placa a la estación separadora magnética en plataforma. La placa se incubó en el imán durante 90 segundos antes de la retirada y de descartar el sobrenadante.

25 Lavados de glicerol 30 % a 11,37 °C

30 La placa de Captura 2 se movió al agitador térmico en plataforma y se transfirieron 75 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % a cada pocillo. La placa se mezcló durante 1 minuto a 1350 rpm y 37 °C para resuspender y calentar las perlas. A cada pocillo de la placa de Captura 2, se transfirieron 75 µl de glicerol 60 % a 37 °C y la placa continuó mezclándose durante otro minuto a 1350 rpm y 37 °C. El robot transfirió la placa al separador magnético a 37 °C donde se incubó en el imán durante 2 minutos y después el robot retiró y descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron dos veces más.

35 Después de retirada del tercer lavado de glicerol 30 % de las perlas de Captura 2, se añadieron 150 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % a cada pocillo y se incubó a 37 °C, agitando a 1350 rpm durante 1 minuto, antes de la retirada por separación magnética en el imán a 37 °C.

40 Las perlas de Captura 2 se lavaron una vez final usando 150 µl de SB17 1x, Tween-20 0,05 % con incubación durante 1 minuto agitando al mismo tiempo a 1350 rpm a 25 °C antes de separación magnética.

12. Elución y neutralización de perlas de Captura 2

45 Los aptámeros se eluyeron de perlas de Captura 2 añadiendo 105 µl de CAPSO 100 mM con NaCl 1 M, Tween-20 0,05 % a cada pocillo. Las perlas se incubaron con esta solución con agitación a 1300 rpm durante 5 minutos.

50 La placa de Captura 2 se colocó después en el separador magnético durante 90 segundos antes de transferir 63 µl del eluato a una nueva placa de 96 pocillos que contenían 7 µl de HCl 500 mM, HEPES 500 mM, Tween-20 0,05 % en cada pocillo. Después de la transferencia, la solución se mezcló robóticamente pipeteando 60 µl arriba y abajo cinco veces.

13. Hibridación

55 El Beckman Biomek FxP transfirió 20 µl del eluato de Captura 2 neutralizado a una placa de Hybaid nueva, y se añadieron 6 µl de Agilent Block 10x, que contenía una adición 10x de controles de hibridación, a cada pocillo. A continuación, se pipetearon 30 µl de tampón de hibridación Agilent 2x manualmente a cada pocillo de la placa que contiene las muestras neutralizadas y tampón de bloqueo y la solución se mezcló pipeteando manualmente 25 µl arriba y abajo 15 veces lentamente para evitar la formación de burbujas extensiva. La placa se centrifugó a 1000 rpm durante 1 minuto.

60 Se diseñaron portaobjetos de micromatrices Agilent adaptados (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA) para contener sondas complementarias de la región aleatoria de aptámero más alguna región de cebador. Para la mayoría de los aptámeros, la longitud óptima de la secuencia complementaria se determinó de forma empírica y varió entre 40-50 nucleótidos. Para aptámeros posteriores se eligió por defecto una región complementaria de 46 unidades. Las sondas se unieron a la superficie de portaobjetos con un enlazador poli T para una longitud de sonda total de 60 nucleótidos.

Se colocó un portaobjetos de junta en una cámara de hibridación Agilent y se pipetearon 40 µl de cada una de las muestras que contenían solución de hibridación y bloqueo manualmente en cada junta. Se usó un pipeteador de alcance variable de 8 canales de una manera que se pretende que minimice la formación de burbujas. Se bajaron lentamente portaobjetos de micromatrices Agilent adaptados (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA), con su código de barras numérico hacia arriba, en los portaobjetos de junta (véase el manual de Agilent para una descripción detallada).

La parte superior de las cámaras de hibridación se colocó en el sándwich de portaobjetos/refuerzo y se colocaron soportes de sujeción sobre el conjunto completo. Estos conjuntos sujetaron estrechamente girando los tornillos firmemente.

Cada sándwich de portaobjetos/portaobjetos de refuerzo se inspeccionó visualmente para asegurar que las burbujas de la solución pudieran moverse libremente dentro de la muestra. Si la burbuja no se movieran libremente el conjunto de cámaras de hibridación se golpeó suavemente para desprender burbujas alojadas cerca de la junta.

Las cámaras de hibridación ensambladas se incubaron en un horno de hibridación Agilent durante 19 horas a 60 °C rotando a 20 rpm.

#### 14. Lavado posthibridación

Se colocaron aproximadamente 400 ml de tampón de lavado Agilent 1 en cada una de dos placas de tinción de vidrio separadas. Una de las placas de tinción se colocó en una placa de agitación magnética y se colocaron una rejilla de portaobjetos y barra de agitación en el tampón.

Una placa de tinción para lavado Agilent 2 se preparó colocando una barra de agitación en una placa de tinción de vidrio vacía.

Se separó una cuarta placa de tinción de vidrio para el lavado de acetonitrilo final.

Se desmontó cada una de las seis cámaras de hibridación. Uno por uno, el sándwich de portaobjetos/refuerzo se retiró de su cámara de hibridación y se sumergieron en la placa de tinción que contenía Lavado 1. El sándwich de portaobjetos/refuerzo se abrió usando un par de pinzas, sumergiendo aún el portaobjetos de micromatrices. El portaobjetos se transfirió rápidamente a la rejilla de portaobjetos en la placa de tinción de Lavado 1 en la placa de agitación magnética.

La rejilla de portaobjetos se elevó y se bajó suavemente 5 veces. El agitador magnético se activó a un ajuste bajo y los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos.

Cuando quedaba un minuto para Lavado 1, el tampón de lavado 2 precalentado a 37 °C en un incubador se añadió a la segunda placa de tinción preparada. La rejilla de portaobjetos se transfirió rápidamente a tampón de lavado 2 y se retiró cualquier tampón en exceso en el fondo de la rejilla raspándolo en la parte superior de la placa de tinción. La rejilla de portaobjetos se elevó y se bajó suavemente 5 veces. El agitador magnético se activó a un ajuste bajo y los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos.

La rejilla de portaobjetos se sacó lentamente del Lavado 2, tardando aproximadamente 15 segundos en retirar los portaobjetos de la solución.

Con un minuto restante en el Lavado 2 se añadió acetonitrilo (ACN) a la cuarta placa de tinción. La rejilla de portaobjetos se transfirió a la placa de tinción de acetonitrilo. La rejilla de portaobjetos se elevó y se bajó suavemente 5 veces. El agitador magnético se activó a un ajuste bajo y los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos.

La rejilla de portaobjetos se extrajo lentamente de la placa de tinción de ACN y se colocó en una toalla absorbente. Los bordes inferiores de los portaobjetos se secaron rápidamente y el portaobjetos se colocó en una caja de portaobjetos limpia.

#### 15. Captura de imágenes de micromatrices

Los portaobjetos de micromatrices se colocaron en recipientes de portaobjetos de explorador Agilent y se cargaron en el explorador de micromatrices Agilent según las instrucciones del fabricante.

Se capturaron imágenes de los portaobjetos en el canal Cy3 a una resolución de 5 µm con el ajuste de PMT 100 % y la opción de XRD activada a 0,05. Las imágenes tiff resultantes se procesaron usando software de extracción de elementos Agilent versión 10.5.

65

**Ejemplo 2. Identificación de biomarcadores**

La identificación de biomarcadores de CPNM potenciales se realizó para diagnóstico de CPNM en individuos con nódulos pulmonares indeterminados identificados con una exploración de TC u otro método de captura de imágenes, exploración de fumadores de alto riesgo para CPNM y diagnóstico de un individuo con CPNM. Los criterios de admisión para este estudio fueron fumadores, 18 años de edad o mayor, capaz de proporcionar consentimiento informado y muestra de sangre y diagnóstico documentado de CPNM o hallazgos benignos. Para algunos casos, se recogieron muestras de sangre antes del tratamiento o cirugía y se les diagnosticó después CPNM. Los criterios de exclusión incluyeron diagnóstico o tratamiento previo de cáncer (excluyendo carcinoma de células escamosas de la piel) en un periodo de 5 años antes de la extracción de sangre. Se recogieron muestras de suero de 3 sitios diferentes e incluyeron 46 muestras de CPNM y 218 muestras de grupo de control como se describe en la Tabla 17. El ensayo de afinidad de aptámeros múltiple como se describe en el Ejemplo 1 se usó para medir y presentar el valor de UFR para 1.034 analitos en cada una de estas 264 muestras.

Cada una de las poblaciones de caso y de control se comparó por separado generando funciones de distribución acumulada (fda) dependiente de clase para cada uno de los 1034 analitos. La distancia KS (estadístico Kolmogorov-Smirnov) entre valores de dos conjuntos de muestras es una medición no paramétrica de la medida en que la distribución empírica de los valores de un conjunto (Conjunto A) difiere de la distribución de valores del otro conjunto (Conjunto B). Para cualquier valor de un umbral T alguna proporción de los valores del conjunto A será menor que T, y alguna proporción de los valores del conjunto B será menor que T. La distancia KS mide la diferencia máxima (sin signo) entre la proporción de los valores de los dos conjuntos para cualquier T elegido.

Este conjunto de biomarcadores potenciales puede usarse para construir clasificadores que asignen muestras a un grupo de control o enfermedad. De hecho, se produjeron muchos de dichos clasificadores a partir de estos conjuntos de biomarcadores y se determinó la frecuencia con la que cualquier biomarcador se usó en clasificadores de buena puntuación. Los biomarcadores que aparecieron con más frecuencia entre los clasificadores de mayor puntuación fueron los más útiles para crear un ensayo de diagnóstico. En este ejemplo, se usaron clasificadores bayesianos para explorar el espacio de clasificación pero puede emplearse muchas otras técnicas de aprendizaje supervisadas para este fin. El ajuste de puntuación de cualquier clasificador individual se calibró por el área bajo la curva de característica operativa receptora (ABC de la ROC) del clasificador en la superficie bayesiana suponiendo una prevalencia de enfermedad de 0,5. Esta métrica de puntuación varía de cero a uno, siendo uno un clasificador sin errores. Los detalles de la construcción de un clasificador bayesiano a partir de mediciones de población de biomarcadores se describen en el

**Ejemplo 3.**

Usando los 59 analitos en la Tabla 1, se descubrió un total de 964 clasificadores de 10 analitos con una ABC de 0,94 para diagnosticar CPNM del grupo de control. A partir de este conjunto de clasificadores, se descubrió que un total de 12 biomarcadores estaban presentes en 30 % o más de los clasificadores de alta puntuación. La Tabla 13 proporciona una lista de estos biomarcadores potenciales y la Figura 10 es una representación de frecuencia para los biomarcadores identificados.

**Ejemplo 3. Clasificación bayesiana simple para CPNM**

A partir de la lista de biomarcadores identificados como útiles para diferenciar entre CPNM y controles, se seleccionó un panel de diez biomarcadores y se construyó un clasificador bayesiano simple, véase Tablas 16 y 18. Las funciones de densidad de probabilidad (fdp) dependientes de clase,  $p(x_i|c)$  y  $p(x_i|d)$ , donde  $x_i$  es el log del valor de UFR medido para el biomarcador  $i$ , y  $c$  y  $d$  se refieren a las poblaciones de control y enfermedad, se modelaron como funciones de distribución log-normal caracterizadas por una media  $\mu$  y varianza  $\sigma^2$ . Los biomarcadores para fdp de los diez biomarcadores se enumeran en la Tabla 16 y se presenta un ejemplo de los datos sin procesar junto con el modelo ajustado a una fdp normal en la Figura 5. La suposición subyacente parece ajustarse a los datos bastante bien como demuestra la Figura 5.

La clasificación bayesiana simple para dicho modelo es proporcionada por la siguiente ecuación, donde  $p(d)$  es la prevalencia de la enfermedad en la población,

$$\ln \left( \frac{p(d|\tilde{x})}{p(c|\tilde{x})} \right) = \sum_{i=1}^n \ln \left( \frac{\sigma_{c,i}}{\sigma_{d,i}} \right) - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \left[ \left( \frac{x_i - \mu_{d,i}}{\sigma_{d,i}} \right)^2 - \left( \frac{x_i - \mu_{c,i}}{\sigma_{c,i}} \right)^2 \right] + \ln \left( \frac{p(d)}{1 - p(d)} \right)$$

apropiada para el ensayo y  $n = 10$ . Cada uno de los términos en la suma es una relación de probabilidad logarítmica para un marcador individual y la relación de probabilidad logarítmica total de una muestra  $\tilde{x}$  que está exenta de la enfermedad de interés (es decir, en este caso, CPNM) frente a una que tiene la enfermedad es sencillamente la suma de estos términos individuales más un término que contabiliza la prevalencia de la enfermedad.

Por simplicidad, se supone que  $p(d) = 0,5$  de modo que

$$\ln \left( \frac{p(d)}{1 - p(d)} \right) = 0.$$

5 dada una medición de muestra desconocida en  $\log(\text{UFR})$  para cada uno de los diez biomarcadores de 6,9, 8,7, 7,9, 9,8, 8,4, 10,6, 7,3, 6,3, 7,3, 8,1, el cálculo de la clasificación se detalla en la Tabla 16. Los componentes individuales que comprenden la relación de probabilidad logarítmica para clase de enfermedad frente a control se tabulan y pueden calcularse a partir de los parámetros en la Tabla 16 y los valores de  $\ln$ . La suma de las relaciones de probabilidad logarítmica individuales es  $-11,584$ , o una probabilidad de estar exento de la enfermedad frente a tener la enfermedad de 107.386, donde la probabilidad  $e^{11,584} = 107.386$ . Los primeros 3 valores de biomarcadores tienen probabilidades más coherentes con el grupo de enfermedad (probabilidad  $\log > 0$ ) pero se ha descubierto uniformemente que los 7 biomarcadores restantes favorecen el grupo de control. La multiplicación de las probabilidades entre sí proporciona los mismos resultados que el mostrado anteriormente; una probabilidad de 107.386 de que la muestra desconocida esté exenta de la enfermedad. De hecho, esta muestra vino de la población de control en el conjunto de entrenamiento.

**Ejemplo 4. Algoritmo ávido para seleccionar paneles de biomarcadores con respecto a clasificadores.**

20 Este ejemplo describe la selección de biomarcadores de la Tabla 1 para formar paneles que puedan usarse como clasificadores en cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Se seleccionaron subconjuntos de los biomarcadores en la Tabla 1 para construir clasificadores con buen rendimiento. Este método también se usó para determinar qué marcadores potenciales se incluían como biomarcadores en el Ejemplo 2.

25 La medida de rendimiento de clasificador usada en el presente documento es la ABC; un rendimiento de 0,5 es la expectativa basal para un clasificador aleatorio (lanzamiento de moneda), un clasificador peor que el aleatorio tendría una puntuación entre 0,0 y 0,5, un clasificador con rendimiento mejor que el aleatorio tendría una puntuación entre 0,5 y 1,0. Un clasificador perfecto sin errores tendría una sensibilidad de 1,0 y una especificidad de 1,0. Se pueden aplicar los métodos descritos en el Ejemplo 4 a otras medidas habituales de rendimiento tales como la medida F, la suma de sensibilidad y especificidad o el producto de sensibilidad y especificidad. Se podría desear específicamente tratar la sensibilidad y especificidad con diferente peso, para seleccionar los clasificadores que rinden con mayor especificidad a costa de algo de sensibilidad o para seleccionar los clasificadores que rinden con mayor sensibilidad a costa de algo de especificidad. Ya que el método descrito aquí solamente implica una medida de «rendimiento», puede usarse cualquier esquema de ponderación que dé como resultado una única medida de rendimiento. Diferentes aplicaciones tendrán diferentes beneficios para hallazgos de verdadero positivo y verdadero negativo y también diferentes costes asociados con hallazgos de falso positivo con respecto a hallazgos de falso negativo. Por ejemplo, la exploración de fumadores asintomáticos y el diagnóstico diferencial de nódulos benignos hallados en TC no tendrá en general la misma contrapartida óptima entre especificidad y sensibilidad. Las diferentes demandas de los dos ensayos requerirán en general determinar diferente ponderación para clasificaciones erróneas positivas y negativas, lo que se refleja en la medida de rendimiento. El cambio de la medida de rendimiento cambiará en general el subconjunto exacto de marcadores seleccionados de la Tabla 1 para un conjunto de datos dado.

45 Para el enfoque bayesiano para la diferenciación de muestras de CPNM de muestras de control descritas en el Ejemplo 3, el clasificador se parametrizó completamente por las distribuciones de biomarcadores en las muestras de entrenamiento de enfermedad y benignas y la lista de biomarcadores se eligió de la Tabla 1; es decir, el subconjunto de marcadores elegido para inclusión determinó un clasificador de una manera uno a uno dado un conjunto de datos de entrenamiento.

50 El método ávido empleado aquí se usó para buscar el subconjunto óptimo de marcadores de la Tabla 1. Para números pequeños de marcadores o clasificadores con relativamente pocos marcadores, cada posible subconjunto de marcadores se enumeró y se evaluó con respecto al rendimiento del clasificador construido con ese conjunto de marcadores particular (véase Ejemplo 4, Parte 2). (Este enfoque se conoce bien en el campo de la estadística como «selección de mejor subconjunto»; véase, por ejemplo, Hastie *et al*). Sin embargo, para los clasificadores descritos en el presente documento, el número de combinaciones de múltiples marcadores puede ser muy grande y no fue factible evaluar cada posible conjunto de 10 marcadores, ya que hay 30.045.015 posibles combinaciones que pueden generarse de una lista de solamente 30 analitos totales. Debido a la inviabilidad de buscar en cada subconjunto de marcadores, puede no encontrarse el subconjunto óptimo individual; sin embargo, usando este enfoque, se descubrieron muchos subconjuntos excelentes y, en muchos casos, cualquiera de estos subconjuntos puede representar uno óptimo.

60 En lugar de evaluar cada posible conjunto de marcadores, puede seguirse un enfoque por etapas directo «ávido» (véase, por ejemplo, Dabney AR, Storey JD (2007) Optimality Driven Nearest Centroid Classification from Genomic Data. PLoS ONE 2(10): e1002. doi:10.1371/journal.pone.0001002). Usando este método, se inicia un clasificador con el mejor marcador individual (basado en la distancia KS para los marcadores individuales) y se deja crecer en cada

etapa probando, a su vez, cada miembro de una lista de marcadores que no es actualmente un miembro del conjunto de marcadores en el clasificador. El marcador que puntúa mejor en combinación con el clasificador existente se añade al clasificador. Esto se repite hasta que no se consigue mejora adicional en el rendimiento. Desafortunadamente, este enfoque puede obviar combinaciones valiosas de marcadores para las que algunos de los marcadores individuales no se han elegido todos antes de que se detenga el proceso.

El procedimiento ávido usado aquí fue una elaboración del enfoque por etapas directo precedente, porque, para ampliar la búsqueda, en lugar de mantener solamente un único clasificador candidato (subconjunto de marcadores) en cada etapa, se mantuvo una lista de clasificadores candidatos. La lista se sembró con cada posible subconjunto de marcadores individual (usando cada marcador en la tabla por sí solo). La lista se expandió en etapas obteniendo nuevos clasificadores (subconjuntos de marcadores) de los que están actualmente en la lista y añadiéndolos a la lista. Cada subconjunto de marcadores actualmente en la lista se extendió añadiendo cualquier marcador de la Tabla 1 que no es parte ya de ese clasificador, y que, tras su adición al subconjunto, no duplicaría un subconjunto existente (estos se denominan «marcadores permisibles»). Cada subconjunto de marcadores existente se extendió por cada marcador permisible de la lista. Claramente, dicho proceso generaría con el tiempo cada posible subconjunto y la lista se quedaría sin espacio. Por lo tanto, todos los clasificadores generados se mantuvieron solamente mientras la lista fuera de un tamaño menor que cierto tamaño predeterminado (con frecuencia suficiente para contener los tres subconjuntos marcadores). Una vez que la lista alcanzó el límite de tamaño predeterminado, se hizo elitista; es decir, solamente los clasificadores que mostraron un nivel determinado de rendimiento se mantuvieron en la lista, y los otros salieron de la lista y se perdieron. Esto se consiguió manteniendo la lista clasificada por orden de rendimiento de clasificador; se insertaron nuevos clasificadores que eran al menos tan buenos como el peor clasificador actualmente en la lista, obligando a la expulsión del de menor rendimiento actual. Un detalle de implementación adicional es que la lista se reemplazó completamente en cada etapa generacional; por lo tanto, cada clasificador en la lista tuvo el mismo número de marcadores y en cada etapa el número de marcadores por clasificador creció en uno.

Ya que este método produjo una lista de clasificadores candidatos usando diferentes combinaciones de marcadores, se puede plantear si los clasificadores pueden combinarse para evitar errores que podrían cometerse por el mejor clasificador individual o por grupos minoritarios de los mejores clasificadores. Dichos métodos de «conjunto» y «comité de expertos» se conocen bien en los campos de aprendizaje estadístico y por máquina e incluyen, por ejemplo, «Promediación», «Votación», «Apilamiento», «Agregación» y «Refuerzo» (véase, por ejemplo, Hastie *et al.*). Estas combinaciones de clasificadores sencillos proporcionan un método para reducir la varianza en las clasificaciones debido al ruido en cualquier conjunto particular de marcadores mediante la inclusión de varios clasificadores diferentes y por lo tanto información de un conjunto mayor de los marcadores de la tabla de biomarcadores, promediando eficazmente entre los clasificadores. Un ejemplo de la utilidad de este enfoque es que puede evitar que valores atípicos en un único marcador afecten de forma adversa a la clasificación de una única muestra. El requisito de medir un gran número de señales puede ser poco práctico en ensayos de anticuerpos de «un marcador cada vez» convencionales pero no tiene desventajas para un ensayo de aptámeros múltiple. Técnicas tales como estas aprovechan una tabla más extensiva de biomarcadores y usan las múltiples fuentes de información respecto a los procesos de enfermedad para proporcionar una clasificación más robusta.

Los biomarcadores seleccionados en la Tabla 1 dan lugar a clasificadores que rinden mejor que clasificadores contruidos con «no marcadores» (es decir, proteínas que tienen señales que no cumplieron los criterios para inclusión en la Tabla 1 (como se describe en el Ejemplo 2)).

Para clasificadores que contienen solo uno, dos y tres marcadores, todos los posibles clasificadores obtenidos usando los biomarcadores en la Tabla 1 se enumeraron y se examinaron con respecto a la distribución de rendimiento en comparación con clasificadores contruidos a partir de una tabla similar de señales no marcadoras seleccionadas aleatoriamente.

En la Figura 11, la ABC se usó como la medida de rendimiento; un rendimiento de 0,5 es la expectativa basal para un clasificador aleatorio (lanzamiento de moneda). El histograma de rendimiento de clasificador se comparó con el histograma de rendimiento a partir de una enumeración exhaustiva similar de clasificadores contruidos a partir de una tabla «no marcadora» de 59 señales no marcadoras; las 59 señales se seleccionaron aleatoriamente de aptámeros que no demostraban señalización diferencial entre poblaciones de control y enfermedad.

La figura 11 muestra histogramas del rendimiento de todos los clasificadores de uno, dos y tres marcadores posibles contruidos a partir de los parámetros de biomarcadores en la Tabla 14 para biomarcadores que pueden diferenciar entre el grupo de control y CPNM y compara estos clasificadores con todos los clasificadores de uno, dos y tres marcadores posibles contruidos usando las 59 señales de UFR de aptámero «no marcadoras». La Figura 11A muestra los histogramas de rendimiento de clasificadores de un único marcador, La Figura 11B muestra el histograma de rendimiento de clasificadores de dos marcadores y la Figura 11C muestra el histograma de rendimiento de clasificadores de tres marcadores.

En la Figura 11, las líneas continuas representan los histogramas del rendimiento de clasificadores de todos los clasificadores de uno, dos y tres marcadores usando los datos de biomarcadores para fumadores y nódulos

pulmonares benignos y CPNM en la Tabla 14. Las líneas de puntos son los histogramas del rendimiento de clasificadores de todos los clasificadores de uno, dos y tres marcadores usando los datos para controles y CPNM pero usando el conjunto de señales no marcadoras aleatorias.

5 Los clasificadores construidos a partir de los marcadores enumerados en la Tabla 1 forman un histograma definido, bien separado de los clasificadores construidos con señales de los «no marcadores» para todas las comparaciones de un marcador, dos marcadores y tres marcadores. El rendimiento y la puntuación de ABC de los clasificadores  
 10 construidos a partir de los biomarcadores en la Tabla 1 también aumentan más rápido con el número de marcadores que los clasificadores construidos a partir de los no marcadores, la separación aumenta entre los clasificadores marcadores y no marcadores a medida que aumenta el número de marcadores por clasificador. Todos los clasificadores construidos usando los biomarcadores enumerados en la Tabla 14 rinden notablemente mejor que clasificadores construidos usando los «no marcadores».

15 Las distribuciones de rendimiento de clasificador muestran que hay muchos posibles clasificadores de marcadores múltiples que pueden obtenerse del conjunto de analitos en la Tabla 1. Aunque algunos biomarcadores son mejores que otros por sí solos, como demuestra la distribución de puntuaciones de clasificadores y ABC para analitos individuales, fue deseable determinar si dichos biomarcadores son necesarios para construir clasificadores de alto rendimiento. Para hacer esta determinación, el comportamiento del rendimiento de clasificador se examinó dejando fuera varios de los mejores biomarcadores. La Figura 12 compara el rendimiento de clasificadores construidos con la  
 20 lista completa de biomarcadores en la Tabla 1 con el rendimiento de clasificadores construidos con subconjuntos de biomarcadores de la Tabla 1 que excluyeron marcadores de mejor clasificación.

25 La Figura 12 demuestra que clasificadores construidos sin los mejores marcadores rindieron bien, lo que implica que el rendimiento de los clasificadores no se debió a algún grupo central pequeño de marcadores y que los cambios en los procesos subyacentes asociados con enfermedad se reflejan en las actividades de muchas proteínas. Muchos subconjuntos de los biomarcadores en la Tabla 1 rindieron casi óptimamente, incluso después de retirar los 15 superiores de los 59 marcadores de la Tabla 1. Después de descartar los 15 marcadores mejor clasificados (clasificados por distancia KS) de la Tabla 1, el rendimiento de clasificador aumentó con el número de marcadores seleccionados de la tabla hasta alcanzar una ABC de casi 0,93, cercana al rendimiento de la puntuación de  
 30 clasificador óptima de 0,948 seleccionada de la lista completa de biomarcadores.

Finalmente, la Figura 13 muestra cómo el rendimiento de ROC de clasificadores típicos construidos a partir de la lista de parámetros en la Tabla 14 según el Ejemplo 3. Se construyó un clasificador de cinco analitos con MMP7, CLIC1, STX1A, CHRDL1 y PA2G4. La Figura 13A muestra el rendimiento del modelo, suponiendo independencia de  
 35 estos marcadores, como en el Ejemplo 3 y la Figura 13B muestra las curvas de ROC empíricas generadas a partir de los conjuntos de datos del estudio usado para definir los parámetros en la Tabla 14. Puede verse que el rendimiento para un número dado de marcadores seleccionados estuvo cualitativamente de acuerdo, y ese acuerdo cuantitativo fue en general bastante bueno, como se demuestra por las ABC, aunque el cálculo de modelo tiende a sobreestimar el rendimiento de clasificador. Esto es coherente con la noción de que la información aportada por cualquier biomarcador particular respecto a los procesos de enfermedad es redundante con la información aportada por otros biomarcadores proporcionados en la Tabla 1 mientras que el cálculo de modelo supone independencia completa. La Figura 13 demuestra por lo tanto que la Tabla 1 en combinación con los métodos descritos en el Ejemplo 3 permite la construcción y evaluación de una gran cantidad de clasificadores útiles para la diferenciación de CPNM del grupo de control.  
 45

**Ejemplo 5. Panel de biomarcadores clínicos**

Se construyó un clasificador de bosque aleatorio a partir de un panel de biomarcadores seleccionados que puede ser el más apropiado para uso en un ensayo de diagnóstico clínico. A diferencia de los modelos seleccionados por el algoritmo directo ávido bayesiano simple, el clasificador de bosque aleatorio no supone que las mediciones de biomarcadores se distribuyan aleatoriamente. Por lo tanto este modelo puede utilizar biomarcadores de la Tabla 1 que no son eficaces en el clasificador bayesiano simple.  
 50

El panel se seleccionó usando un procedimiento de eliminación inverso que utilizó la medición de importancia de gini proporcionada por el clasificador de bosque aleatorio. La importancia de gini es una medida de la eficacia de un biomarcador en la clasificación correcta de muestras en el conjunto de entrenamiento.  
 55

Esta medida de importancia del biomarcador puede usarse para eliminar marcadores que son menos vitales para el rendimiento del clasificador. El procedimiento de eliminación inverso se inició construyendo un clasificador de bosque aleatorio que incluyó los 59 en la Tabla 1. El biomarcador menos importante se eliminó después y se construyó un nuevo modelo con los biomarcadores restantes. Este procedimiento continuó hasta que solamente permanecieron biomarcadores individuales.  
 60

El panel final que se seleccionó proporcionó el mejor equilibrio entre la mayor ABC y el menor número de marcadores en el modelo. El panel de 8 biomarcadores que satisfizo estos criterios está compuesto de los siguientes analitos, MMP12, MMP7, KLK3-SERPINA3, CRP, C9, CNDP1, CA6 y EGFR. Se muestra una representación de la  
 65

curva de ROC para este panel de biomarcadores en la Figura 14. La sensibilidad de este modelo es 0,70 con una especificidad correspondiente de 0,89.

**Ejemplo 6. Biomarcadores para el diagnóstico de cáncer**

5 Se realizó la identificación de biomarcadores potenciales para el diagnóstico general de cáncer. Se evaluaron muestras tanto de caso como de control de 3 tipos diferentes de cáncer (cáncer de pulmón, mesotelioma y carcinoma de células renales). En todos los sitios, los criterios de inclusión fueron edad de al menos 18 años con consentimiento informado firmado. Se excluyeron tanto casos como controles para neoplasias malignas conocidas distintas del cáncer en cuestión.

**Cáncer de pulmón.** Se obtuvieron muestras de caso y de control como se describe en el Ejemplo 2. Se usaron un total de 46 casos y 218 controles en este Ejemplo.

15 **Mesotelioma pleural.** Se obtuvieron muestras de caso y de control de un biodepósito de centro académico de cáncer para identificar marcadores potenciales para el diagnóstico diferencial de mesotelioma pleural de enfermedad de pulmón benigna, incluyendo hallazgos radiológicos sospechosos que posteriormente se diagnosticaron como no malignos. Se usaron un total de 124 casos de mesotelioma y 138 controles expuestos a amianto en este Ejemplo.

20 **Carcinoma de células renales.** Se obtuvieron muestras de caso y de control de un biodepósito de centro de cáncer académico de pacientes con carcinoma de células renales (CCR) y masas benignas (BEN). Se obtuvieron muestras prequirúrgicas (TP1) para todos los sujetos. El análisis primario comparó datos de resultado (como se registró en el campo de base de datos de SEER Estado de CA 1) para los enfermos de CCR con «pruebas de enfermedad» (PRE) frente a «sin pruebas de enfermedad» (SPE) documentadas mediante seguimiento clínico. Se usaron un total de 38 casos de PRE y 104 controles de SPE en este Ejemplo.

30 Se identificó una lista final de biomarcadores de cáncer combinando los conjuntos de biomarcadores considerados para cada uno de los 3 estudios de cáncer diferentes. Se construyeron sucesivamente clasificadores bayesianos que usaron conjuntos de biomarcadores de tamaño creciente usando un algoritmo ávido (como se describe en más detalle en la sección 6.2 de este Ejemplo). Los conjuntos (o paneles) de biomarcadores que fueron útiles para diagnosticar cáncer en general entre los diferentes sitios y tipos de cáncer se compilaron como una función del tamaño del conjunto (o panel) y se analizaron con respecto a su rendimiento. Este análisis dio como resultado la lista de 23 biomarcadores de cáncer mostrada en la Tabla 19, cada uno de los cuales estaba presente en al menos uno de estos conjuntos de marcadores sucesivos, que variaban de tamaño de tres a diez marcadores. Como ejemplo ilustrativo, se describe la generación de un panel específico compuesto de diez biomarcadores de cáncer, que se muestra en la Tabla 32.

**6.1 Clasificación bayesiana simple para cáncer**

40 A partir de la lista de biomarcadores en la Tabla 1, se seleccionó un panel de diez biomarcadores de cáncer potenciales usando un algoritmo ávido para selección de biomarcadores, como se perfila en la Sección 6.2 de este Ejemplo. Se construyó un clasificador bayesiano simple distinto para cada uno de los 3. Las funciones de densidad de probabilidad (fdp) dependientes de clase,  $p(x_i|c)$  y  $p(x_i|d)$ , donde  $x_i$  es el log del valor de UFR medido para el biomarcador  $i$ , y  $c$  y  $d$  se refieren a las poblaciones de control y enfermedad, se modelaron como funciones de distribución log-normal caracterizadas por una media  $\mu$  y varianza  $\sigma^2$ . Los parámetros para fdp de los 3 modelos compuestos por los diez biomarcadores potenciales se enumeran en la Tabla 31.

50 La clasificación bayesiana simple para dicho modelo es proporcionada por la siguiente ecuación, donde  $p(d)$  es la prevalencia de la enfermedad en la población

$$\ln \left( \frac{p(d|\hat{x})}{p(c|\hat{x})} \right) = \sum_{i=1}^n \ln \left( \frac{\sigma_{c,i}}{\sigma_{d,i}} \right) - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \left[ \left( \frac{x_i - \mu_{d,i}}{\sigma_{d,i}} \right)^2 - \left( \frac{x_i - \mu_{c,i}}{\sigma_{c,i}} \right)^2 \right] + \ln \left( \frac{p(d)}{1 - p(d)} \right)$$

55 apropiada para el ensayo y  $n = 10$ . Cada uno de los términos en la suma es una relación de probabilidad logarítmica para un marcador individual y la relación de probabilidad logarítmica total de que una muestra  $\hat{x}$  esté exenta de la enfermedad de interés (es decir, en este caso, cada enfermedad particular de los 3 tipos de cáncer diferentes) frente a que tenga la enfermedad es sencillamente la suma de estos términos individuales más un término que contabiliza

la prevalencia de la enfermedad. Por simplicidad, se supone que  $p(d) = 0,5$  de modo que  $\ln \left( \frac{p(d)}{1 - p(d)} \right) = 0$ .

60 Dada una medición de muestra desconocida en log(UFR) para cada uno de los diez biomarcadores de 9,5, 8,8, 7,8, 8,3, 9,4, 7,0, 7,9, 6,3, 7,7, 10,6, el cálculo de la clasificación se detalla en la Tabla 32. Los componentes individuales que comprenden la relación de probabilidad logarítmica para clase de enfermedad frente a control se tabulan y

pueden calcularse a partir de los parámetros en la Tabla 31 y los valores de  $\tilde{x}$ . La suma de las relaciones de probabilidad logarítmica individuales es -3,326, o una probabilidad de estar exento de la enfermedad frente a tener la enfermedad de 28, donde la probabilidad  $e^{3,326} = 28$ . Los primeros 4 valores de biomarcadores tienen probabilidades más coherentes con el grupo de enfermedad (probabilidad  $\log > 0$ ) pero se ha descubierto uniformemente que los 6 biomarcadores restantes favorecen el grupo de control. La multiplicación de las probabilidades entre sí proporciona los mismos resultados que el mostrado anteriormente; una probabilidad de 28 de que la muestra desconocida esté exenta de la enfermedad. De hecho, esta muestra vino de la población de control en el conjunto de entrenamiento de carcinoma de células renales.

10 **6.1 Clasificación bayesiana simple para cáncer**

A partir de la lista de biomarcadores en la Tabla 1, se seleccionó un panel de diez biomarcadores de cáncer potenciales usando un algoritmo ávido para selección de biomarcadores, como se perfila en la Sección 6.2 de este Ejemplo. Se construyó un clasificador bayesiano simple distinto para cada uno de los 3 tipos de cáncer diferentes. Las funciones de densidad de probabilidad (fdp) dependientes de clase,  $p(x_i|c)$  y  $p(x_i|d)$ , donde  $x_i$  es el log del valor de UFR medido para el biomarcador  $i$ , y  $c$  y  $d$  se refieren a las poblaciones de control y enfermedad, se modelaron como funciones de distribución log-normal caracterizadas por una media  $\mu$  y varianza  $\sigma^2$ . Los parámetros para fdp de los 3 modelos compuestos por los diez biomarcadores potenciales se enumeran en la Tabla 31.

20 La clasificación bayesiana simple para dicho modelo es proporcionada por la siguiente ecuación, donde  $p(d)$  es la prevalencia de la enfermedad en la población,

$$\ln \left( \frac{p(d|\tilde{x})}{p(c|\tilde{x})} \right) = \sum_{i=1}^n \ln \left( \frac{\sigma_{c,i}}{\sigma_{d,i}} \right) - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \left[ \left( \frac{x_i - \mu_{d,i}}{\sigma_{d,i}} \right)^2 - \left( \frac{x_i - \mu_{c,i}}{\sigma_{c,i}} \right)^2 \right] + \ln \left( \frac{p(d)}{1 - p(d)} \right)$$

25 apropiada para el ensayo y  $n = 10$ . Cada uno de los términos en la suma es una relación de probabilidad logarítmica para un marcador individual y la relación de probabilidad logarítmica total de que una muestra  $\tilde{x}$  esté exenta de la enfermedad de interés (es decir, en este caso, cada enfermedad particular de los 3 tipos de cáncer diferentes) frente a que tenga la enfermedad es sencillamente la suma de estos términos individuales más un término que contabiliza la prevalencia de la enfermedad. Por simplicidad, se supone que  $p(d) = 0,5$  de modo que

$$\ln \left( \frac{p(d)}{1 - p(d)} \right) = 0,$$

30 Dada una medición de muestra desconocida en  $\log(\text{UFR})$  para cada uno de los diez biomarcadores de 9,5, 8,8, 7,8, 8,3, 9,4, 7,0, 7,9, 6,3, 7,7, 10,6, el cálculo de la clasificación se detalla en la Tabla 32. Los componentes individuales que comprenden la relación de probabilidad logarítmica para clase de enfermedad frente a control se tabulan y pueden calcularse a partir de los parámetros en la Tabla 31 y los valores de  $\tilde{x}$ . La suma de las relaciones de probabilidad logarítmica individuales es -3,326, o una probabilidad de estar exento de la enfermedad frente a tener la enfermedad de 28, donde la probabilidad  $e^{3,326} = 28$ . Solamente 4 de los valores de biomarcadores tienen probabilidades más coherentes con el grupo de enfermedad (probabilidad  $\log > 0$ ) pero se ha descubierto uniformemente que los 6 biomarcadores restantes favorecen el grupo de control. La multiplicación de las probabilidades entre sí proporciona los mismos resultados que el mostrado anteriormente; una probabilidad de 28 de que la muestra desconocida esté exenta de la enfermedad. De hecho, esta muestra vino de la población de control en el conjunto de entrenamiento de CPNM.

45 **6.2 Algoritmo ávido para seleccionar paneles de biomarcadores de cáncer con respecto a clasificadores parte 1**

Se seleccionaron subconjuntos de los biomarcadores en la Tabla 1 para construir clasificadores potenciales que podrían usarse para determinar cuáles de los marcadores podrían usarse como biomarcadores de cáncer general para detectar cáncer.

50 Dado un conjunto de marcadores, se entrenó un modelo definido para cada uno de los 3 estudios de cáncer, de modo que fue necesaria una medida global de rendimiento para seleccionar un conjunto de biomarcadores que fue capaz de clasificar simultáneamente muchos tipos diferentes de cáncer. La medida de rendimiento de clasificador usada aquí fue la media del área bajo la curva de ROC en todos los clasificadores bayesianos simples. La curva de ROC es la representación de la tasa de verdadero positivo (sensibilidad) frente a la tasa de falso positivo (1-especificidad) de un único clasificador. El área bajo la curva (ABC) de ROC varía de 0 a 1,0, donde una ABC de 1,0 corresponde a clasificación perfecta y una ABC de 0,5 corresponde a clasificador aleatorio (lanzamiento de moneda). Se pueden aplicar otras medidas comunes de rendimiento tales como la medida F o la suma o el producto

de sensibilidad y especificidad. Específicamente, se podría desear tratar la sensibilidad y especificidad con diferente peso, para seleccionar los clasificadores que rinden con mayor especificidad a costa de algo de sensibilidad o para seleccionar los clasificadores que rinden con mayor sensibilidad a costa de especificidad. Los inventores eligen usar la ABC porque abarca todas las combinaciones de sensibilidad y especificidad en una única medida. Diferentes aplicaciones tendrán diferentes beneficios para hallazgos de verdadero positivo y verdadero negativo y tendrán diferentes costes asociados con hallazgos de falso positivo con respecto a hallazgos de falso negativo. El cambio de la medida de rendimiento puede cambiar el subconjunto exacto de marcadores seleccionados para un conjunto de datos dado.

Para el enfoque bayesiano para la diferenciación de muestras de cáncer de muestras de control descritas en la Sección 6.1 de este Ejemplo, el clasificador se parametrizó completamente por las distribuciones de biomarcadores en cada uno de los 3 estudios de cáncer y la lista de biomarcadores se eligió de la Tabla 19. Es decir, el subconjunto de marcadores elegido para inclusión determinó un clasificador de una manera uno a uno dado un conjunto de datos de entrenamiento.

El método ávido empleado aquí se usó para buscar el subconjunto óptimo de marcadores de la Tabla 1. Para números pequeños de marcadores o clasificadores con relativamente pocos marcadores, cada posible subconjunto de marcadores se enumeró y se evaluó con respecto al rendimiento del clasificador construido con ese conjunto de marcadores particular (véase Ejemplo 4). (Este enfoque se conoce bien en el campo de la estadística como «selección de mejor subconjunto»; véase, por ejemplo, Hastie *et al*). Sin embargo, para los clasificadores descritos en el presente documento, el número de combinaciones de múltiples marcadores puede ser muy grande y no fue factible evaluar cada posible conjunto de 10 marcadores, ya que hay 30.045.015 posibles combinaciones que pueden generarse de una lista de solamente 30 analitos totales. Debido a la inviabilidad de buscar en cada subconjunto de marcadores, puede no encontrarse el subconjunto óptimo individual; sin embargo, usando este enfoque, se descubrieron muchos subconjuntos excelentes y, en muchos casos, cualquiera de estos subconjuntos puede representar uno óptimo.

En lugar de evaluar cada posible conjunto de marcadores, puede seguirse un enfoque por etapas directo «ávido» (véase, por ejemplo, Dabney AR, Storey JD (2007) Optimality Driven Nearest Centroid Classification from Genomic Data. PLoS ONE 2(10): e1002. doi:10.1371/journal.pone.0001002). Usando este método, se inicia un clasificador con el mejor marcador individual (basado en la distancia KS para los marcadores individuales) y se deja crecer en cada etapa probando, a su vez, cada miembro de una lista de marcadores que no es actualmente un miembro del conjunto de marcadores en el clasificador. El marcador que puntúa mejor en combinación con el clasificador existente se añade al clasificador. Esto se repite hasta que no se consigue mejora adicional en el rendimiento. Desafortunadamente, este enfoque puede obviar combinaciones valiosas de marcadores para las que algunos de los marcadores individuales no se han elegido todos antes de que se detenga el proceso.

El procedimiento ávido usado aquí fue una elaboración del enfoque por etapas directo precedente, porque, para ampliar la búsqueda, en lugar de mantener solamente un único subconjunto de marcadores en cada etapa, se mantuvo una lista de conjuntos de marcadores candidatos. La lista se sembró con una lista de marcadores individuales. La lista se expandió en etapas obteniendo nuevos subconjuntos de marcadores de los que están actualmente en la lista y añadiéndolos a la lista. Cada subconjunto de marcadores actualmente en la lista se extendió añadiendo cualquier marcador de la Tabla 1 que no es parte ya de ese clasificador, y que, tras su adición al subconjunto, no duplicaría un subconjunto existente (estos se denominan «marcadores permisibles»). Cada vez que se definió un nuevo conjunto de marcadores, se entrenó un conjunto de clasificadores compuesto de uno para cada estudio de cáncer usando estos marcadores y el rendimiento global se midió mediante la ABC media en los 3 estudios. Para evitar el sobreajuste potencial, la ABC para cada modelo de estudio de cáncer se calculó mediante un procedimiento de validación cruzada décuplo. Cada subconjunto de marcadores existente se extendió por cada marcador permisible de la lista. Claramente, dicho proceso generaría con el tiempo cada posible subconjunto y la lista se quedaría sin espacio. Por lo tanto, todos los conjuntos de marcadores generados se mantuvieron solamente mientras la lista fuera de un tamaño menor que cierto tamaño predeterminado. Una vez que la lista alcanzó el límite de tamaño predeterminado, se hizo elitista; es decir, solamente los conjuntos de clasificadores que mostraron un nivel determinado de rendimiento se mantuvieron en la lista, y los otros salieron de la lista y se perdieron. Esto se consiguió manteniendo la lista clasificada por orden de rendimiento de conjunto de clasificadores; se insertaron nuevos conjuntos de marcadores cuyos clasificadores eran globalmente al menos tan buenos como el peor conjunto de clasificadores actualmente en la lista, obligando a la expulsión de los conjuntos de clasificadores de menor rendimiento actuales. Un detalle de implementación adicional es que la lista se reemplazó completamente en cada etapa generacional; por lo tanto, cada conjunto de marcadores en la lista tuvo el mismo número de marcadores y en cada etapa el número de marcadores por clasificador creció en uno.

En una realización, el conjunto (o panel) de biomarcadores útil para construir clasificadores para diagnosticar cáncer general con respecto a ausencia de cáncer se basa en la ABC media para la combinación particular de biomarcadores usada en el esquema de clasificación. Se identificaron muchas combinaciones de biomarcadores obtenidas de los marcadores en la Tabla 19 que fueron capaces de clasificar eficazmente diferentes muestras de cáncer de controles. Se exponen paneles representativos en las tablas 22-29, que exponen una serie de 100 paneles diferentes de 3-10 biomarcadores, que tienen la ABC de validación cruzada (VC) media indicada para cada

panel. El número total de apariciones de cada marcador en cada uno de estos paneles se indica en la parte inferior de cada tabla.

5 Los biomarcadores seleccionados en la Tabla 19 dan lugar a clasificadores que rinden mejor que clasificadores contruidos con «no marcadores». En la Figura 15, se presenta el rendimiento de los clasificadores de diez biomarcadores de los inventores en comparación con el rendimiento de otros posibles clasificadores.

10 La Figura 15A muestra la distribución de ABC medias para clasificadores contruidos a partir de conjuntos muestreados aleatoriamente de diez «no marcadores» tomados del conjunto completo de 23 presentes en los 3 estudios, excluyendo los diez marcadores en la Tabla 19. El rendimiento de los diez biomarcadores de cáncer potenciales se presenta como una línea vertical discontinua. Esta representación muestra claramente que el rendimiento de los diez biomarcadores potenciales es mucho mayor que la distribución de otras combinaciones de biomarcadores.

15 La Figura 15B presenta una distribución similar a la Figura 15A, sin embargo los conjuntos muestreados de forma aleatoria se restringieron a los 49 biomarcadores de la Tabla 1 que no se seleccionaron por el procedimiento de selección de biomarcadores ávido para diez clasificadores de analitos. Esta representación demuestra que los diez marcadores seleccionados por el algoritmo ávido representan un subconjunto de biomarcadores que generalizan para otros tipos de cáncer mucho mejor que clasificadores contruidos con los 49 biomarcadores restantes.

20 Finalmente, La Figura 16 muestra la curva de ROC de clasificador para cada uno de los 3 clasificadores de estudios de cáncer. Se pretende que las realizaciones y los ejemplos anteriores sean solamente ejemplos. Ninguna realización, ejemplo o elemento particular de una realización o ejemplo particular debe interpretarse como un elemento o característica crítico, requerido o esencial de cualquiera de las reivindicaciones. Además, ningún elemento descrito en el presente documento es necesario para la práctica de las reivindicaciones adjuntas a menos que se describa expresamente como «esencial» o «crítico». Pueden realizarse diversas alteraciones, modificaciones, sustituciones y otras variaciones a las realizaciones desveladas sin alejarse del alcance de la presente solicitud, que se define por las reivindicaciones adjuntas. La memoria descriptiva, incluyendo las figuras y los ejemplos, debe interpretarse de una manera ilustrativa, en lugar de una restrictiva, y se pretende que todas estas modificaciones y sustituciones se incluyan en el alcance de la solicitud. En consecuencia, el alcance de la solicitud debería estar determinado por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales, en lugar de por los ejemplos proporcionados anteriormente. Por ejemplo, pueden ejecutarse etapas indicadas en cualquiera de las reivindicaciones del método o proceso en cualquier orden factible y no se limitan a un orden presentado en cualquiera de las realizaciones, los ejemplos o las reivindicaciones. Además, en cualquiera de los métodos mencionados anteriormente, uno o más biomarcadores de la Tabla 1 o Tabla 19 pueden excluirse específicamente como un biomarcador individual o como un biomarcador de cualquier panel.

**Tabla 1: Biomarcadores de cáncer**

Columna n.º 1	Columna n.º 2	Columna n.º 3	Columna n.º 4	Columna n.º 5	Columna n.º 6
Biomarcador n.º	Símbolo(s) de Entrez Gene de designación de biomarcadores	ID Entrez Gene	ID SwissProt	Nombre público	Dirección
1	AHSG	197	P02765	α2-HS-Glucoproteína	Descendente
2	AKR7A2	8574	043488	Aflatoxina B1 aldehído reductasa	Ascendente
3	AKT3	10000	Q9Y243	PKB γ	Ascendente
4	ASGR1	432	P07306	ASGPR1	Descendente
5	BDNF	627	P23560	BDNF	Descendente
6	BMP1	649	P13497	BMP-1	Descendente
7	BMPER	168667	Q8N8U9	BMPER	Descendente
8	C9	735	P02748	C9	Ascendente
9	CA6	765	P23280	Anhidrasa carbónica VI	Descendente
10	CAPG	822	P40121	CapG	Descendente
11	CDH1	999	P12830	Cadherina-1	Descendente
12	CHRD1	91851	Q9BU40	Tipo cordina 1	Ascendente

ES 2 674 318 T3

13	CKB-CKM-	1152; 1158	P12277; P06732	CK-MB	Descendente
14	CLIC1	1192	000299	canal intracelular de cloruro 1	Ascendente
15	CMA1	1215	P23946	Quimasa	Descendente
16	CNTN1	1272	Q12860	Contactina-1	Descendente
17	COL18A1	80781	P39060	Endostatina	Ascendente
18	CRP	1401	P02741	CRP	Ascendente
19	CTSL2	1515	060911	Catepsina V	Descendente
20	DDC	1644	P20711	dopa descarboxilasa	Descendente
21	EGFR	1956	P00533	ERBB1	Descendente
22	FGA-FGB-FGG	2243; 2244; 2266	P02671; P02675; P02679	Dímero D	Ascendente
23	FN1	2335	P02751	Fibronectina FN1.4	Descendente
24	GHR	2690	P10912	Receptor de hormona del crecimiento	Descendente
25	GPI	2821	P06744	glucosa fosfato isomerasa	Ascendente
26	HMGB1	3146	P09429	HMG-1	Ascendente
27	HNRNPAB	3182	Q99729	hnRNP A/B	Ascendente
28	HP	3240	P00738	Haptoglobina, Tipo mixto	Ascendente
29	HSP90AA1	3320	P07900	HSP 90 $\alpha$	Ascendente
30	HSPA1A	3303	P08107	HSP 70	Ascendente
31	IGFBP2	3485	P18065	IGFBP-2	Ascendente
32	IGFBP4	3487	P22692	IGFBP-4	Ascendente
33	IL12B-IL23A	3593; 51561	P29460; Q9NPF7	IL-23	Ascendente
34	ITIH4	3700	Q14624	Cadena pesada de inhibidor de inter- $\alpha$ -tripsina H4	Ascendente
35	KIT	3815	P10721	SCF sR	Descendente
36	KLK3-SERPINA3	354; 12	P07288; P01011	PSA-ACT	Ascendente
37	L1CAM	3897	P32004	NCAM-L1	Descendente
38	LRIG3	121227	Q6UXM1	LRIG3	Descendente
39	MMP12	4321	P39900	MMP-12	Ascendente
40	MMP7	4316	P09237	MMP-7	Ascendente
41	NME2	4831	P22392	NDP quinasa B	Ascendente
42	PA2G4	5036	Q9UQ80	Proteína de unión a ErbB3 Ebpl	Ascendente
43	PLA2G7	7941	Q13093	LpPLA2/ PAFAH	Descendente
44	PLAUR	5329	Q03405	suPAR	Ascendente
45	PRKACA	5566	P17612	PRKA C- $\alpha$	Ascendente
46	PRKCB	5579	P05771	PKC- $\beta$ -II	Descendente
47	PROK1	84432	P58294	EG-VEGF	Descendente

ES 2 674 318 T3

48	PRSS2	5645	P07478	Tripsina-2	Ascendente
49	PTN	5764	P21246	Pleiotropina	Ascendente
50	SERPINA1	5265	P01009	$\alpha$ 1-antitripsina	Ascendente
51	STC1	6781	P52823	Estaniocalcina-1	Ascendente
52	STX1A	6804	Q16623	Sintaxina 1A	Descendente
53	TACSTD2	4070	P09758	Proteína GA733-1	Descendente
54	TFF3	7033	Q07654	Factor trefoil 3	Ascendente
55	TGFBI	7045	Q15582	$\beta$ IGH3	Descendente
56	TPI1	7167	P60174	Triosafosfato isomerasa	Ascendente
57	TPT1	7178	P13693	Fortilina	Ascendente
58	YWHAG	7532	P61981	14-3-3 proteína $\gamma$	Ascendente
59	YWHAH	7533	Q04917	14-3-3 proteína $\epsilon$	Ascendente

**Tabla 2: Paneles de 1 biomarcador**

Marcadores		ABC de VC
1	YWHAG	0,840
2	MMP7	0,804
3	CLIC1	0,803
4	MMP12	0,773
5	STX1A	0,771
6	C9	0,769
7	LRIG3	0,769
8	EGFR	0,767
9	TPT1	0,760
10	CMA1	0,758
11	YWHAH	0,756
12	GPI	0,752
13	BMP1	0,751
14	DDC	0,747
15	NME2	0,745
16	IGFBP2	0,743
17	FGA-FGB-FGG	0,741
18	CAPG	0,738
19	AKR7A2	0,733
20	HNRNPAB	0,730
21	CDH1	0,728
22	HSP90AA1	0,726
23	CKB-CKM	0,724
24	CRP	0,724
25	PTN	0,723

ES 2 674 318 T3

26	BMPER	0,721
27	TPI1	0,720
28	TGFBI	0,720
29	KIT	0,717
30	HP	0,715
31	KLK3-SERPINA3	0,713
32	PLAUR	0,711
33	GHR	0,705
34	CA6	0,705
35	PRKACA	0,704
36	COL18A1	0,701
37	HMGB1	0,700
38	IGFBP4	0,698
39	AKT3	0,697
40	AHSG	0,697
41	CTSL2	0,694
42	TACSTD2	0,690
43	FN1	0,690
44	IL12B-IL23A	0,690
45	BDNF	0,689
46	L1CAM	0,688
47	SERPINA1	0,688
48	PROK11	0,684
49	PRKCB	0,684
50	STC1	0,682
51	CHRD1	0,679
52	TFF3	0,678
53	PRSS2	0,663
54	ASGR1	0,660
55	HSPA1A	0,658
56	PA2G4	0,655
57	CNTN1	0,648
58	ITIH4	0,635
59	PLA2G7	0,631

**Tabla 3: Paneles de 2 biomarcadores**

Marcadores			ABC de VC
1	MMP7	YWHAG	0,878
2	C9	YWHAG	0,876

ES 2 674 318 T3

3	STX1A	YWHAG	0,874
4	MMP7	CLIC1	0,874
5	LRIG3	YWHAG	0,871
6	KLK3-SERPINA3	YWHAG	0,867
7	YWHAG	CRP	0,867
8	BMP1	YWHAG	0,866
9	MMP12	CLIC1	0,865
10	TGFBI	YWHAG	0,864
11	KLK3-SERPINA3	CLIC1	0,863
12	YWHAG	L1CAM	0,863
13	STX1A	CLIC1	0,863
14	SERPINA1	YWHAG	0,862
15	CMA1	YWHAG	0,862
16	NME2	FGA-FGB-FGG	0,861
17	CA6	YWHAG	0,859
18	MMP7	AKR7A2	0,859
19	DDC	YWHAG	0,858
20	C9	CLIC1	0,857
21	MMP7	NME2	0,857
22	CKB-CKM	YWHAG	0,857
23	FGA-FGB-FGG	CLIC1	0,856
24	BMP1	CLIC1	0,856
25	EGFR	YWHAG	0,856
26	AHSG	YWHAG	0,855
27	YWHAG	MMP12	0,855
28	MMP7	TPI1	0,855
29	KIT	YWHAG	0,855
30	LRIG3	CLIC1	0,854
31	HP	YWHAG	0,854
32	PLAUR	YWHAG	0,854
33	CMA1	CLIC1	0,853
34	BDNF	YWHAG	0,853
35	EGFR	CLIC1	0,853
36	MMP7	TPT1	0,852
37	YWHAG	CLIC1	0,851
38	PTN	YWHAG	0,850
39	BDNF	CLIC1	0,849
40	IGFBP2	YWHAG	0,849
41	MMP7	GPI	0,849

ES 2 674 318 T3

42	CNTN1	YWHAG	0,849
43	BMPER	YWHAG	0,848
44	YWHAG	FGA-FGB-FGG	0,847
45	MMP7	HNRNPAB	0,847
46	C9	GPI	0,847
47	YWHAG	GPI	0,846
48	L1CAM	MMP12	0,846
49	YWHAG	ITIH4	0,846
50	GHR	YWHAG	0,846
51	YWHAG	HNRNPAB	0,846
52	MMP7	CMA1	0,846
53	C9	NME2	0,845
54	MMP7	LRIG3	0,845
55	IGFBP2	CLIC1	0,845
56	COL18A1	YWHAG	0,845
57	CHRD1	CLIC1	0,845
58	CDH1	MMP7	0,844
59	PLAUR	CLIC1	0,844
60	TPI1	FGA-FGB-FGG	0,844
61	CHRD1	YWHAG	0,844
62	MMP7	PRKACA	0,844
63	C9	AKR7A2	0,843
64	YWHAG	PLA2G7	0,843
65	KLK3-SERPINA3	TPT1	0,843
66	BMP1	GPI	0,843
67	KLK3-SERPINA3	MMP7	0,842
68	C9	TPT1	0,842
69	COL18A1	CLIC1	0,842
70	YWHAG	AKR7A2	0,842
71	YWHAG	STC1	0,842
72	MMP7	TGFBI	0,842
73	AKR7A2	MMP12	0,842
74	MMP7	YWHAH	0,842
75	HMGB1	MMP7	0,841
76	TPT1	FGA-FGB-FGG	0,841
77	GHR	CLIC1	0,841
78	KLK3-SERPINA3	STX1A	0,840
79	LRIG3	TPT1	0,840
80	STX1A	MMP12	0,840

81	YWHAG	PRSS2	0,840
82	DDC	CLIC1	0,840
83	CRP	CLIC1	0,840
84	HMGB1	YWHAG	0,840
85	STX1A	TPT1	0,839
86	CDH1	YWHAG	0,839
87	STX1A	GPI	0,839
88	KLK3-SERPINA3	NME2	0,838
89	LRIG3	YWHAH	0,838
90	AKR7A2	FGA-FGB-FGG	0,838
91	C9	HNRNPAB	0,837
92	TACSTD2	YWHAG	0,837
93	YWHAG	TPI1	0,837
94	STX1A	NME2	0,836
95	KLK3-SERPINA3	AKR7A2	0,836
96	LRIG3	AKR7A2	0,836
97	NME2	MMP12	0,836
98	CAPG	CLIC1	0,836
99	YWHAG	NME2	0,836
100	MMP7	STX1A	0,835

**Tabla 4: Paneles de 3 biomarcadores**

Marcadores				ABC de VC
1	KLK3-SERPINA3	MMP7	CLIC1	0,896
2	KLK3-SERPINA3	STX1A	CLIC1	0,895
3	KLK3-SERPINA3	STX1A	YWHAG	0,895
4	MMP7	C9	YWHAG	0,895
5	MMP7	YWHAG	CLIC1	0,894
6	C9	STX1A	YWHAG	0,893
7	MMP7	LRIG3	YWHAG	0,893
8	MMP7	TGFBI	YWHAG	0,893
9	MMP7	CMA1	CLIC1	0,893
10	BDNF	MMP7	CLIC1	0,892
11	MMP7	GHR	CLIC1	0,892
12	CDH1	MMP7	YWHAG	0,892
13	BDNF	C9	CLIC1	0,892
14	STX1A	YWHAG	CRP	0,892
15	MMP7	YWHAG	TPI1	0,892
16	MMP7	STX1A	YWHAG	0,892

ES 2 674 318 T3

17	TGFBI	STX1A	YWHAG	0,891
18	LRIG3	YWHAG	CRP	0,891
19	MMP7	YWHAG	L1CAM	0,891
20	MMP7	YWHAG	PA2G4	0,891
21	C9	LRIG3	YWHAG	0,890
22	STX1A	MMP12	CLIC1	0,890
23	MMP7	LRIG3	CLIC1	0,890
24	KLK3-SERPINA3	MMP7	YWHAG	0,890
25	MMP7	BMP1	CLIC1	0,890
26	BDNF	STX1A	CLIC1	0,890
27	MMP7	STX1A	CLIC1	0,889
28	MMP7	BMP1	YWHAG	0,889
29	HMGB1	MMP7	YWHAG	0,889
30	SERPINA1	STX1A	YWHAG	0,889
31	MMP7	YWHAG	GPI	0,889
32	MMP7	CMA1	YWHAG	0,889
33	MMP7	YWHAG	NME2	0,889
34	MMP7	C9	CLIC1	0,889
35	C9	CMA1	YWHAG	0,888
36	MMP7	YWHAG	CRP	0,888
37	KLK3-SERPINA3	CNTN1	YWHAG	0,888
38	MMP7	YWHAG	AKR7A2	0,887
39	MMP7	ITIH4	CLIC1	0,887
40	CDH1	MMP7	CLIC1	0,887
41	KLK3-SERPINA3	MMP7	AKR7A2	0,887
42	MMP7	GHR	YWHAG	0,887
43	KLK3-SERPINA3	CHRD1	CLIC1	0,887
44	KLK3-SERPINA3	LRIG3	YWHAG	0,887
45	BMP1	STX1A	CLIC1	0,887
46	C9	STX1A	CLIC1	0,887
47	MMP7	GPI	CLIC1	0,887
48	TGFBI	LRIG3	YWHAG	0,886
49	IGFBP2	MMP7	YWHAG	0,886
50	MMP7	CKB-CKM	YWHAG	0,886
51	LRIG3	STX1A	YWHAG	0,886
52	GHR	STX1A	CLIC1	0,886
53	MMP7	DDC	YWHAG	0,886
54	BMP1	STX1A	YWHAG	0,886
55	MMP7	DDC	CLIC1	0,886

ES 2 674 318 T3

56	C9	CHRD1	CLIC1	0,885
57	MMP7	C9	AKR7A2	0,885
58	BDNF	MMP7	YWHAG	0,885
59	KIT	MMP7	YWHAG	0,885
60	MMP7	TGFBI	CLIC1	0,885
61	BDNF	IGFBP2	CLIC1	0,885
62	MMP7	YWHAG	ITIH4	0,885
63	MMP7	YWHAG	HNRNPAB	0,885
64	KLK3-SERPINA3	LRIG3	CLIC1	0,885
65	MMP7	HP	YWHAG	0,885
66	HMGB1	MMP7	CLIC1	0,885
67	MMP7	YWHAG	PLA2G7	0,885
68	CHRD1	CMA1	CLIC1	0,885
69	STX1A	YWHAG	L1CAM	0,885
70	MMP7	CMA1	NME2	0,885
71	BMP1	MMP12	CLIC1	0,884
72	C9	CHRD1	YWHAG	0,884
73	KLK3-SERPINA3	CMA1	CLIC1	0,884
74	EGFR	MMP7	CLIC1	0,884
75	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,884
76	MMP7	AHSG	YWHAG	0,884
77	IGFBP2	MMP7	CLIC1	0,884
78	MMP7	TPT1	YWHAG	0,884
79	KLK3-SERPINA3	COL18A1	CLIC1	0,884
80	EGFR	MMP7	YWHAG	0,884
81	C9	YWHAG	L1CAM	0,884
82	KLK3-SERPINA3	MMP7	TPI1	0,884
83	KLK3-SERPINA3	BDNF	CLIC1	0,884
84	MMP7	CA6	YWHAG	0,884
85	BMP1	YWHAG	CRP	0,883
86	MMP7	CMA1	TPI1	0,883
87	KLK3-SERPINA3	MMP7	NME2	0,883
88	BDNF	C9	YWHAG	0,883
89	AHSG	STX1A	YWHAG	0,883
90	C9	MMP12	CLIC1	0,883
91	C9	BMP1	YWHAG	0,883
92	KLK3-SERPINA3	STX1A	TPT1	0,883
93	CNTN1	C9	YWHAG	0,883
94	C9	CA6	YWHAG	0,883

ES 2 674 318 T3

95	CA6	STX1A	YWHAG	0,883
96	MMP7	CNTN1	YWHAG	0,883
97	KLK3-SERPINA3	STX1A	NME2	0,883
98	MMP7	HNRNPAB	CLIC1	0,883
99	MMP7	SERPINA1	YWHAG	0,883
100	TGFBI	CMA1	YWHAG	0,883

**Tabla 5: Paneles de 4 biomarcadores**

Marcadores					ABC de VC
1	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	CLIC1	0,911
2	KLK3-SERPINA3	BDNF	STX1A	CLIC1	0,910
3	BDNF	C9	CHRDL1	CLIC1	0,909
4	BDNF	C9	STX1A	CLIC1	0,908
5	MMP7	C9	YWHAG	TPI1	0,908
6	MMP7	C9	YWHAG	CLIC1	0,908
7	MMP7	GHR	STX1A	CLIC1	0,907
8	KLK3-SERPINA3	MMP7	CMA1	CLIC1	0,907
9	KLK3-SERPINA3	BDNF	MMP7	CLIC1	0,907
10	MMP7	C9	CMA1	CLIC1	0,907
11	BDNF	MMP7	YWHAG	CLIC1	0,907
12	CDH1	MMP7	C9	YWHAG	0,907
13	KLK3-SERPINA3	MMP7	LRIG3	CLIC1	0,906
14	MMP7	GHR	CMA1	CLIC1	0,906
15	MMP7	C9	YWHAG	NME2	0,906
16	CDH1	MMP7	STX1A	YWHAG	0,906
17	MMP7	C9	LRIG3	YWHAG	0,905
18	MMP7	C9	YWHAG	GPI	0,905
19	CDH1	MMP7	STX1A	CLIC1	0,905
20	BDNF	MMP7	GHR	CLIC1	0,905
21	MMP7	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,905
22	BDNF	MMP7	LRIG3	CLIC1	0,905
23	BDNF	MMP7	STX1A	CLIC1	0,905
24	MMP7	LRIG3	YWHAG	CLIC1	0,905
25	BDNF	MMP7	CMA1	CLIC1	0,905
26	MMP7	C9	TGFBI	YWHAG	0,904
27	CDH1	MMP7	LRIG3	YWHAG	0,904
28	KLK3-SERPINA3	CHRDL1	CMA1	CLIC1	0,904
29	TGFBI	STX1A	YWHAG	CRP	0,904
30	BDNF	MMP7	C9	CLIC1	0,904

ES 2 674 318 T3

31	KLK3-SERPINA3	CHRDL1	STX1A	CLIC1	0,904
32	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	YWHAG	0,904
33	KLK3-SERPINA3	BMP1	STX1A	CLIC1	0,904
34	MMP7	STX1A	YWHAG	NME2	0,904
35	BDNF	MMP7	TGFBI	CLIC1	0,904
36	MMP7	C9	YWHAG	L1CAM	0,904
37	MMP7	TGFBI	LRIG3	YWHAG	0,904
38	KLK3-SERPINA3	BDNF	CHRDL1	CLIC1	0,904
39	KLK3-SERPINA3	GHR	STX1A	CLIC1	0,904
40	KLK3-SERPINA3	LRIG3	CHRDL1	CLIC1	0,904
41	KLK3-SERPINA3	MMP7	LRIG3	YWHAG	0,904
42	KLK3-SERPINA3	LRIG3	STX1A	CLIC1	0,904
43	MMP7	GHR	BMP1	CLIC1	0,904
44	CDH1	MMP7	CMA1	CLIC1	0,904
45	LRIG3	STX1A	YWHAG	CRP	0,904
46	MMP7	GHR	YWHAG	CLIC1	0,904
47	BDNF	GHR	STX1A	CLIC1	0,904
48	MMP7	C9	CMA1	YWHAG	0,904
49	MMP7	LRIG3	GPI	CLIC1	0,904
50	MMP7	C9	STX1A	YWHAG	0,903
51	BDNF	MMP7	GPI	CLIC1	0,903
52	KLK3-SERPINA3	MMP7	YWHAG	CLIC1	0,903
53	MMP7	TGFBI	STX1A	YWHAG	0,903
54	KLK3-SERPINA3	COL18A1	STX1A	CLIC1	0,903
55	MMP7	TGFBI	CMA1	CLIC1	0,903
56	MMP7	C9	YWHAG	PA2G4	0,903
57	MMP7	C9	YWHAG	AKR7A2	0,903
58	KLK3-SERPINA3	MMP7	BMP1	CLIC1	0,903
59	MMP7	GHR	LRIG3	CLIC1	0,903
60	MMP7	GHR	C9	CLIC1	0,903
61	MMP7	BMP1	YWHAG	CLIC1	0,903
62	KLK3-SERPINA3	MMP7	GHR	CLIC1	0,903
63	BDNF	STX1A	MMP12	CLIC1	0,903
64	MMP7	LRIG3	YWHAG	CRP	0,903
65	BDNF	IGFBP2	MMP7	CLIC1	0,903
66	GHR	STX1A	CRP	CLIC1	0,903
67	BDNF	STX1A	CRP	CLIC1	0,902
68	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	CLIC1	0,902
69	BDNF	MMP7	C9	YWHAG	0,902

ES 2 674 318 T3

70	CDH1	MMP7	TGFBI	YWHAG	0,902
71	BDNF	IGFBP2	STX1A	CLIC1	0,902
72	KLK3-SERPINA3	MMP7	NME2	CLIC1	0,902
73	KLK3-SERPINA3	MMP7	TPI1	CLIC1	0,902
74	MMP7	LRIG3	YWHAG	NME2	0,902
75	KLK3-SERPINA3	EGFR	STX1A	CLIC1	0,902
76	BDNF	IGFBP2	LRIG3	CLIC1	0,902
77	MMP7	CMA1	YWHAG	CLIC1	0,902
78	MMP7	GHR	STX1A	YWHAG	0,902
79	HMGB1	MMP7	C9	YWHAG	0,902
80	IGFBP2	MMP7	CMA1	CLIC1	0,902
81	MMP7	GHR	GPI	CLIC1	0,902
82	KLK3-SERPINA3	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,902
83	KLK3-SERPINA3	SERPINA1	STX1A	YWHAG	0,902
84	BDNF	PLAUR	LRIG3	CLIC1	0,902
85	BDNF	TGFBI	STX1A	CLIC1	0,902
86	BDNF	MMP7	ITIH4	CLIC1	0,902
87	MMP7	LRIG3	YWHAG	GPI	0,902
88	MMP7	BMP1	YWHAG	GPI	0,902
89	C9	CHRDL1	CMA1	CLIC1	0,902
90	MMP7	BMP1	CMA1	CLIC1	0,902
91	KLK3-SERPINA3	MMP7	CNTN1	CLIC1	0,902
92	MMP7	CMA1	HNRNPAB	CLIC1	0,902
93	KLK3-SERPINA3	LRIG3	STX1A	YWHAG	0,902
94	BDNF	LRIG3	STX1A	CLIC1	0,902
95	MMP7	TGFBI	CMA1	YWHAG	0,902
96	MMP7	LRIG3	YWHAG	TPI1	0,902
97	MMP7	CMA1	NME2	CLIC1	0,902
98	MMP7	GHR	CRP	CLIC1	0,902
99	C9	LRIG3	CHRDL1	CLIC1	0,902
100	MMP7	LRIG3	STX1A	CLIC1	0,902

**Tabla 6: Paneles de 5 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC
1	TGFBI	LRIG3	CHRDL1	NME2	CRP	0,922
2	KLK3-SERPINA3	BDNF	MMP7	STX1A	CLIC1	0,920
3	BDNF	MMP7	GHR	STX1A	CLIC1	0,919
4	BDNF	MMP7	C9	YWHAG	CLIC1	0,918
5	KLK3-SERPINA3	MMP7	GHR	STX1A	CLIC1	0,918

ES 2 674 318 T3

6	BDNF	C9	CHRDL1	AHSG	CLIC1	0,918
7	CDH1	MMP7	GHR	STX1A	CLIC1	0,918
8	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	NME2	CLIC1	0,918
9	MMP7	GHR	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,918
10	MMP7	GHR	STX1A	GPI	CLIC1	0,918
11	KLK3-SERPINA3	MMP7	LRIG3	STX1A	CLIC1	0,917
12	BDNF	MMP7	GHR	GPI	CLIC1	0,917
13	BDNF	MMP7	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,917
14	BDNF	TGFBI	LRIG3	CHRDL1	CLIC1	0,917
15	KLK3-SERPINA3	BDNF	LRIG3	STX1A	CLIC1	0,917
16	KLK3-SERPINA3	BDNF	C9	STX1A	CLIC1	0,917
17	BDNF	MMP7	LRIG3	YWHAG	CLIC1	0,917
18	BDNF	GHR	C9	STX1A	CLIC1	0,916
19	BDNF	IGFBP2	LRIG3	CRP	CLIC1	0,916
20	KLK3-SERPINA3	BDNF	CHRDL1	STX1A	CLIC1	0,916
21	KLK3-SERPINA3	CDH1	MMP7	STX1A	CLIC1	0,916
22	MMP7	GHR	STX1A	CRP	CLIC1	0,916
23	BDNF	MMP7	TGFBI	STX1A	CLIC1	0,916
24	MMP7	GHR	TGFBI	STX1A	CLIC1	0,916
25	MMP7	GHR	C9	STX1A	CLIC1	0,916
26	BDNF	MMP7	GHR	TGFBI	CLIC1	0,916
27	MMP7	GHR	STX1A	NME2	CLIC1	0,916
28	KLK3-SERPINA3	HMGB1	MMP7	STX1A	CLIC1	0,916
29	MMP7	C9	STX1A	YWHAG	NME2	0,916
30	BDNF	MMP7	LRIG3	STX1A	CLIC1	0,916
31	MMP7	C9	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,916
32	BDNF	CDH1	MMP7	STX1A	CLIC1	0,916
33	BDNF	C9	TGFBI	CHRDL1	CLIC1	0,915
34	MMP7	C9	LRIG3	YWHAG	TP11	0,915
35	KLK3-SERPINA3	BDNF	MMP7	LRIG3	CLIC1	0,915
36	BDNF	C9	LRIG3	CHRDL1	CLIC1	0,915
37	KLK3-SERPINA3	BDNF	MMP7	CMA1	CLIC1	0,915
38	BDNF	LRIG3	CHRDL1	CRP	CLIC1	0,915
39	BDNF	MMP7	STX1A	ITIH4	CLIC1	0,915
40	BDNF	MMP7	GHR	C9	CLIC1	0,915
41	BDNF	MMP7	C9	GPI	CLIC1	0,915
42	HMGB1	MMP7	GHR	STX1A	CLIC1	0,915
43	BDNF	MMP7	LRIG3	GPI	CLIC1	0,915
44	GHR	BMP1	STX1A	CRP	CLIC1	0,915

ES 2 674 318 T3

45	BDNF	MMP7	BMP1	GPI	CLIC1	0,915
46	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,915
47	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	CHRDL1	CLIC1	0,915
48	BDNF	GHR	STX1A	CRP	CLIC1	0,915
49	KLK3-SERPINA3	BDNF	TGFBI	STX1A	CLIC1	0,915
50	KLK3-SERPINA3	BDNF	MMP7	PA2G4	CLIC1	0,915
51	CDH1	MMP7	TGFBI	STX1A	YWHAG	0,915
52	BDNF	MMP7	C9	STX1A	CLIC1	0,915
53	MMP7	GHR	TGFBI	CMA1	CLIC1	0,915
54	BDNF	MMP7	TGFBI	CMA1	CLIC1	0,915
55	CDH1	MMP7	C9	TGFBI	YWHAG	0,915
56	MMP7	C9	LRIG3	YWHAG	NME2	0,915
57	BDNF	MMP7	STX1A	NME2	CLIC1	0,915
58	BDNF	EGFR	TGFBI	STX1A	CLIC1	0,915
59	KLK3-SERPINA3	MMP7	LRIG3	GPI	CLIC1	0,915
60	BDNF	MMP7	STX1A	GPI	CLIC1	0,915
61	MMP7	C9	LRIG3	YWHAG	GPI	0,915
62	KLK3-SERPINA3	MMP7	CMA1	TPI1	CLIC1	0,915
63	CDH1	MMP7	C9	STX1A	YWHAG	0,915
64	KLK3-SERPINA3	BDNF	CNTN1	CHRDL1	CLIC1	0,915
65	KLK3-SERPINA3	BDNF	LRIG3	CHRDL1	CLIC1	0,915
66	BDNF	MMP7	GHR	LRIG3	CLIC1	0,914
67	KLK3-SERPINA3	BDNF	MMP7	NME2	CLIC1	0,914
68	BDNF	IGFBP2	MMP7	GPI	CLIC1	0,914
69	KLK3-SERPINA3	BDNF	STX1A	CLIC1	PLA2G7	0,914
70	CDH1	MMP7	GHR	CMA1	CLIC1	0,914
71	MMP7	C9	LRIG3	GPI	CLIC1	0,914
72	MMP7	GHR	STX1A	PA2G4	CLIC1	0,914
73	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	PA2G4	CLIC1	0,914
74	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	TPI1	CLIC1	0,914
75	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	HNRNPAB	CLIC1	0,914
76	MMP7	GHR	LRIG3	GPI	CLIC1	0,914
77	MMP7	GHR	CMA1	GPI	CLIC1	0,914
78	BDNF	IGFBP2	MMP7	LRIG3	CLIC1	0,914
79	KLK3-SERPINA3	BDNF	MMP7	TPI1	CLIC1	0,914
80	BDNF	MMP7	STX1A	TPT1	CLIC1	0,914
81	BDNF	LRIG3	STX1A	CRP	CLIC1	0,914
82	BDNF	MMP7	STX1A	CLIC1	PLA2G7	0,914
83	KLK3-SERPINA3	BDNF	AHSG	STX1A	CLIC1	0,914

ES 2 674 318 T3

84	KLK3-SERPINA3	MMP7	CNTN1	STX1A	CLIC1	0,914
85	BDNF	GHR	TGFBI	STX1A	CLIC1	0,914
86	BDNF	MMP7	NME2	ITIH4	CLIC1	0,914
87	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	STX1A	CLIC1	0,914
88	MMP7	C9	CMA1	NME2	CLIC1	0,914
89	BDNF	MMP7	LRIG3	NME2	CLIC1	0,914
90	BDNF	TGFBI	LRIG3	STX1A	CLIC1	0,914
91	KLK3-SERPINA3	CDH1	MMP7	STX1A	YWHAG	0,914
92	MMP7	C9	LRIG3	YWHAG	CLIC1	0,914
93	BDNF	MMP7	TGFBI	LRIG3	CLIC1	0,914
94	KLK3-SERPINA3	BDNF	STX1A	CRP	CLIC1	0,914
95	BDNF	MMP7	BMP1	YWHAG	CLIC1	0,914
96	KLK3-SERPINA3	MMP7	LRIG3	CMA1	CLIC1	0,914
97	KLK3-SERPINA3	MMP7	BMP1	STX1A	CLIC1	0,914
98	BDNF	IGFBP2	MMP7	STX1A	CLIC1	0,914
99	KLK3-SERPINA3	MMP7	STX1A	YWHAG	GPI	0,914
100	MMP7	LRIG3	STX1A	YWHAG	CLIC1	0,914

**Tabla 7: Paneles de 6 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC
1	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	GPI	0,928
2	BDNF CLIC1	TGFBI	LRIG3	CHRDL1	CRP	0,928
3	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	STX1A	NME2	0,928
4	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	GHR	STX1A	0,927
5	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	STX1A	0,927
6	TGFBI CRP	LRIG3	CHRDL1	AHSG	NME2	0,927
7	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	TGFBI	STX1A	0,927
8	BDNF CLIC1	MMP7	C9	STX1A	YWHAG	0,926
9	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	STX1A	TPT1	0,926
10	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	PA2G4	0,926
11	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	LRIG3	STX1A	0,925

ES 2 674 318 T3

12	BDNF CLIC1	MMP7	C9	LRIG3	YWHAG	0,925
13	KLK3-SERPINA3 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	TPI1	0,925
14	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	KIT	MMP7	STX1A	0,925
15	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	STX1A	PA2G4	0,925
16	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	NME2	0,925
17	BDNF CLIC1	IGFBP2	MMP7	LRIG3	NME2	0,925
18	BDNF CLIC1	GHR	C9	AHSG	STX1A	0,925
19	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	STX1A	TPI1	0,925
20	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	C9	STX1A	0,925
21	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	CRP	0,925
22	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	LRIG3	GPI	0,925
23	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	CDH1	MMP7	STX1A	0,925
24	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	YWHAG	0,925
25	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	HNRNPAB	0,925
26	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	TGFBI	CHRDL1	STX1A	0,925
27	KLK3-SERPINA3 PLA2G7	BDNF	MMP7	STX1A	CLIC1	0,925
28	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	GPI	0,925
29	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	LRIG3	YWHAG	0,925
30	KLK3-SERPINA3 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	NME2	0,925
31	BDNF PLA2G7	MMP7	GHR	STX1A	CLIC1	0,925
32	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	TPT1	0,925
33	BDNF CLIC1	MMP7	C9	STX1A	NME2	0,924

ES 2 674 318 T3

34	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	LRIG3	NME2	0,924
35	BDNF CLIC1	MMP7	LRIG3	STX1A	GPI	0,924
36	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	AHSG	STX1A	0,924
37	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	C9	YWHAG	0,924
38	CDH1 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	CRP	0,924
39	BDNF CLIC1	IGFBP2	MMP7	LRIG3	GPI	0,924
40	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	STX1A	YWHAG	0,924
41	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	STX1A	GPI	0,924
42	BDNF CLIC1	CDH1	MMP7	GHR	STX1A	0,924
43	BDNF CLIC1	IGFBP2	MMP7	TPI1	ITIH4	0,924
44	BDNF CLIC1	MMP7	STX1A	NME2	ITIH4	0,924
45	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	YWHAG	0,924
46	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	CNTN1	TGFBI	CHRD1	0,924
47	KLK3-SERPINA3 CLIC1	CDH1	MMP7	LRIG3	STX1A	0,924
48	KLK3-SERPINA3 CLIC1	MMP7	LRIG3	STX1A	NME2	0,924
49	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	TGFBI	LRIG3	STX1A	0,923
50	BDNF CLIC1	MMP7	TGFBI	LRIG3	GPI	0,923
51	BDNF CLIC1	TGFBI	LRIG3	STX1A	CRP	0,923
52	KLK3-SERPINA3 CLIC1	CDH1	MMP7	GHR	STX1A	0,923
53	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	GPI	0,923
54	BDNF CLIC1	MMP7	C9	CMA1	NME2	0,923
55	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	AHSG	STX1A	0,923

ES 2 674 318 T3

56	KLK3-SERPINA3 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	GPI	0,923
57	BDNF CLIC1	MMP7	C9	STX1A	TPT1	0,923
58	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	CNTN1	TGFBI	0,923
59	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	CRP	0,923
60	KLK3-SERPINA3 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	YWHAG	0,923
61	TGFBI CRP	LRIG3	CHRD1	STX1A	NME2	0,923
62	BDNF CLIC1	MMP7	C9	STX1A	GPI	0,923
63	BDNF CLIC1	IGFBP2	MMP7	TGFBI	STX1A	0,923
64	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	STX1A	HNRNPAB	0,923
65	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	NME2	0,923
66	CDH1 CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	STX1A	0,923
67	KLK3-SERPINA3 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	PA2G4	0,923
68	BDNF CLIC1	MMP7	TGFBI	STX1A	GPI	0,923
69	BDNF CLIC1	MMP7	STX1A	YWHAG	ITIH4	0,923
70	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	LRIG3	STX1A	0,923
71	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	GHR	STX1A	0,923
72	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	GPI	0,923
73	BDNF CLIC1	MMP7	STX1A	TPI1	ITIH4	0,923
74	BDNF CLIC1	MMP7	TGFBI	LRIG3	STX1A	0,923
75	BDNF CLIC1	EGFR	TGFBI	AHSG	STX1A	0,923
76	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	TGFBI	LRIG3	CHRD1	0,923
77	CDH1 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	GPI	0,923

ES 2 674 318 T3

78	BDNF CLIC1	IGFBP2	MMP7	LRIG3	TPI1	0,923
79	BDNF CLIC1	GHR	LRIG3	STX1A	CRP	0,923
80	BDNF CLIC1	CDH1	MMP7	LRIG3	STX1A	0,923
81	KLK3-SERPINA3 CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	STX1A	0,923
82	BDNF CLIC1	IGFBP2	LRIG3	AHSG	CRP	0,923
83	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	LRIG3	GPI	0,923
84	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	LRIG3	NME2	0,923
85	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	EGFR	TGFBI	STX1A	0,923
86	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	LRIG3	0,923
87	MMP7 CLIC1	GHR	C9	CMA1	NME2	0,923
88	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	CMA1	0,923
89	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	NME2	CRP	0,922
90	BDNF CLIC1	MMP7	C9	LRIG3	GPI	0,922
91	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	MMP7	LRIG3	TPT1	0,922
92	BDNF CLIC1	MMP7	STX1A	TPT1	ITIH4	0,922
93	KIT TPI1	MMP7	C9	LRIG3	YWHAG	0,922
94	BDNF CLIC1	CDH1	MMP7	STX1A	ITIH4	0,922
95	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	TPI1	CRP	0,922
96	BDNF CLIC1	C9	TGFBI	LRIG3	CHRDL1	0,922
97	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF	CNTN1	BMP1	CHRDL1	0,922
98	BDNF CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	CRP	0,922
99	KLK3-SERPINA3 CLIC1	LRIG3	CHRDL1	STX1A	CRP	0,922

100	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	STX1A	YWHAG	0,922
-----	---------------	-----	-------	-------	-------	-------

**Tabla 8: Paneles de 7 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC
1	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	0,933
2	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,932
3	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	0,932
4	KLK3-SERPINA3 PA2G4	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,932
5	BDNF CRP	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	0,932
6	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	0,932
7	KLK3-SERPINA3 TPI1	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,932
8	BDNF TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	0,932
9	KLK3-SERPINA3 ITIH4	BDNF CLIC1	MMP7	STX1A	NME2	0,932
10	BDNF STX1A	CDH1 CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	0,932
11	BDNF CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	CHRDL1	STX1A	0,932
12	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	0,932
13	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	MMP7	LRIG3	STX1A	0,932
14	KLK3-SERPINA3 GPI	BDNF CLIC1	MMP7	LRIG3	STX1A	0,932
15	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	GHR	0,931
16	KLK3-SERPINA3 CHRDL1	BDNF CLIC1	CNTN1	TGFBI	LRIG3	0,931
17	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	0,931
18	KLK3-SERPINA3 TPT1	BDNF CLIC1	MMP7	LRIG3	STX1A	0,931
19	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	MMP7	TGFBI	LRIG3	0,931
20	KLK3-SERPINA3 GPI	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,931

ES 2 674 318 T3

21	BDNF YWHAG	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	0,931
22	BDNF ITIH4	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	NME2	0,931
23	BDNF STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	LRIG3	0,931
24	KLK3-SERPINA3 TPT1	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,931
25	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	AHSG	STX1A	0,931
26	KLK3-SERPINA3 ITIH4	BDNF CLIC1	MMP7	STX1A	TPI1	0,931
27	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	PA2G4	0,931
28	KLK3-SERPINA3 PA2G4	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	STX1A	0,931
29	BDNF CRP	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	NME2	0,931
30	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	MMP7	TGFBI	STX1A	0,931
31	BDNF STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	AHSG	0,931
32	BDNF STX1A	CDH1 CLIC1	MMP7	GHR	AHSG	0,931
33	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	EGFR	MMP7	STX1A	0,931
34	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	LRIG3	0,931
35	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	STX1A	0,930
36	BDNF CRP	GHR CLIC1	TGFBI	LRIG3	CHRDL1	0,930
37	BDNF CLIC1	MMP7 PLA2G7	GHR	TGFBI	STX1A	0,930
38	BDNF YWHAG	MMP7 CLIC1	GHR	C9	LRIG3	0,930
39	BDNF TPT1	KIT CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,930
40	BDNF ITIH4	MMP7 CLIC1	C9	STX1A	NME2	0,930
41	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	TGFBI	LRIG3	CHRDL1	0,930
42	KLK3-SERPINA3 TPI1	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	STX1A	0,930

ES 2 674 318 T3

43	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	TGFBI	LRIG3	STX1A	0,930
44	BDNF CRP	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	GPI	0,930
45	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	LRIG3	0,930
46	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	0,930
47	BDNF TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	CHRDL1	STX1A	0,930
48	KLK3-SERPINA3 PA2G4	BDNF CLIC1	MMP7	CHRDL1	STX1A	0,930
49	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	AHSG	STX1A	0,930
50	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	IGFBP2	MMP7	STX1A	0,930
51	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	KIT	CDH1	MMP7	0,930
52	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	CDH1	MMP7	LRIG3	0,930
53	BDNF CRP	GHR CLIC1	TGFBI	LRIG3	STX1A	0,930
54	KLK3-SERPINA3 PA2G4	BDNF CLIC1	MMP7	TGFBI	STX1A	0,930
55	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	LRIG3	0,930
56	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	0,930
57	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	STX1A	0,930
58	BDNF TPI1	MMP7 CLIC1	GHR	SERPINA1	STX1A	0,930
59	BDNF STX1A	EGFR CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	0,930
60	BDNF CRP	GHR CLIC1	TGFBI	CHRDL1	STX1A	0,930
61	BDNF CLIC1	MMP7 PLA2G7	GHR	STX1A	CRP	0,930
62	BDNF CRP	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	TPT1	0,930
63	BDNF STX1A	KIT CLIC1	MMP7	GHR	TGFBI	0,930
64	BDNF PA2G4	KIT CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,930

ES 2 674 318 T3

65	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF PLA2G7	MMP7	GHR	STX1A	0,930
66	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	IGFBP2	MMP7	LRIG3	0,930
67	BDNF NME2	KIT CRP	TGFBI	LRIG3	CHRDL1	0,930
68	TGFBI NME2	LRIG3 CRP	CHRDL1	AHSG	STX1A	0,930
69	BDNF TPI1	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	0,929
70	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF PLA2G7	MMP7	STX1A	NME2	0,929
71	KLK3-SERPINA3 PA2G4	KIT CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,929
72	KLK3-SERPINA3 TPI1	BDNF CLIC1	KIT	MMP7	LRIG3	0,929
73	BDNF GPI	CDH1 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,929
74	BDNF TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	0,929
75	BDNF CRP	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	GPI	0,929
76	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	MMP7	C9	STX1A	0,929
77	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	C9	TGFBI	CMA1	0,929
78	CDH1 CRP	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	STX1A	0,929
79	BDNF HNRNPAB	MMP7 CLIC1	GHR	C9	STX1A	0,929
80	BDNF YWHAG	MMP7 CLIC1	C9	LRIG3	STX1A	0,929
81	BDNF CRP	IGFBP2 CLIC1	TGFBI	LRIG3	STX1A	0,929
82	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	STX1A	0,929
83	BDNF CRP	IGFBP2 CLIC1	MMP7	LRIG3	NME2	0,929
84	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	CHRDL1	STX1A	0,929
85	BDNF STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	C9	TGFBI	0,929
86	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	C9	TGFBI	STX1A	0,929

87	BDNF ITIH4	EGFR CLIC1	MMP7	STX1A	TPI1	0,929
88	KLK3-SERPINA3 YWHAG	BDNF CLIC1	MMP7	C9	STX1A	0,929
89	KLK3-SERPINA3 PA2G4	BDNF CLIC1	MMP7	LRIG3	STX1A	0,929
90	KLK3-SERPINA3 ITIH4	BDNF CLIC1	MMP7	STX1A	PA2G4	0,929
91	KLK3-SERPINA3 HNRNPAB	BDNF CLIC1	MMP7	LRIG3	STX1A	0,929
92	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CLIC1	EGFR	MMP7	TGFBI	0,929
93	BDNF ITIH4	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	TPI1	0,929
94	BDNF CRP	CDH1 CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,929
95	BDNF CLIC1	MMP7 PLA2G7	GHR	STX1A	NME2	0,929
96	KLK3-SERPINA3 TPI1	BDNF CLIC1	MMP7	TGFBI	STX1A	0,929
97	BDNF ITIH4	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	PA2G4	0,929
98	MMP7 CRP	GHR CLIC1	BMP1	STX1A	NME2	0,929
99	KLK3-SERPINA3 CLIC1	BDNF PLA2G7	MMP7	STX1A	L1CAM	0,929
100	BDNF GPI	KIT CLIC1	MMP7	GHR	STX1A	0,929

**Tabla 9: Paneles de 8 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC
1	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	KIT CLIC1	MMP7	GHR	0,940
2	BDNF STX1A	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	CHRD1	AHSG	0,938
3	BDNF NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	STX1A	0,938
4	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	KIT CLIC1	MMP7	LRIG3	0,937
5	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,937
6	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,937
7	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	KIT CLIC1	MMP7	GHR	0,937

ES 2 674 318 T3

8	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	0,937
9	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,937
10	BDNF GPI	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	STX1A	0,936
11	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	KIT CLIC1	MMP7	GHR	0,936
12	BDNF STX1A	EGFR NME2	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,936
13	BDNF PA2G4	MMP7 GPI	GHR CLIC1	C9	STX1A	0,936
14	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,936
15	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,936
16	BDNF AHSG	CDH1 STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,936
17	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	AHSG	0,936
18	BDNF STX1A	EGFR GPI	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,936
19	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	KIT CLIC1	MMP7	GHR	0,936
20	KLK3-SERPINA3 PA2G4	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	0,936
21	BDNF STX1A	GHR CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	AHSG	0,936
22	BDNF TPI1	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	STX1A	0,936
23	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	0,936
24	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	C9	0,936
25	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	CDH1 CLIC1	MMP7	LRIG3	0,936
26	KLK3-SERPINA3 TPI1	BDNF ITIH4	KIT CLIC1	MMP7	STX1A	0,936
27	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,935
28	BDNF STX1A	KIT TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	C9	0,935
29	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,935

ES 2 674 318 T3

30	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF ITIH4	KIT CLIC1	MMP7	STX1A	0,935
31	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CLIC1	TGFBI	AHSG	0,935
32	BDNF PA2G4	KIT ITIH4	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	0,935
33	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	LRIG3	CHRDL1	0,935
34	BDNF PA2G4	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	STX1A	0,935
35	BDNF STX1A	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,935
36	BDNF GPI	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,935
37	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	MMP7 CLIC1	LRIG3	CHRDL1	0,935
38	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT CLIC1	CDH1	MMP7	0,935
39	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	MMP7 CLIC1	LRIG3	CHRDL1	0,935
40	BDNF STX1A	GHR CRP	TGFBI CLIC1	CHRDL1	AHSG	0,935
41	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	KIT CLIC1	MMP7	LRIG3	0,935
42	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,935
43	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	CHRDL1	0,935
44	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	TGFBI	CHRDL1	0,935
45	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	CHRDL1	0,935
46	BDNF STX1A	MMP7 TPT1	GHR CLIC1	C9	TGFBI	0,935
47	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	KIT CLIC1	MMP7	GHR	0,935
48	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	KIT CLIC1	MMP7	LRIG3	0,935
49	BDNF CRP	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	STX1A	TPI1	0,935
50	KLK3-SERPINA3 PA2G4	BDNF ITIH4	KIT CLIC1	MMP7	STX1A	0,935
51	BDNF STX1A	CDH1 CRP	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,935

ES 2 674 318 T3

52	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	C9	TGFBI	0,935
53	BDNF STX1A	KIT GPI	MMP7 CLIC1	GHR	C9	0,935
54	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	0,935
55	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,935
56	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	C9	AHSG	0,935
57	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR	LRIG3	0,935
58	BDNF GPI	MMP7 CRP	GHR CLIC1	STX1A	NME2	0,935
59	BDNF AHSG	GHR CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	CHRDL1	0,935
60	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF CLIC1	MMP7 PLA2G7	GHR	STX1A	0,935
61	BDNF TPI1	KIT ITIH4	MMP7 CLIC1	GHR	STX1A	0,935
62	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	GHR PLA2G7	C9	STX1A	0,935
63	BDNF NME2	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	C9	STX1A	0,935
64	BDNF NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	LRIG3	STX1A	0,935
65	BDNF STX1A	MMP7 YWHAG	GHR CLIC1	C9	TGFBI	0,935
66	BDNF PA2G4	MMP7 CRP	GHR CLIC1	CHRDL1	STX1A	0,935
67	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,935
68	BDNF TPI1	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	C9	STX1A	0,935
69	BDNF AHSG	EGFR STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,935
70	BDNF TPT1	MMP7 CRP	GHR CLIC1	CHRDL1	STX1A	0,935
71	BDNF CRP	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	STX1A	NME2	0,935
72	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,935
73	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	MMP7 CLIC1	TGFBI	LRIG3	0,935

ES 2 674 318 T3

74	BDNF CRP	MMP7 CLIC1	GHR PLA2G7	TGFBI	STX1A	0,935
75	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	MMP7 CLIC1	TGFBI	CHRDL1	0,935
76	BDNF PA2G4	MMP7 GPI	GHR CLIC1	TGFBI	STX1A	0,934
77	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CLIC1	C9	TGFBI	0,934
78	BDNF STX1A	GHR CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	CHRDL1	0,934
79	BDNF TPI1	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	TGFBI	STX1A	0,934
80	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	CHRDL1	0,934
81	BDNF STX1A	MMP7 TPT1	GHR CLIC1	C9	CHRDL1	0,934
82	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF HNRNPAB	KIT CLIC1	MMP7	GHR	0,934
83	BDNF NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	CHRDL1	STX1A	0,934
84	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	EGFR CLIC1	MMP7	TGFBI	0,934
85	BDNF STX1A	KIT HNRNPAB	MMP7 CLIC1	GHR	C9	0,934
86	BDNF NME2	MMP7 GPI	GHR CLIC1	C9	STX1A	0,934
87	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,934
88	BDNF STX1A	MMP7 CLIC1	GHR PLA2G7	TGFBI	AHSG	0,934
89	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF HNRNPAB	KIT CLIC1	MMP7	LRIG3	0,934
90	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 CLIC1	GHR	TGFBI	0,934
91	BDNF CRP	MMP7 CLIC1	GHR PLA2G7	STX1A	NME2	0,934
92	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 CLIC1	GHR	AHSG	0,934
93	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	MMP7 CLIC1	GHR	AHSG	0,934
94	BDNF CRP	MMP7 HNRNPAB	GHR CLIC1	TGFBI	STX1A	0,934
95	BDNF PA2G4	MMP7 GPI	GHR CLIC1	CHRDL1	STX1A	0,934

ES 2 674 318 T3

96	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	KIT CLIC1	MMP7	LRIG3	0,934
97	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	CHRD1	AHSG	0,934
98	BDNF GPI	MMP7 CLIC1	GHR PLA2G7	TGFBI	STX1A	0,934
99	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	C9	0,934
100	BDNF TPT1	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	C9	STX1A	0,934

**Tabla 10: Paneles de 9 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC
1	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	0,941
2	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CRP	TGFBI CLIC1	CHRD1	0,941
3	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 CLIC1	GHR	0,941
4	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	LRIG3	0,941
5	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	0,941
6	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	CHRD1	0,941
7	KLK3-SERPINA3 CHRD1	BDNF STX1A	MMP7 NME2	TGFBI CLIC1	LRIG3	0,940
8	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	0,940
9	KLK3-SERPINA3 CHRD1	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CLIC1	TGFBI	0,940
10	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 CLIC1	GHR	0,940
11	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 CLIC1	GHR	0,940
12	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CLIC1	TGFBI	0,940
13	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	KIT GPI	MMP7 CLIC1	GHR	0,940
14	BDNF AHSG	EGFR STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	TGFBI	0,940
15	BDNF STX1A	EGFR NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,940

ES 2 674 318 T3

16	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	CHRD1	0,940
17	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 GPI	GHR CLIC1	C9	0,940
18	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	0,940
19	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	TGFBI	0,940
20	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CRP	TGFBI CLIC1	AHSG	0,940
21	BDNF STX1A	MMP7 TPT1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	CHRD1	0,940
22	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	0,940
23	BDNF STX1A	CDH1 NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,940
24	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	TGFBI CLIC1	CHRD1	0,940
25	BDNF NME2	MMP7 GPI	GHR CRP	TGFBI CLIC1	STX1A	0,940
26	BDNF TPI1	KIT CRP	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	STX1A	0,940
27	KLK3-SERPINA3 CHRD1	BDNF STX1A	MMP7 TPT1	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
28	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 CLIC1	GHR	0,939
29	BDNF STX1A	IGFBP2 NME2	MMP7 CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3	0,939
30	KLK3-SERPINA3 AHSG	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	0,939
31	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR GPI	C9 CLIC1	CHRD1	0,939
32	BDNF TPI1	MMP7 CRP	GHR ITIH4	CHRD1 CLIC1	STX1A	0,939
33	KLK3-SERPINA3 CHRD1	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	TGFBI CLIC1	LRIG3	0,939
34	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 CLIC1	GHR	0,939
35	KLK3-SERPINA3 AHSG	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CLIC1	CHRD1	0,939
36	BDNF PA2G4	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	STX1A	0,939
37	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	C9	0,939

ES 2 674 318 T3

38	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	CHRD1	0,939
39	BDNF PA2G4	KIT CRP	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	STX1A	0,939
40	BDNF PA2G4	MMP7 GPI	GHR CRP	CHRD1 CLIC1	STX1A	0,939
41	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	IGFBP2 NME2	MMP7 CLIC1	TGFBI	0,939
42	BDNF NME2	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	STX1A	0,939
43	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT HNRNPAB	MMP7 CLIC1	GHR	0,939
44	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
45	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR GPI	C9 CLIC1	TGFBI	0,939
46	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
47	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF GPI	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
48	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
49	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
50	BDNF SERPINA1	MMP7 STX1A	GHR TPI1	TGFBI CLIC1	CHRD1	0,939
51	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 CLIC1	TGFBI	0,939
52	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
53	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
54	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	KIT ITIH4	MMP7 CLIC1	GHR	0,939
55	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	MMP7 GPI	GHR CLIC1	CHRD1	0,939
56	BDNF AHSB	GHR STX1A	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	CHRD1	0,939
57	KLK3-SERPINA3 GHR	BDNF STX1A	KIT TPT1	CDH1 CLIC1	MMP7	0,939
58	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	EGFR PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	0,939
59	KLK3-SERPINA3 AHSB	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CLIC1	TGFBI	0,939

ES 2 674 318 T3

60	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 CLIC1	TGFBI	0,939
61	KLK3-SERPINA3 CHRDL1	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
62	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 TPI1	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
63	BDNF AHSG	CDH1 STX1A	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
64	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CRP	CHRDL1 CLIC1	AHSG	0,939
65	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
66	KLK3-SERPINA3 AHSG	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	TGFBI	0,939
67	BDNF AHSG	EGFR STX1A	MMP7 CLIC1	GHR PLA2G7	TGFBI	0,939
68	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	KIT TPT1	MMP7 CLIC1	GHR	0,938
69	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF PA2G4	MMP7 ITIH4	CHRDL1 CLIC1	STX1A	0,938
70	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	KIT ITIH4	MMP7 CLIC1	LRIG3	0,938
71	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	C9	0,938
72	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 GPI	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
73	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 GPI	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
74	KLK3-SERPINA3 GHR	BDNF STX1A	KIT PA2G4	CDH1 CLIC1	MMP7	0,938
75	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	EGFR NME2	MMP7 CLIC1	TGFBI	0,938
76	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT GPI	MMP7 CLIC1	GHR	0,938
77	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 CRP	GHR CLIC1	LRIG3	0,938
78	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF PA2G4	MMP7 GPI	GHR CLIC1	AHSG	0,938
79	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
80	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPT1	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	CHRDL1	0,938
81	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	CHRDL1 CLIC1	AHSG	0,938

ES 2 674 318 T3

82	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT NME2	CDH1 CLIC1	MMP7	0,938
83	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	C9	0,938
84	BDNF AHSG	IGFBP2 STX1A	MMP7 TPI1	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
85	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF TPI1	KIT ITIH4	MMP7 CLIC1	GHR	0,938
86	BDNF STX1A	MMP7 TPT1	GHR CRP	CHRDL1 CLIC1	AHSG	0,938
87	BDNF TPI1	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	STX1A	0,938
88	BDNF NME2	KIT CRP	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	STX1A	0,938
89	KLK3-SERPINA3 AHSG	BDNF STX1A	EGFR PA2G4	MMP7 CLIC1	GHR	0,938
90	KLK3-SERPINA3 CHRDL1	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
91	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR GPI	TGFBI CLIC1	LRIG3	0,938
92	BDNF LRIG3	CDH1 AHSG	MMP7 STX1A	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
93	BDNF STX1A	CDH1 GPI	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
94	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF GPI	MMP7 CRP	GHR CLIC1	STX1A	0,938
95	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR TPI1	C9 CLIC1	CHRDL1	0,938
96	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,938
97	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	EGFR TPI1	MMP7 CLIC1	GHR	0,938
98	BDNF NME2	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI PLA2G7	STX1A	0,938
99	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	BMP1	0,938
100	BDNF STX1A	EGFR GPI	MMP7 CRP	GHR CLIC1	TGFBI	0,938

**Tabla 11: Paneles de 10 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC
1	BDNF SERPINA1	MMP7 STX1A	GHR NME2	TGFBI PA2G4	CHRDL1 CLIC1	0,944
2	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR TPI1	TGFBI CRP	CHRDL1 CLIC1	0,944

ES 2 674 318 T3

3	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,944
4	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CRP	TGFBI ITIH4	CHRD1 CLIC1	0,944
5	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	0,944
6	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI ITIH4	CHRD1 CLIC1	0,943
7	KLK3-SERPINA3 CHRD1	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR TPI1	TGFBI CLIC1	0,943
8	BDNF CHRD1	MMP7 STX1A	GHR TPI1	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	0,943
9	KLK3-SERPINA3 CHRD1	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,943
10	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 TPI1	GHR CLIC1	0,943
11	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR GPI	TGFBI CRP	CHRD1 CLIC1	0,943
12	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR NME2	TGFBI CRP	CHRD1 CLIC1	0,943
13	BDNF LRIG3	IGFBP2 STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,943
14	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	0,943
15	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,943
16	BDNF CHRD1	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	C9 GPI	TGFBI CLIC1	0,943
17	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	TGFBI CRP	CHRD1 CLIC1	0,943
18	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR PA2G4	TGFBI CRP	CHRD1 CLIC1	0,943
19	BDNF CHRD1	EGFR STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,943
20	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI ITIH4	CHRD1 CLIC1	0,943
21	BDNF NME2	MMP7 PA2G4	GHR CRP	CHRD1 ITIH4	STX1A CLIC1	0,943
22	BDNF CHRD1	MMP7 STX1A	GHR NME2	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	0,942
23	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF NME2	MMP7 PA2G4	GHR CRP	CHRD1 CLIC1	0,942
24	KLK3-SERPINA3 CHRD1	BDNF SERPINA1	MMP7 STX1A	TGFBI TPI1	LRIG3 CLIC1	0,942

ES 2 674 318 T3

25	KLK3-SERPINA3 AHSG	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
26	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 TPT1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
27	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR NME2	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	0,942
28	KLK3-SERPINA3 AHSG	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR GPI	CHRDL1 CLIC1	0,942
29	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR TPT1	C9 PA2G4	CHRDL1 CLIC1	0,942
30	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF AHSG	EGFR STX1A	MMP7 TPI1	GHR CLIC1	0,942
31	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF AHSG	EGFR STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	0,942
32	BDNF AHSG	EGFR STX1A	MMP7 NME2	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	0,942
33	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR GPI	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	0,942
34	BDNF CHRDL1	MMP7 STX1A	GHR NME2	C9 PA2G4	TGFBI CLIC1	0,942
35	KLK3-SERPINA3 CHRDL1	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
36	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	TGFBI ITIH4	CHRDL1 CLIC1	0,942
37	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF AHSG	KIT STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	0,942
38	BDNF TGFBI	KIT STX1A	EGFR TPI1	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	0,942
39	KLK3-SERPINA3 CHRDL1	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	TGFBI CLIC1	0,942
40	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
41	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR GPI	CHRDL1 CRP	AHSG CLIC1	0,942
42	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 TPI1	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	0,942
43	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF AHSG	KIT STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	0,942
44	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CLIC1	0,942
45	KLK3-SERPINA3 CHRDL1	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR PA2G4	TGFBI CLIC1	0,942
46	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 NME2	GHR CLIC1	0,942

ES 2 674 318 T3

47	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	C9 GPI	CHRDL1 CLIC1	0,942
48	BDNF AHSG	MMP7 GPI	GHR TPI1	C9 CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
49	BDNF LRIG3	CDH1 STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
50	BDNF AHSG	EGFR STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
51	BDNF SERPINA1	MMP7 STX1A	GHR TPI1	TGFBI CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
52	BDNF AHSG	CDH1 STX1A	MMP7 TPT1	GHR CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
53	BDNF STX1A	EGFR TPI1	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	0,942
54	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF CHRDL1	MMP7 STX1A	GHR TPI1	TGFBI CLIC1	0,942
55	BDNF CHRDL1	MMP7 STX1A	GHR CRP	TGFBI HNRNPAB	LRIG3 CLIC1	0,942
56	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 TPT1	GHR CLIC1	0,942
57	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT TPI1	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	0,942
58	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 CRP	GHR CLIC1	0,942
59	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	CHRDL1 PLA2G7	0,942
60	BDNF TGFBI	EGFR AHSG	MMP7 STX1A	GHR NME2	C9 CLIC1	0,942
61	BDNF CHRDL1	KIT TPI1	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	0,942
62	BDNF CHRDL1	MMP7 STX1A	GHR GPI	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	0,942
63	BDNF CHRDL1	MMP7 AHSG	GHR STX1A	TGFBI NME2	LRIG3 CLIC1	0,942
64	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF STX1A	KIT PA2G4	MMP7 ITIH4	GHR CLIC1	0,942
65	KLK3-SERPINA3 GHR	BDNF TGFBI	KIT STX1A	EGFR PA2G4	MMP7 CLIC1	0,942
66	KLK3-SERPINA3 GHR	BDNF LRIG3	KIT STX1A	CDH1 NME2	MMP7 CLIC1	0,942
67	BDNF STX1A	MMP7 PA2G4	GHR GPI	TGFBI ITIH4	CHRDL1 CLIC1	0,942
68	BDNF CHRDL1	MMP7 GPI	GHR TPI1	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	0,942

ES 2 674 318 T3

69	KLK3-SERPINA3 STX1A	BDNF GPI	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
70	BDNF FN1	MMP7 STX1A	GHR TPI1	TGFBI CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
71	BDNF STX1A	EGFR NME2	MMP7 CRP	GHR ITIH4	TGFBI CLIC1	0,942
72	BDNF SERPINA1	MMP7 AHSG	GHR STX1A	TGFBI TPI1	CHRDL1 CLIC1	0,942
73	BDNF AHSG	CDH1 STX1A	MMP7 PA2G4	GHR CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
74	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR TPI1	TGFBI CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
75	BDNF CHRDL1	HMGB1 AHSG	MMP7 STX1A	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
76	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR GPI	TGFBI CRP	CHRDL1 CLIC1	0,942
77	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF LRIG3	KIT CHRDL1	MMP7 TPI1	GHR CLIC1	0,942
78	BDNF LRIG3	KIT CHRDL1	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,942
79	BDNF CHRDL1	MMP7 AHSG	GHR TPI1	C9 CRP	TGFBI CLIC1	0,942
80	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR GPI	C9 TPI1	CHRDL1 CLIC1	0,942
81	BDNF CHRDL1	EGFR AHSG	MMP7 STX1A	GHR NME2	TGFBI CLIC1	0,942
82	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	LRIG3 PLA2G7	0,941
83	BDNF CHRDL1	MMP7 AHSG	GHR STX1A	C9 TPT1	TGFBI CLIC1	0,941
84	BDNF SERPINA1	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	TGFBI GPI	CHRDL1 CLIC1	0,941
85	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	TGFBI GPI	CHRDL1 CLIC1	0,941
86	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 GPI	GHR CLIC1	0,941
87	KLK3-SERPINA3 CHRDL1	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR TPI1	LRIG3 CLIC1	0,941
88	KLK3-SERPINA3 TGFBI	BDNF CHRDL1	MMP7 STX1A	GHR PA2G4	CNTN1 CLIC1	0,941
89	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR PA2G4	C9 ITIH4	CHRDL1 CLIC1	0,941
90	BDNF AHSG	IGFBP2 STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,941

ES 2 674 318 T3

91	BDNF CHRDL1	MMP7 GPI	GHR TPI1	C9 CRP	TGFBI CLIC1	0,941
92	BDNF CHRDL1	MMP7 STX1A	GHR TPT1	TGFBI CRP	LRIG3 CLIC1	0,941
93	KLK3-SERPINA3 LRIG3	BDNF STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,941
94	BDNF CHRDL1	EGFR STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,941
95	BDNF LRIG3	KIT STX1A	MMP7 NME2	GHR CRP	C9 CLIC1	0,941
96	BDNF LRIG3	CDH1 AHSG	MMP7 STX1A	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,941
97	BDNF STX1A	MMP7 GPI	GHR TPI1	CHRDL1 CRP	AHSG CLIC1	0,941
98	BDNF STX1A	KIT NME2	MMP7 GPI	GHR CRP	LRIG3 CLIC1	0,941
99	KLK3-SERPINA3 AHSG	BDNF STX1A	MMP7 TPI1	GHR CRP	TGFBI CLIC1	0,941
100	BDNF AHSG	MMP7 STX1A	GHR NME2	C9 GPI	CHRDL1 CLIC1	0,941

**Tabla 12: Recuentos de marcadores en paneles de biomarcadores**

Biomarcador	Tamaño del panel							
	3	4	5	6	7	8	9	10
AHSG	37	45	59	85	116	159	222	349
AKR7A2	87	48	23	9	3	3	1	0
AKT3	0	0	0	0	0	0	0	1
BDNF	53	129	332	583	801	953	988	995
BMP1	81	93	84	74	42	32	26	23
BMPER	13	1	0	0	0	0	0	0
C9	131	178	252	244	233	211	203	194
CA6	29	14	1	0	0	0	0	0
CAPG	6	0	0	0	0	0	0	0
CDH1	22	56	104	105	112	129	145	166
CHRDL1	50	61	81	98	116	170	304	477
CKB-CKM	26	18	8	8	6	2	0	1
CLIC1	260	447	669	883	978	994	1000	1000
CMA1	84	119	189	158	99	62	37	19
CNTN1	20	52	61	59	42	30	31	29
COL18A1	25	17	7	0	1	0	0	0
CRP	74	89	95	112	153	200	308	454
CTSL2	2	0	0	0	0	0	0	0

ES 2 674 318 T3

DDC	37	23	7	5	4	0	0	0
EGFR	63	47	27	41	50	88	100	121
FGA-FGB-FGG	23	0	0	0	0	0	0	0
FN1	3	0	0	2	0	2	8	18
GHR	32	67	159	315	452	587	745	850
GPI	71	79	103	147	167	183	202	225
HMGB1	15	36	11	17	19	4	6	4
HNRNPAB	46	27	35	45	60	41	38	32
HP	21	7	0	0	0	0	0	0
HSP90AA1	2	0	0	0	0	0	0	0
HSPA1A	6	2	0	0	0	0	0	0
IGFBP2	42	51	74	105	142	129	91	67
IGFBP4	19	6	1	3	2	0	5	6
ITIH4	23	46	51	64	117	163	180	208
KIT	21	26	30	51	109	203	295	327
KLK3-SERPINA3	111	188	262	287	307	338	377	378
L1CAM	41	45	44	16	9	8	3	8
LRIG3	109	161	241	293	330	367	376	407
MMP12	71	29	5	2	0	0	0	0
MMP7	270	626	782	852	916	960	982	996
NME2	83	77	112	159	189	251	282	299
PA2G4	7	33	41	57	85	146	203	275
PLA2G7	17	32	28	30	47	67	70	66
PLAUR	33	22	11	5	0	0	0	0
PRKACA	8	0	0	0	0	0	0	0
PRKCB	3	0	0	0	0	0	0	0
PROK11	2	0	0	0	0	0	0	0
PRSS2	5	0	0	0	0	0	0	0
PTN	17	2	0	0	0	0	0	0
SERPINA1	51	35	23	16	29	36	43	68
STC1	17	10	7	4	4	8	8	7
STX1A	131	268	345	520	691	823	902	934
TACSTD2	7	1	2	0	1	0	0	3
TGFBI	62	98	136	191	266	339	462	579
TPI1	42	64	106	124	139	187	243	305
TPT1	54	33	22	29	67	88	108	108
YWHAG	419	492	369	202	96	37	6	1
YWHAH	16	0	1	0	0	0	0	0

**Tabla 13: Analitos en clasificadores de diez marcadores**

CLIC1	BDNF
MMP7	STX1A
GHR	TGFBI
CHRD1	CRP
LRIG3	KLK3-SERPINA3
AHSG	KIT

**Tabla 14: Parámetros obtenidos del conjunto de entrenamiento para clasificador bayesiano simple.**

Biomarcador	$\mu_c$	$\mu_d$	$\sigma_c$	$\sigma_d$
BMPER	7,450	7,323	0,108	0,164
COL18A1	8,763	8,876	0,125	0,162
CMA1	6,800	6,754	0,047	0,041
MMP7	8,881	9,232	0,235	0,182
KIT	9,603	9,503	0,139	0,141
IGFBP2	8,514	9,006	0,417	0,448
PROK11	6,196	6,154	0,042	0,058
DDC	6,746	6,711	0,034	0,043
PRKACA	7,594	7,753	0,187	0,113
FGA-FGB-FGG	9,836	10,258	0,338	0,580
CNTN1	9,265	9,149	0,181	0,114
CRP	7,733	9,005	1,095	1,422
HNRNPAB	7,252	7,517	0,304	0,225
HSP90AA1	9,165	9,343	0,226	0,182
PLA2G7	10,131	9,952	0,277	0,184
BDNF	6,931	6,854	0,102	0,068
AKR7A2	6,761	7,155	0,432	0,248
IGFBP4	8,138	8,268	0,140	0,163
PLAUR	8,248	8,385	0,133	0,178
C9	11,715	11,936	0,189	0,223
SERPINA1	10,215	10,371	0,169	0,239
STC1	8,475	8,691	0,242	0,293
HP	11,848	12,057	0,222	0,196
L1CAM	7,893	7,721	0,226	0,152
ITIH4	10,596	10,738	0,121	0,227
BMP1	8,766	8,548	0,213	0,234
TFF3	8,288	8,536	0,195	0,307
PRKCB	6,817	6,780	0,051	0,060
IL12B-IL23A	6,189	6,153	0,037	0,039
CLIC1	7,907	8,260	0,259	0,230

ES 2 674 318 T3

CDH1	9,252	9,050	0,200	0,181
CHRDL1	8,665	8,938	0,215	0,388
EGFR	10,578	10,428	0,119	0,135
ASGR1	6,661	6,619	0,050	0,052
TACSTD2	6,879	6,849	0,040	0,043
PRSS2	10,080	10,457	0,421	0,529
AKT3	7,816	7,886	0,074	0,068
HMGB1	8,430	8,546	0,133	0,096
CAPG	7,271	7,602	0,272	0,277
YWHAH	7,644	7,774	0,107	0,105
PTN	8,149	8,250	0,116	0,152
YWHAG	8,156	8,496	0,205	0,187
CTSL2	6,262	6,207	0,063	0,069
GHR	7,724	7,595	0,135	0,102
TGFBI	9,944	9,777	0,178	0,239
GPI	7,506	7,760	0,278	0,260
TPI1	9,087	9,392	0,450	0,221
STX1A	7,186	7,143	0,035	0,033
LRIG3	7,411	7,301	0,090	0,092
TPT1	8,847	9,137	0,290	0,224
PA2G4	7,735	8,026	0,643	0,329
NME2	6,333	6,618	0,339	0,242
CKB-CKM	7,515	7,230	0,317	0,307
CA6	7,180	7,038	0,228	0,108
AHSG	11,197	11,107	0,149	0,134
KLK3-SERPINA3	8,102	8,327	0,194	0,330
FN1	9,286	9,058	0,239	0,325
MMP12	6,129	6,323	0,100	0,260
HSPA1A	8,819	9,011	0,316	0,224

**Tabla 15: ABC para combinaciones de biomarcadores a modo de ejemplo**

N.º										ABC
1	MMP7									0,803
2	MMP7	CLIC1								0,883
3	MMP7	CLIC1	STX1A							0,901
4	MMP7	CLIC1	STX1A	CHRDL1						0,899
5	MMP7	CLIC1	STX1A	CHRDL1	PA2G4					0,912
6	MMP7	CLIC1	STX1A	CHRDL1	PA2G4	SERPINA1				0,922
7	MMP7	CLIC1	STX1A	CHRDL1	PA2G4	SERPINA1	BDNF			0,930

8	MMP7	CLIC1	STX1A	CHRDL1	PA2G4	SERPINA1	BDNF	GHR			0,937
9	MMP7	CLIC1	STX1A	CHRDL1	PA2G4	SERPINA1	BDNF	GHR	TGFBI		0,944
10	MMP7	CLIC1	STX1A	CHRDL1	PA2G4	SERPINA1	BDNF	GHR	TGFBI	NME2	0,948

**Tabla 16: Cálculos obtenidos del conjunto de entrenamiento para clasificador bayesiano simple.**

Biomarcador	$\mu_c$	$\mu_d$	$\sigma_c$	$\sigma_d$	$n$	$p(c \bar{x})$	$p(d \bar{x})$	$\ln(p(d \bar{x})/p(c \bar{x}))$
GHR	7,724	7,595	0,135	0,102	7,860	1,778	0,136	-2,572
SERPINA1	10,215	10,371	0,169	0,239	10,573	0,252	1,166	1,531
STX1A	7,186	7,143	0,035	0,033	7,259	1,382	0,024	-4,053
CHRDL1	8,665	8,938	0,215	0,388	8,405	0,896	0,401	-0,804
CLIC1	7,907	8,260	0,259	0,230	8,068	1,267	1,226	-0,034
PA2G4	7,735	8,026	0,643	0,329	7,285	0,486	0,096	-1,622
NME2	6,333	6,618	0,339	0,242	6,322	1,175	0,783	-0,406
MMP7	8,881	9,232	0,235	0,182	8,684	1,194	0,023	-3,942
TGFBI	9,944	9,777	0,178	0,239	9,778	1,446	1,669	0,144
BDNF	6,931	6,854	0,102	0,068	6,904	3,768	4,484	0,174

**Tabla 17: Características clínicas del conjunto de entrenamiento**

Metadatos	Niveles	Control	Enfermedad	valor de p
Muestras		218	46	
SEXO	F	118	36	4,34e-03
	M	100	10	
EDAD	Media	57,2	67,3	2,35e-07
	DT	10,2	10,8	
ESTADIO DE CÁNCER	I	0	26	NaN
	II	0	4	
	III	0	7	
	IV	0	9	
USUARIO DE TABACO	Nunca	1	2	1,27e-10
	No indicado	3	10	
	Pasado	84	24	
	Actual	130	10	

5

**Tabla 18: Proteínas de clasificadores de diez biomarcadores**

Biomarcador	UniProt ID	Dirección*	Proceso biológico (GO)
BDNF	P23560	Descendente	respuesta a la tensión comunicación celular regulación de la muerte celular proceso de señalización
MMP7	P09237	Ascendente	proteólisis
GHR	P10912	Descendente	regulación de la muerte celular proceso de señalización señalización regulación de la ruta de señalización

TGFBI	Q15582	Descendente	proliferación celular regulación de la adhesión celular
CHRD1	Q9BU40	Ascendente	señalización
SERPINA1	P01009	Ascendente	respuesta a la tensión
STX1A	Q16623	Descendente	comunicación celular señalización
NME2	P22392	Ascendente	
PA2G4	Q9UQ80	Ascendente	proliferación celular
CLIC1	000299	Ascendente	proceso de señalización

**Tabla 19: Biomarcadores de cáncer general**

KLK3-SERPINA3	EGFR
BMPER	FGA-FGB-FGG
C9	STX1A
AKR7A2	CKB-CKM
DDC	CA6
IGFBP2	IGFBP4
FN1	BMP1
CRP	KIT
CNTN1	SERPINA1
BDNF	GHR
ITIH4	NME2
AHSG	

**Tabla 20: Paneles de 1 biomarcador**

Marcadores		ABC de VC media
1	C9	0,792
2	KLK3-SERPINA3	0,782
3	CRP	0,763
4	BMPER	0,745
5	BMP1	0,732
6	KIT	0,729
7	AKR7A2	0,726
8	EGFR	0,726
9	ITIH4	0,721
10	IGFBP2	0,720
11	BDNF	0,720
12	STX1A	0,719
13	NME2	0,714
14	FGA-FGB-FGG	0,712

ES 2 674 318 T3

15	CNTN1	0,708
16	CKB-CKM	0,708
17	AHSG	0,707
18	GHR	0,704
19	IGFBP4	0,703
20	CA6	0,700
21	DDC	0,696
22	FN1	0,694
23	SERPINA1	0,688

**Tabla 21: Paneles de 2 biomarcadores**

Marcadores			ABC de VC media
1	C9	AKR7A2	0,832
2	KLK3-SERPINA3	AKR7A2	0,831
3	KLK3-SERPINA3	NME2	0,828
4	AKR7A2	CRP	0,827
5	KLK3-SERPINA3	EGFR	0,826
6	KLK3-SERPINA3	STX1A	0,826
7	C9	NME2	0,824
8	KLK3-SERPINA3	BDNF	0,823
9	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	0,822
10	KLK3-SERPINA3	CA6	0,819
11	KIT	C9	0,819
12	BDNF	C9	0,818
13	KLK3-SERPINA3	BMP1	0,816
14	KLK3-SERPINA3	BMPER	0,816
15	NME2	CRP	0,815
16	KLK3-SERPINA3	KIT	0,815
17	C9	BMPER	0,814
18	BMPER	NME2	0,812
19	KLK3-SERPINA3	C9	0,811
20	KLK3-SERPINA3	CRP	0,811
21	C9	STX1A	0,811
22	EGFR	C9	0,811
23	BMPER	AKR7A2	0,810
24	BMPER	CRP	0,810
25	BDNF	CRP	0,810
26	C9	DDC	0,809
27	KLK3-SERPINA3	CNTN1	0,809

ES 2 674 318 T3

28	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	0,808
29	SERPINA1	AKR7A2	0,808
30	AKR7A2	ITIH4	0,808
31	C9	AHSG	0,807
32	IGFBP4	C9	0,807
33	KLK3-SERPINA3	DDC	0,807
34	BMP1	AKR7A2	0,806
35	CNTN1	C9	0,806
36	STX1A	CRP	0,805
37	IGFBP2	CRP	0,805
38	NME2	ITIH4	0,805
39	BMP1	CRP	0,805
40	KLK3-SERPINA3	AHSG	0,804
41	C9	CA6	0,803
42	C9	CRP	0,802
43	GHR	C9	0,802
44	BDNF	AKR7A2	0,802
45	KLK3-SERPINA3	FN1	0,801
46	BDNF	KIT	0,801
47	KLK3-SERPINA3	GHR	0,799
48	EGFR	ITIH4	0,799
49	C9	BMP1	0,798
50	KIT	CRP	0,798
51	IGFBP2	C9	0,798
52	BMP1	NME2	0,797
53	C9	ITIH4	0,797
54	EGFR	AKR7A2	0,797
55	NME2	FGA-FGB-FGG	0,796
56	EGFR	CRP	0,795
57	IGFBP2	AKR7A2	0,795
58	STX1A	ITIH4	0,795
59	SERPINA1	NME2	0,795
60	KIT	AKR7A2	0,795
61	IGFBP2	BMPER	0,794
62	CNTN1	AKR7A2	0,794
63	C9	FN1	0,794
64	AKR7A2	FGA-FGB-FGG	0,793
65	BDNF	NME2	0,793
66	GHR	CRP	0,792

ES 2 674 318 T3

67	AHSG	AKR7A2	0,792
68	CNTN1	BMPER	0,791
69	KIT	BMP1	0,791
70	CNTN1	BMP1	0,791
71	KIT	BMPER	0,790
72	KLK3-SERPINA3	ITIH4	0,790
73	DDC	CRP	0,789
74	CA6	CRP	0,788
75	IGFBP4	AKR7A2	0,788
76	IGFBP4	CRP	0,788
77	GHR	BMPER	0,787
78	IGFBP2	CNTN1	0,787
79	EGFR	NME2	0,787
80	BMPER	ITIH4	0,786
81	BDNF	CNTN1	0,785
82	C9	CKB-CKM	0,785
83	GHR	AKR7A2	0,785
84	FN1	CRP	0,784
85	BDNF	BMPER	0,784
86	CNTN1	CRP	0,784
87	KLK3-SERPINA3	CKB-CKM	0,784
88	EGFR	AHSG	0,783
89	EGFR	BMPER	0,783
90	STX1A	NME2	0,783
91	BMP1	BMPER	0,783
92	DDC	ITIH4	0,783
93	CA6	BMPER	0,782
94	STX1A	AKR7A2	0,781
95	CRP	ITIH4	0,781
96	BDNF	ITIH4	0,780
97	IGFBP2	ITIH4	0,780
98	AHSG	NME2	0,779
99	CNTN1	NME2	0,779
100	CA6	AKR7A2	0,778

Tabla 22: Paneles de 3 biomarcadores

Marcadores				ABC de VC media
1	IGFBP2	AKR7A2	CRP	0,849
2	KLK3-SERPINA3	BMPER	NME2	0,849

ES 2 674 318 T3

3	KLK3-SERPINA3	C9	AKR7A2	0,848
4	KLK3-SERPINA3	AKR7A2	CRP	0,848
5	KLK3-SERPINA3	EGFR	AKR7A2	0,848
6	BMP1	AKR7A2	CRP	0,848
7	C9	BMPER	AKR7A2	0,848
8	C9	BMPER	NME2	0,848
9	KLK3-SERPINA3	BMP1	AKR7A2	0,847
10	C9	AKR7A2	CRP	0,847
11	KLK3-SERPINA3	BMP1	NME2	0,847
12	BDNF	KIT	C9	0,846
13	BDNF	C9	AKR7A2	0,845
14	KLK3-SERPINA3	EGFR	NME2	0,845
15	BMPER	NME2	CRP	0,845
16	BMPER	AKR7A2	CRP	0,845
17	KLK3-SERPINA3	BMPER	AKR7A2	0,845
18	KLK3-SERPINA3	BDNF	AKR7A2	0,844
19	KIT	C9	AKR7A2	0,844
20	KLK3-SERPINA3	NME2	CRP	0,844
21	EGFR	C9	AKR7A2	0,844
22	BDNF	AKR7A2	CRP	0,844
23	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	AKR7A2	0,843
24	CNTN1	C9	AKR7A2	0,843
25	KLK3-SERPINA3	CA6	AKR7A2	0,843
26	C9	AHSG	AKR7A2	0,843
27	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	AKR7A2	0,843
28	KLK3-SERPINA3	BDNF	KIT	0,842
29	KLK3-SERPINA3	C9	NME2	0,842
30	KLK3-SERPINA3	CNTN1	AKR7A2	0,842
31	KLK3-SERPINA3	BDNF	NME2	0,841
32	BMP1	NME2	CRP	0,841
33	KLK3-SERPINA3	KIT	AKR7A2	0,841
34	KIT	AKR7A2	CRP	0,841
35	BMPER	NME2	ITIH4	0,840
36	EGFR	AKR7A2	CRP	0,840
37	KLK3-SERPINA3	STX1A	AKR7A2	0,840
38	IGFBP4	C9	AKR7A2	0,839
39	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	NME2	0,839
40	KLK3-SERPINA3	CNTN1	NME2	0,839
41	C9	DDC	AKR7A2	0,839

ES 2 674 318 T3

42	BDNF	C9	NME2	0,839
43	GHR	AKR7A2	CRP	0,839
44	C9	BMP1	AKR7A2	0,839
45	KLK3-SERPINA3	BDNF	CNTN1	0,838
46	KLK3-SERPINA3	STX1A	NME2	0,838
47	IGFBP2	C9	AKR7A2	0,838
48	GHR	C9	AKR7A2	0,838
49	C9	AKR7A2	ITIH4	0,838
50	BMP1	BMPER	NME2	0,837
51	BDNF	KIT	CRP	0,837
52	C9	STX1A	AKR7A2	0,837
53	BDNF	NME2	CRP	0,837
54	KLK3-SERPINA3	AKR7A2	ITIH4	0,837
55	C9	NME2	CRP	0,836
56	C9	NME2	ITIH4	0,836
57	BMP1	BMPER	AKR7A2	0,836
58	KLK3-SERPINA3	BDNF	C9	0,836
59	KLK3-SERPINA3	AHSG	AKR7A2	0,836
60	KLK3-SERPINA3	CA6	NME2	0,835
61	KLK3-SERPINA3	GHR	AKR7A2	0,835
62	KIT	C9	NME2	0,835
63	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	0,835
64	C9	AHSG	NME2	0,835
65	BDNF	KIT	AKR7A2	0,835
66	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	NME2	0,835
67	STX1A	AKR7A2	CRP	0,835
68	KLK3-SERPINA3	KIT	STX1A	0,835
69	KLK3-SERPINA3	NME2	ITIH4	0,835
70	KLK3-SERPINA3	SERPINA1	AKR7A2	0,834
71	IGFBP4	AKR7A2	CRP	0,834
72	IGFBP2	BMPER	AKR7A2	0,834
73	EGFR	C9	NME2	0,834
74	KLK3-SERPINA3	BDNF	CRP	0,834
75	KLK3-SERPINA3	STX1A	CRP	0,834
76	GHR	BMPER	AKR7A2	0,833
77	IGFBP2	NME2	CRP	0,833
78	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMPER	0,833
79	KLK3-SERPINA3	KIT	BMP1	0,833
80	KLK3-SERPINA3	BDNF	EGFR	0,833

ES 2 674 318 T3

81	CNTN1	C9	NME2	0,833
82	KLK3-SERPINA3	KIT	NME2	0,833
83	KLK3-SERPINA3	BDNF	STX1A	0,833
84	KLK3-SERPINA3	AHSG	NME2	0,833
85	CNTN1	AKR7A2	CRP	0,833
86	C9	SERPINA1	AKR7A2	0,833
87	KLK3-SERPINA3	C9	STX1A	0,833
88	KLK3-SERPINA3	BDNF	CA6	0,833
89	EGFR	AKR7A2	ITIH4	0,833
90	KLK3-SERPINA3	KIT	EGFR	0,833
91	C9	DDC	NME2	0,833
92	KLK3-SERPINA3	DDC	AKR7A2	0,833
93	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,832
94	AKR7A2	CRP	ITIH4	0,832
95	KLK3-SERPINA3	EGFR	ITIH4	0,832
96	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,832
97	KLK3-SERPINA3	EGFR	AHSG	0,832
98	KLK3-SERPINA3	BDNF	IGFBP4	0,832
99	IGFBP4	SERPINA1	AKR7A2	0,832
100	SERPINA1	BMPER	AKR7A2	0,832

Tabla 23: Paneles de 4 biomarcadores

Marcadores					ABC de VC media
1	BDNF	KIT	AKR7A2	CRP	0,860
2	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMPER	NME2	0,860
3	BDNF	KIT	C9	AKR7A2	0,859
4	KLK3-SERPINA3	BMP1	BMPER	NME2	0,859
5	KIT	BMP1	AKR7A2	CRP	0,859
6	KLK3-SERPINA3	BMP1	NME2	CRP	0,858
7	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	NME2	0,858
8	KLK3-SERPINA3	EGFR	AKR7A2	CRP	0,857
9	KLK3-SERPINA3	C9	BMPER	AKR7A2	0,857
10	KLK3-SERPINA3	KIT	C9	AKR7A2	0,857
11	KLK3-SERPINA3	BMP1	AKR7A2	CRP	0,857
12	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	AKR7A2	CRP	0,857
13	C9	BMPER	AKR7A2	CRP	0,857
14	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	C9	AKR7A2	0,857
15	GHR	BMPER	AKR7A2	CRP	0,857
16	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,857

ES 2 674 318 T3

17	BDNF	IGFBP2	AKR7A2	CRP	0,857
18	KIT	C9	AKR7A2	CRP	0,857
19	IGFBP2	BMPER	AKR7A2	CRP	0,857
20	KLK3-SERPINA3	EGFR	C9	AKR7A2	0,856
21	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,856
22	KLK3-SERPINA3	CNTN1	C9	AKR7A2	0,856
23	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	AKR7A2	CRP	0,856
24	KLK3-SERPINA3	C9	BMPER	NME2	0,856
25	KLK3-SERPINA3	KIT	BMP1	AKR7A2	0,856
26	KLK3-SERPINA3	BMPER	NME2	CRP	0,856
27	GHR	C9	BMPER	AKR7A2	0,856
28	CNTN1	C9	BMPER	NME2	0,856
29	GHR	BMPER	NME2	CRP	0,855
30	KLK3-SERPINA3	BDNF	KIT	AKR7A2	0,855
31	BDNF	C9	AKR7A2	CRP	0,855
32	KLK3-SERPINA3	C9	AKR7A2	CRP	0,855
33	KLK3-SERPINA3	BDNF	AKR7A2	CRP	0,855
34	IGFBP2	BMPER	NME2	CRP	0,855
35	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,855
36	KLK3-SERPINA3	BMPER	AKR7A2	CRP	0,855
37	BMP1	BMPER	AKR7A2	CRP	0,855
38	KLK3-SERPINA3	EGFR	BMPER	NME2	0,855
39	CNTN1	C9	BMP1	AKR7A2	0,855
40	KLK3-SERPINA3	KIT	AKR7A2	CRP	0,854
41	KLK3-SERPINA3	GHR	BMPER	NME2	0,854
42	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMPER	NME2	0,854
43	IGFBP2	C9	AKR7A2	CRP	0,854
44	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	0,854
45	KLK3-SERPINA3	BDNF	C9	AKR7A2	0,854
46	GHR	C9	BMPER	NME2	0,854
47	KLK3-SERPINA3	BMPER	NME2	ITIH4	0,854
48	KIT	IGFBP2	AKR7A2	CRP	0,854
49	KLK3-SERPINA3	EGFR	NME2	CRP	0,854
50	KIT	C9	BMPER	AKR7A2	0,854
51	KIT	EGFR	C9	AKR7A2	0,854
52	BMP1	BMPER	NME2	CRP	0,854
53	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	BMPER	AKR7A2	0,853
54	EGFR	C9	AHSG	AKR7A2	0,853
55	KLK3-SERPINA3	EGFR	NME2	ITIH4	0,853

ES 2 674 318 T3

56	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	CRP	0,853
57	C9	BMPER	NME2	ITIH4	0,853
58	IGFBP2	BMP1	AKR7A2	CRP	0,853
59	KLK3-SERPINA3	CNTN1	AKR7A2	CRP	0,853
60	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	C9	NME2	0,853
61	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	BMPER	NME2	0,853
62	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	SERPINA1	AKR7A2	0,853
63	BDNF	CNTN1	C9	AKR7A2	0,853
64	CNTN1	BMP1	AKR7A2	CRP	0,853
65	KLK3-SERPINA3	BDNF	CNTN1	AKR7A2	0,853
66	BDNF	KIT	C9	NME2	0,853
67	KLK3-SERPINA3	CNTN1	C9	NME2	0,853
68	KLK3-SERPINA3	EGFR	BMPER	AKR7A2	0,853
69	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	AKR7A2	ITIH4	0,853
70	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	NME2	CRP	0,853
71	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMP1	AKR7A2	0,852
72	EGFR	C9	AKR7A2	ITIH4	0,852
73	EGFR	C9	AKR7A2	CRP	0,852
74	KLK3-SERPINA3	KIT	BMP1	NME2	0,852
75	KLK3-SERPINA3	KIT	EGFR	AKR7A2	0,852
76	KLK3-SERPINA3	EGFR	AKR7A2	ITIH4	0,852
77	KLK3-SERPINA3	BDNF	NME2	CRP	0,852
78	IGFBP4	C9	AKR7A2	ITIH4	0,852
79	KLK3-SERPINA3	GHR	BMPER	AKR7A2	0,852
80	KLK3-SERPINA3	BMP1	BMPER	AKR7A2	0,852
81	IGFBP2	C9	BMPER	AKR7A2	0,852
82	BDNF	KIT	NME2	CRP	0,852
83	KLK3-SERPINA3	KIT	C9	NME2	0,852
84	IGFBP2	AKR7A2	CRP	ITIH4	0,852
85	C9	BMPER	AKR7A2	ITIH4	0,852
86	KLK3-SERPINA3	EGFR	BMP1	AKR7A2	0,852
87	KLK3-SERPINA3	C9	CA6	AKR7A2	0,852
88	KLK3-SERPINA3	NME2	CRP	ITIH4	0,852
89	EGFR	CNTN1	C9	AKR7A2	0,852
90	KLK3-SERPINA3	C9	STX1A	AKR7A2	0,852
91	C9	BMPER	NME2	CRP	0,852
92	KIT	CNTN1	C9	AKR7A2	0,852
93	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMPER	AKR7A2	0,851
94	KIT	C9	BMP1	AKR7A2	0,851

95	KLK3-SERPINA3	KIT	BMPER	NME2	0,851
96	KLK3-SERPINA3	CNTN1	NME2	CRP	0,851
97	KLK3-SERPINA3	BDNF	KIT	NME2	0,851
98	BDNF	C9	AHSG	AKR7A2	0,851
99	KLK3-SERPINA3	BDNF	EGFR	AKR7A2	0,851
100	KIT	C9	BMPER	NME2	0,851

**Tabla 24: Paneles de 5 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC media
1	KLK3-SERPINA3	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,866
2	BDNF	KIT	C9	AKR7A2	CRP	0,866
3	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	BMPER	NME2	0,865
4	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	CRP	0,865
5	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,865
6	BDNF	KIT	IGFBP2	AKR7A2	CRP	0,865
7	KLK3-SERPINA3	BDNF	KIT	AKR7A2	CRP	0,865
8	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	CNTN1	BMPER	NME2	0,865
9	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	NME2	CRP	0,865
10	KLK3-SERPINA3	KIT	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,864
11	KLK3-SERPINA3	KIT	C9	BMPER	AKR7A2	0,864
12	KLK3-SERPINA3	KIT	BMP1	AKR7A2	CRP	0,864
13	BDNF	KIT	BMP1	AKR7A2	CRP	0,864
14	KLK3-SERPINA3	KIT	CNTN1	BMP1	NME2	0,864
15	KLK3-SERPINA3	KIT	C9	BMPER	NME2	0,864
16	GHR	C9	BMPER	AKR7A2	CRP	0,864
17	KLK3-SERPINA3	EGFR	NME2	CRP	ITIH4	0,864
18	KLK3-SERPINA3	KIT	BMP1	BMPER	NME2	0,864
19	KLK3-SERPINA3	KIT	CNTN1	C9	AKR7A2	0,864
20	KLK3-SERPINA3	BDNF	KIT	C9	AKR7A2	0,864
21	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	C9	BMPER	AKR7A2	0,863
22	KIT	GHR	C9	BMPER	AKR7A2	0,863
23	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMPER	AKR7A2	CRP	0,863
24	KLK3-SERPINA3	BDNF	KIT	CNTN1	AKR7A2	0,863
25	KLK3-SERPINA3	KIT	IGFBP4	C9	AKR7A2	0,863
26	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	AKR7A2	CRP	0,863
27	KLK3-SERPINA3	C9	BMPER	AKR7A2	ITIH4	0,863
28	KIT	BMP1	BMPER	AKR7A2	CRP	0,863
29	KIT	CNTN1	C9	BMP1	AKR7A2	0,863
30	KLK3-SERPINA3	KIT	CNTN1	BMPER	NME2	0,863

ES 2 674 318 T3

31	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	BMPER	AKR7A2	CRP	0,863
32	KLK3-SERPINA3	CNTN1	C9	BMPER	NME2	0,863
33	KIT	C9	BMPER	AKR7A2	CRP	0,863
34	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMP1	BMPER	AKR7A2	0,863
35	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	CNTN1	C9	AKR7A2	0,862
36	KIT	GHR	BMPER	AKR7A2	CRP	0,862
37	GHR	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,862
38	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMPER	NME2	CRP	0,862
39	KLK3-SERPINA3	GHR	BMPER	AKR7A2	CRP	0,862
40	BDNF	KIT	CNTN1	C9	AKR7A2	0,862
41	KLK3-SERPINA3	C9	BMPER	AKR7A2	CRP	0,862
42	KLK3-SERPINA3	GHR	C9	BMPER	AKR7A2	0,862
43	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	C9	AKR7A2	ITIH4	0,862
44	KLK3-SERPINA3	CNTN1	C9	BMP1	AKR7A2	0,862
45	KLK3-SERPINA3	KIT	CNTN1	C9	NME2	0,862
46	IGFBP2	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,862
47	IGFBP2	CNTN1	BMPER	AKR7A2	CRP	0,862
48	KLK3-SERPINA3	KIT	IGFBP2	AKR7A2	CRP	0,862
49	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMP1	NME2	CRP	0,862
50	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMP1	AKR7A2	CRP	0,862
51	KIT	GHR	BMP1	AKR7A2	CRP	0,862
52	KIT	IGFBP2	C9	AKR7A2	CRP	0,862
53	KLK3-SERPINA3	BDNF	CNTN1	C9	AKR7A2	0,862
54	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	BMPER	NME2	CRP	0,862
55	KLK3-SERPINA3	EGFR	AKR7A2	CRP	ITIH4	0,862
56	KLK3-SERPINA3	EGFR	CNTN1	C9	AKR7A2	0,862
57	KLK3-SERPINA3	KIT	BMP1	NME2	CRP	0,861
58	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMPER	AKR7A2	CRP	0,861
59	KLK3-SERPINA3	KIT	C9	AKR7A2	CRP	0,861
60	KLK3-SERPINA3	KIT	EGFR	AKR7A2	CRP	0,861
61	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	C9	BMPER	NME2	0,861
62	KLK3-SERPINA3	KIT	C9	BMP1	AKR7A2	0,861
63	KIT	GHR	C9	AKR7A2	CRP	0,861
64	KLK3-SERPINA3	C9	DDC	BMPER	AKR7A2	0,861
65	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	CNTN1	NME2	CRP	0,861
66	KIT	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,861
67	KLK3-SERPINA3	KIT	EGFR	C9	AKR7A2	0,861
68	KLK3-SERPINA3	CNTN1	BMPER	AKR7A2	ITIH4	0,861
69	KLK3-SERPINA3	EGFR	C9	BMPER	AKR7A2	0,861

ES 2 674 318 T3

70	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	CRP	0,861
71	KIT	GHR	BMPER	NME2	CRP	0,861
72	IGFBP2	C9	BMPER	AKR7A2	CRP	0,861
73	KLK3-SERPINA3	GHR	BMPER	NME2	CRP	0,861
74	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	CNTN1	C9	AKR7A2	0,861
75	BDNF	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	CRP	0,861
76	IGFBP2	CNTN1	BMP1	AKR7A2	CRP	0,861
77	BDNF	KIT	C9	BMPER	AKR7A2	0,861
78	KLK3-SERPINA3	BDNF	C9	AKR7A2	CRP	0,861
79	KIT	IGFBP2	BMP1	AKR7A2	CRP	0,861
80	KLK3-SERPINA3	BMP1	BMPER	NME2	CRP	0,861
81	KLK3-SERPINA3	BDNF	IGFBP2	AKR7A2	CRP	0,861
82	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	BMP1	AKR7A2	CRP	0,861
83	BDNF	KIT	GHR	AKR7A2	CRP	0,861
84	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMPER	NME2	ITIH4	0,861
85	KLK3-SERPINA3	KIT	BMPER	NME2	CRP	0,861
86	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	AKR7A2	CRP	ITIH4	0,861
87	KLK3-SERPINA3	KIT	BMPER	AKR7A2	CRP	0,861
88	BDNF	KIT	C9	AHSG	AKR7A2	0,860
89	IGFBP2	BMPER	NME2	CRP	ITIH4	0,860
90	KIT	IGFBP2	BMPER	AKR7A2	CRP	0,860
91	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	BMPER	NME2	CRP	0,860
92	KLK3-SERPINA3	KIT	IGFBP4	AKR7A2	CRP	0,860
93	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	EGFR	AKR7A2	CRP	0,860
94	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	CNTN1	C9	NME2	0,860
95	KLK3-SERPINA3	GHR	CNTN1	BMPER	NME2	0,860
96	KLK3-SERPINA3	IGFBP4	C9	AKR7A2	CRP	0,860
97	KLK3-SERPINA3	KIT	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,860
98	KIT	C9	BMP1	AKR7A2	CRP	0,860
99	KLK3-SERPINA3	IGFBP2	C9	BMPER	AKR7A2	0,860
100	KLK3-SERPINA3	EGFR	C9	AKR7A2	CRP	0,860

Tabla 25: Paneles de 6 biomarcadores

Marcadores						ABC de VC media
1	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	CNTN1	C9	BMPER	0,871
2	KIT CRP	GHR	C9	BMPER	AKR7A2	0,871
3	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF	KIT	CNTN1	C9	0,871

ES 2 674 318 T3

4	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	CNTN1	C9	BMP1	0,871
5	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,871
6	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	C9	BMPER	0,871
7	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT	CNTN1	C9	BMPER	0,870
8	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	GHR	C9	BMPER	0,870
9	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	C9	BMPER	0,870
10	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP2	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,870
11	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	IGFBP4	C9	BMPER	0,870
12	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT	CNTN1	BMP1	BMPER	0,870
13	BDNF CRP	KIT	IGFBP2	C9	AKR7A2	0,869
14	BDNF CRP	KIT	GHR	C9	AKR7A2	0,869
15	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,869
16	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	CNTN1	BMP1	NME2	0,869
17	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	CNTN1	BMP1	BMPER	0,869
18	BDNF CRP	KIT	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	0,869
19	KIT CRP	GHR	BMP1	BMPER	AKR7A2	0,869
20	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2	CNTN1	BMPER	NME2	0,869
21	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	CNTN1	C9	BMP1	BMPER	0,868
22	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	C9	BMPER	AKR7A2	0,868
23	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	IGFBP2	CNTN1	BMPER	0,868
24	GHR CRP	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,868
25	KIT AKR7A2	GHR	CNTN1	C9	BMPER	0,868

ES 2 674 318 T3

26	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	GHR	CNTN1	C9	BMPER	0,868
27	KLK3-SERPINA3 ITIH4	KIT	IGFBP4	C9	AKR7A2	0,868
28	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,868
29	BDNF AKR7A2	KIT	IGFBP2	CNTN1	C9	0,867
30	KIT AKR7A2	CNTN1	C9	BMP1	BMPER	0,867
31	KLK3-SERPINA3 CRP	BDNF	KIT	IGFBP2	AKR7A2	0,867
32	KLK3-SERPINA3 ITIH4	CNTN1	BMP1	BMPER	AKR7A2	0,867
33	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	GHR	BMPER	NME2	0,867
34	KLK3-SERPINA3 CRP	BDNF	KIT	C9	AKR7A2	0,867
35	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT	CNTN1	C9	BMP1	0,867
36	KLK3-SERPINA3 CRP	BDNF	KIT	CNTN1	AKR7A2	0,867
37	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	C9	AKR7A2	0,867
38	KLK3-SERPINA3 ITIH4	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,867
39	KLK3-SERPINA3 NME2	BDNF	KIT	CNTN1	C9	0,867
40	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,867
41	KLK3-SERPINA3 CRP	BDNF	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	0,867
42	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	0,867
43	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMPER	NME2	0,867
44	KLK3-SERPINA3 CRP	GHR	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,867
45	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	EGFR	CNTN1	C9	BMPER	0,867
46	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	IGFBP2	BMPER	AKR7A2	0,867
47	KIT CRP	IGFBP2	C9	BMPER	AKR7A2	0,867

ES 2 674 318 T3

48	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	EGFR	C9	BMPER	0,867
49	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT	IGFBP2	CNTN1	BMPER	0,867
50	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	C9	BMP1	BMPER	0,867
51	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	GHR	BMPER	AKR7A2	0,867
52	KLK3-SERPINA3 CRP	CNTN1	BMP1	BMPER	AKR7A2	0,867
53	BDNF CRP	KIT	C9	BMPER	AKR7A2	0,867
54	KIT CRP	GHR	BMP1	BMPER	NME2	0,867
55	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP2	BMPER	AKR7A2	CRP	0,867
56	KIT AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	C9	BMPER	0,867
57	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,867
58	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	IGFBP4	CNTN1	C9	0,867
59	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP2	CNTN1	BMPER	NME2	0,867
60	IGFBP2 CRP	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,866
61	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	EGFR	CNTN1	C9	0,866
62	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	IGFBP2	BMP1	AKR7A2	0,866
63	BDNF CRP	KIT	CNTN1	C9	AKR7A2	0,866
64	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	C9	BMPER	AKR7A2	0,866
65	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMP1	NME2	0,866
66	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	BMP1	AKR7A2	CRP	0,866
67	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	IGFBP4	BMP1	AKR7A2	0,866
68	KLK3-SERPINA3 CRP	GHR	C9	BMPER	AKR7A2	0,866
69	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	BMP1	BMPER	AKR7A2	0,866

## ES 2 674 318 T3

70	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	BMP1	BMPER	0,866
71	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	DDC	BMPER	0,866
72	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	IGFBP2	CNTN1	C9	0,866
73	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	C9	DDC	BMPER	0,866
74	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,866
75	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP4	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,866
76	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	IGFBP4	CNTN1	BMP1	0,866
77	KLK3-SERPINA3 CRP	BDNF	KIT	CNTN1	NME2	0,866
78	KLK3-SERPINA3 ITIH4	CNTN1	BMP1	AKR7A2	CRP	0,866
79	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,866
80	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2	CNTN1	BMP1	NME2	0,866
81	KLK3-SERPINA3 CRP	CNTN1	C9	BMPER	AKR7A2	0,866
82	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF	KIT	CNTN1	BMP1	0,866
83	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP4	CNTN1	BMP1	NME2	0,866
84	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	BMPER	AKR7A2	CRP	0,866
85	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2	EGFR	CNTN1	AKR7A2	0,866
86	BDNF CRP	KIT	C9	AHSG	AKR7A2	0,866
87	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT	IGFBP2	CNTN1	BMP1	0,866
88	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	BMP1	BMPER	NME2	0,866
89	KLK3-SERPINA3 CRP	BDNF	CNTN1	C9	AKR7A2	0,866
90	KLK3-SERPINA3 ITIH4	KIT	CNTN1	BMPER	NME2	0,866
91	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP4	BMPER	NME2	CRP	0,866

92	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,866
93	KLK3-SERPINA3 NME2	IGFBP4	CNTN1	C9	BMPER	0,866
94	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	C9	BMP1	0,866
95	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT	CNTN1	BMPER	NME2	0,866
96	KLK3-SERPINA3 ITIH4	IGFBP2	CNTN1	AKR7A2	CRP	0,866
97	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF	KIT	C9	BMPER	0,866
98	KLK3-SERPINA3 CRP	GHR	IGFBP4	BMPER	AKR7A2	0,866
99	BDNF CRP	KIT	IGFBP2	AHSG	AKR7A2	0,866
100	KLK3-SERPINA3 ITIH4	KIT	C9	BMPER	AKR7A2	0,866

**Tabla 26: Paneles de 7 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC media
1	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR	CNTN1	C9	0,875
2	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	C9	0,875
3	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	CNTN1	C9	BMP1	0,875
4	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	BMPER	0,874
5	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	CNTN1	BMP1	BMPER	0,873
6	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	C9	BMPER	0,873
7	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF CRP	KIT	IGFBP2	CNTN1	0,873
8	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	C9	BMPER	0,873
9	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	C9	0,873
10	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	IGFBP4	C9	BMPER	0,873
11	KLK3-SERPINA3 BMPER	BDNF AKR7A2	KIT	CNTN1	C9	0,872
12	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	BMP1	0,872

ES 2 674 318 T3

13	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	CNTN1	BMPER	0,872
14	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	BMPER	0,872
15	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	BMP1	BMPER	0,872
16	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	BMPER	AKR7A2	0,872
17	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	C9	BMPER	0,872
18	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR	IGFBP4	C9	0,872
19	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	CNTN1	BMP1	BMPER	0,872
20	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT NME2	GHR	CNTN1	C9	0,872
21	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF CRP	KIT	CNTN1	C9	0,872
22	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMP1	0,872
23	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	IGFBP2	CNTN1	BMPER	0,872
24	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMPER	0,872
25	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,872
26	KIT AKR7A2	GHR CRP	C9	BMP1	BMPER	0,872
27	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	C9	BMP1	0,872
28	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 CRP	GHR	CNTN1	BMPER	0,872
29	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	C9	BMP1	0,872
30	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	CNTN1	C9	AHSG	0,872
31	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	DDC	BMPER	0,872
32	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	IGFBP4	BMPER	0,872
33	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR	CNTN1	BMP1	0,872
34	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	BMP1	0,872

35	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	BMP1	BMPER	0,871
36	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	C9	0,871
37	BDNF AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	C9	0,871
38	BDNF AKR7A2	KIT CRP	GHR	C9	BMPER	0,871
39	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	C9	BMPER	0,871
40	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	BMPER	0,871
41	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	C9	0,871
42	KIT AKR7A2	GHR CRP	C9	AHSG	BMPER	0,871
43	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	C9	BMPER	0,871
44	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	CNTN1	BMP1	0,871
45	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMP1	0,871
46	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 CRP	IGFBP4	CNTN1	BMPER	0,871
47	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	C9	BMPER	0,871
48	KLK3-SERPINA3 CRP	GHR ITIH4	IGFBP4	BMPER	AKR7A2	0,871
49	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	GHR	CNTN1	BMPER	0,871
50	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	BMP1	AKR7A2	0,871
51	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2 ITIH4	IGFBP4	BMPER	AKR7A2	0,871
52	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMPER	0,871
53	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	CNTN1	C9	BMPER	0,871
54	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	BMP1	BMPER	0,871
55	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	BMP1	0,871
56	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	IGFBP4	CNTN1	C9	0,871

## ES 2 674 318 T3

57	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	EGFR	CNTN1	C9	0,870
58	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4	C9	BMP1	0,870
59	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	BMP1	BMPER	0,870
60	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	GHR ITIH4	IGFBP4	CNTN1	BMPER	0,870
61	KLK3-SERPINA3 BMP1	BDNF AKR7A2	KIT	CNTN1	C9	0,870
62	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	BMP1	BMPER	0,870
63	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF CRP	KIT	CNTN1	BMP1	0,870
64	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	C9	BMPER	0,870
65	KLK3-SERPINA3 NME2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	BMPER	0,870
66	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	C9	BMPER	0,870
67	KLK3-SERPINA3 C9	BDNF AKR7A2	KIT	IGFBP2	CNTN1	0,870
68	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT ITIH4	IGFBP4	BMP1	AKR7A2	0,870
69	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	C9	BMP1	0,870
70	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT AKR7A2	CNTN1	C9	BMP1	0,870
71	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	CNTN1	C9	BMPER	0,870
72	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	IGFBP4	C9	0,870
73	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	IGFBP4	BMP1	0,870
74	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF CRP	KIT	C9	BMPER	0,870
75	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT CRP	CNTN1	BMP1	BMPER	0,870
76	KLK3-SERPINA3 CRP	IGFBP2 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	AKR7A2	0,870
77	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	BMP1	BMPER	0,870
78	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT NME2	CNTN1	C9	BMP1	0,870

ES 2 674 318 T3

79	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	GHR	BMPER	0,870
80	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	EGFR	CNTN1	BMP1	0,870
81	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP4	CNTN1	BMP1	0,870
82	KIT AKR7A2	EGFR CRP	GHR	C9	BMPER	0,870
83	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR	C9	AHSG	0,870
84	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF CRP	IGFBP2	CNTN1	C9	0,870
85	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	GHR	C9	BMPER	0,870
86	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT ITIH4	IGFBP4	BMPER	AKR7A2	0,870
87	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR	C9	BMP1	0,870
88	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	CNTN1	C9	BMP1	0,870
89	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	EGFR	CNTN1	C9	0,870
90	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT ITIH4	EGFR	C9	BMPER	0,870
91	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	DDC	0,870
92	BDNF AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	C9	BMPER	0,870
93	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	C9	0,870
94	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	CNTN1	C9	CA6	0,870
95	KLK3-SERPINA3 CRP	KIT ITIH4	GHR	IGFBP4	AKR7A2	0,870
96	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR	CNTN1	C9	0,870
97	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1	C9	DDC	0,870
98	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	CNTN1	C9	DDC	0,870
99	KLK3-SERPINA3 NME2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	C9	BMPER	0,870
100	KIT AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	BMP1	BMPER	0,870

**Tabla 27: Paneles de 8 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC media
1	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	C9	0,877
2	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,876
3	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR ITIH4	IGFBP4	BMPER	0,876
4	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	0,876
5	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	C9	0,876
6	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	BMP1	0,876
7	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMPER	0,876
8	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	BMP1	0,876
9	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	GHR	CNTN1	0,876
10	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	BMP1	0,876
11	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	C9	0,875
12	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	C9	0,875
13	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	C9	0,875
14	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1	C9	0,875
15	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	C9	0,875
16	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR ITIH4	CNTN1	BMP1	0,875
17	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,875
18	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR ITIH4	IGFBP4	C9	0,875
19	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4	CNTN1	0,875
20	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	BMP1	0,874
21	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR	CNTN1	0,874

ES 2 674 318 T3

22	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4	C9	0,874
23	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1	C9	0,874
24	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	C9	0,874
25	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP4 ITIH4	BMP1	BMPER	0,874
26	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,874
27	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT NME2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,874
28	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT NME2	GHR CRP	CNTN1	BMP1	0,874
29	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	BMPER	0,874
30	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	C9	0,874
31	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR ITIH4	CNTN1	BMPER	0,874
32	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4	CNTN1	0,874
33	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,874
34	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	C9	0,874
35	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR ITIH4	IGFBP4	CNTN1	0,874
36	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	C9	0,874
37	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	C9	BMP1	0,874
38	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR ITIH4	CNTN1	C9	0,874
39	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	C9	0,874
40	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4	BMP1	0,874
41	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	C9	BMPER	0,873
42	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	C9	0,873
43	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	C9	0,873

ES 2 674 318 T3

44	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	BMP1	0,873
45	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR ITIH4	BMP1	BMPER	0,873
46	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	C9	AHSG	0,873
47	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	C9	0,873
48	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	BMP1	0,873
49	BDNF BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	C9	0,873
50	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	C9	DDC	0,873
51	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR ITIH4	IGFBP4	BMP1	0,873
52	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	DDC	0,873
53	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	CNTN1 ITIH4	BMP1	DDC	0,873
54	KLK3-SERPINA3 BMPER	BDNF AKR7A2	KIT CRP	CNTN1	C9	0,873
55	KLK3-SERPINA3 BMPER	BDNF AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	0,873
56	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	FN1	0,873
57	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2 ITIH4	IGFBP4	BMPER	0,873
58	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMPER	0,873
59	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	AHSG	0,873
60	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,873
61	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	C9	AHSG	0,873
62	KLK3-SERPINA3 BMP1	BDNF AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	0,873
63	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1	C9	0,873
64	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	BMPER	0,873
65	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	C9	0,873

ES 2 674 318 T3

66	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	BMP1	BMPER	0,873
67	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	BDNF CRP	KIT ITIH4	IGFBP2	CNTN1	0,873
68	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4	CNTN1	0,873
69	KLK3-SERPINA3 C9	BDNF AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2	CNTN1	0,873
70	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 ITIH4	IGFBP4	CNTN1	0,873
71	KLK3-SERPINA3 AHSB	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	C9	0,873
72	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	C9	BMP1	0,873
73	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP2 CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,873
74	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT NME2	GHR CRP	IGFBP4	CNTN1	0,873
75	KLK3-SERPINA3 NME2	KIT CRP	GHR ITIH4	IGFBP4	BMPER	0,873
76	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	BMP1	0,873
77	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	BMPER	0,873
78	BDNF BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	C9	0,873
79	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	CA6	0,873
80	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	BMP1	0,873
81	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	EGFR ITIH4	CNTN1	BMP1	0,873
82	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	C9	0,872
83	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	IGFBP2 ITIH4	CNTN1	BMP1	0,872
84	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	BMP1	0,872
85	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR ITIH4	IGFBP4	CNTN1	0,872
86	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	BMP1	0,872
87	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	BMPER	0,872

88	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	EGFR	CNTN1	0,872
89	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	AHSG	0,872
90	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	GHR	C9	0,872
91	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT CRP	GHR ITIH4	IGFBP4	C9	0,872
92	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4	C9	0,872
93	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4	C9	0,872
94	KLK3-SERPINA3 C9	BDNF BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2	CNTN1	0,872
95	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	AHSG	0,872
96	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	AHSG	0,872
97	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	BMP1	0,872
98	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR ITIH4	CNTN1	CA6	0,872
99	KLK3-SERPINA3 FN1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	C9	0,872
100	KIT AHSG	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	BMP1	0,872

**Tabla 28: Paneles de 9 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC media
1	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	BMP1	0,878
2	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,878
3	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,878
4	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,878
5	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,877
6	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	0,877
7	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	0,877
8	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	0,877

ES 2 674 318 T3

9	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	0,877
10	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	C9	0,877
11	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,877
12	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,877
13	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	0,877
14	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	0,876
15	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,876
16	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	0,876
17	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	0,876
18	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	0,876
19	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,876
20	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,876
21	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	GHR ITIH4	CNTN1	0,876
22	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,876
23	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,876
24	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,876
25	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,876
26	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	IGFBP4 BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	0,876
27	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	0,876
28	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,876
29	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	0,875
30	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1	0,875

ES 2 674 318 T3

31	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,875
32	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,875
33	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,875
34	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR NME2	IGFBP4 CRP	CNTN1	0,875
35	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CA6	0,875
36	KLK3-SERPINA3 C9	KIT CA6	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	0,875
37	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	GHR ITIH4	IGFBP4	0,875
38	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	C9	0,875
39	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	0,875
40	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,875
41	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT NME2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,875
42	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,875
43	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,875
44	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	0,875
45	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	C9	0,875
46	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	AHSG	0,874
47	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,874
48	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,874
49	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	IGFBP4 ITIH4	C9	0,874
50	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	EGFR BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	0,874
51	KLK3-SERPINA3 CNTN1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4	0,874
52	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	C9	0,874

ES 2 674 318 T3

53	KLK3-SERPINA3 C9	KIT SERPINA1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	0,874
54	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	AHSG	0,874
55	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	0,874
56	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1	0,874
57	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,874
58	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,874
59	KLK3-SERPINA3 FN1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1	0,874
60	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	C9	0,874
61	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	0,874
62	KLK3-SERPINA3 CNTN1	KIT C9	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4	0,874
63	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	C9	0,874
64	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1	0,874
65	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,874
66	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT FN1	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	0,874
67	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	FN1	0,874
68	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	BMP1	0,874
69	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	CA6	0,874
70	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT NME2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,874
71	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	IGFBP4 ITIH4	BMP1	0,874
72	KLK3-SERPINA3 C9	BDNF BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	0,874
73	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9	0,874
74	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	C9	0,874

ES 2 674 318 T3

75	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	C9	0,874
76	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	0,874
77	KIT BMP1	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,874
78	KLK3-SERPINA3 C9	BDNF BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1	0,874
79	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	EGFR AKR7A2	CNTN1	0,874
80	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT NME2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	CNTN1	0,874
81	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	EGFR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	0,874
82	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	CA6	0,874
83	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT NME2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	BMP1	0,874
84	KLK3-SERPINA3 AKR7A2	KIT NME2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,874
85	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	C9	0,874
86	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,874
87	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	C9	0,874
88	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT DDC	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9	0,874
89	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	C9 CRP	BMP1	0,874
90	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1	0,874
91	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1	0,874
92	KIT AHSG	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9 CRP	BMP1	0,874
93	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1	0,874
94	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT AKR7A2	IGFBP2 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,874
95	KLK3-SERPINA3 BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	DDC	0,874
96	KLK3-SERPINA3 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	AHSG	0,874

ES 2 674 318 T3

97	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1	0,874
98	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT SERPINA1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1	0,874
99	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	BMP1	0,874
100	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	C9	0,874

**Tabla 29: Paneles de 10 biomarcadores**

Marcadores						ABC de VC media
1	KLK3-SERPINA3 CNTN1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	0,880
2	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,880
3	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,878
4	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,878
5	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 NME2	CNTN1 CRP	C9 ITIH4	0,878
6	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,878
7	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,878
8	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,877
9	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,877
10	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR NME2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,877
11	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	0,877
12	KLK3-SERPINA3 C9	KIT CA6	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,877
13	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,877
14	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT CA6	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,877
15	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,877
16	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT CA6	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,877
17	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 NME2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,877

ES 2 674 318 T3

18	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	IGFBP4 BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9 ITIH4	0,877
19	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR AHSG	IGFBP4 BMPER	CNTN1 AKR7A2	0,877
20	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,876
21	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,876
22	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9 CRP	0,876
23	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,876
24	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,876
25	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	0,876
26	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,876
27	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	0,876
28	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 NME2	C9 ITIH4	0,876
29	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	0,876
30	KLK3-SERPINA3 AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,876
31	KLK3-SERPINA3 CNTN1	KIT BMP1	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	0,876
32	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	0,876
33	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR NME2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,876
34	KLK3-SERPINA3 C9	KIT CA6	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,876
35	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT AHSG	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9 CRP	0,876
36	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,876
37	KLK3-SERPINA3 C9	KIT CA6	GHR AHSG	IGFBP4 BMPER	CNTN1 AKR7A2	0,876
38	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT FN1	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9 CRP	0,876
39	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT CA6	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875

ES 2 674 318 T3

40	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR AHSG	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875
41	KLK3-SERPINA3 C9	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
42	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875
43	KLK3-SERPINA3 C9	KIT DDC	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,875
44	KLK3-SERPINA3 CNTN1	KIT C9	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	0,875
45	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
46	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
47	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AKR7A2	IGFBP4 NME2	CNTN1 CRP	C9 ITIH4	0,875
48	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT DDC	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
49	KLK3-SERPINA3 AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	C9 ITIH4	0,875
50	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	0,875
51	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR NME2	CNTN1 CRP	C9 ITIH4	0,875
52	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
53	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
54	KLK3-SERPINA3 CNTN1	KIT C9	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 ITIH4	0,875
55	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR NME2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
56	KLK3-SERPINA3 C9	KIT CA6	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875
57	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
58	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 NME2	CNTN1 CRP	C9 ITIH4	0,875
59	KLK3-SERPINA3 FN1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,875
60	KLK3-SERPINA3 C9	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,875
61	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT FN1	GHR AHSG	CNTN1 BMPER	C9 AKR7A2	0,875

ES 2 674 318 T3

62	KLK3-SERPINA3 BMP1	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
63	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT DDC	GHR AHSG	CNTN1 BMPER	C9 AKR7A2	0,875
64	KLK3-SERPINA3 FN1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
65	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	GHR NME2	IGFBP4 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
66	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
67	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	EGFR AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
68	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,875
69	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 NME2	0,875
70	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 NME2	CNTN1 CRP	0,875
71	KLK3-SERPINA3 CA6	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
72	KLK3-SERPINA3 C9	KIT SERPINA1	GHR AHSG	IGFBP4 BMPER	CNTN1 AKR7A2	0,875
73	KLK3-SERPINA3 BMP1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	C9 ITIH4	0,875
74	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
75	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 NME2	CNTN1 ITIH4	0,875
76	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 NME2	C9 CRP	0,875
77	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
78	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
79	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 NME2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
80	KLK3-SERPINA3 CNTN1	KIT CA6	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	0,875
81	KLK3-SERPINA3 AHSG	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
82	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	GHR SERPINA1	IGFBP4 BMPER	CNTN1 AKR7A2	0,875
83	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT DDC	IGFBP4 BMPER	CNTN1 AKR7A2	C9 ITIH4	0,875

84	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	C9 CRP	0,875
85	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT FN1	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875
86	KLK3-SERPINA3 FN1	KIT AHSG	GHR BMPER	CNTN1 AKR7A2	BMP1 CRP	0,875
87	KLK3-SERPINA3 C9	KIT FN1	GHR BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875
88	KLK3-SERPINA3 C9	KIT BMP1	IGFBP2 BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 ITIH4	0,875
89	KLK3-SERPINA3 CA6	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,875
90	KLK3-SERPINA3 AHSG	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,875
91	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 NME2	CNTN1 CRP	C9 ITIH4	0,875
92	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,875
93	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT AHSG	IGFBP2 BMPER	IGFBP4 AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875
94	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT FN1	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,875
95	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP2 NME2	IGFBP4 CRP	C9 ITIH4	0,875
96	KLK3-SERPINA3 BMPER	KIT AKR7A2	IGFBP4 NME2	C9 CRP	BMP1 ITIH4	0,875
97	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	GHR AKR7A2	IGFBP4 CRP	CNTN1 ITIH4	0,875
98	KLK3-SERPINA3 C9	KIT FN1	IGFBP2 BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	0,875
99	KLK3-SERPINA3 BMP1	KIT BMPER	IGFBP2 AKR7A2	GHR CRP	IGFBP4 ITIH4	0,875
100	KLK3-SERPINA3 DDC	KIT BMPER	GHR AKR7A2	CNTN1 CRP	BMP1 ITIH4	0,874

**Tabla 30: Recuentos de marcadores en paneles de biomarcadores**

Biomarcador	Tamaño del panel							
	3	4	5	6	7	8	9	10
AHSG	118	104	104	117	135	211	284	376
AKR7A2	205	485	676	738	810	859	921	950
BDNF	143	212	185	171	162	125	113	78
BMP1	127	157	214	273	308	404	457	495
BMPER	168	205	346	471	572	673	750	820
C9	197	313	402	466	515	536	543	587

CA6	107	96	88	74	96	120	165	223
CKB-CKM	40	1	0	0	0	0	0	0
CNTN1	137	164	235	420	579	717	763	815
CRP	183	267	407	506	558	588	671	721
DDC	110	93	93	109	129	154	161	197
EGFR	135	162	190	196	193	170	177	179
FGA-FGB-FGG	34	0	0	0	0	0	0	0
FN1	90	46	13	11	18	44	70	103
GHR	107	98	126	181	261	398	513	611
IGFBP2	123	127	176	211	277	320	360	380
IGFBP4	97	112	152	198	265	356	461	570
ITIH4	143	148	214	272	379	455	542	636
KIT	147	201	290	481	626	760	836	881
KLK3-SERPINA3	213	448	592	721	809	851	916	947
NME2	177	337	365	307	245	198	215	310
SERPINA1	83	91	56	31	25	35	60	104
STX1A	116	133	76	46	38	26	22	17

**Tabla 31: Parámetros obtenidos de conjuntos de datos de cáncer establecidos para clasificadores bayesianos simples**

		Mesotelioma		CPNM		Carc. de células renales	
		Control	Cáncer	Control	Cáncer	Control	Cáncer
AKR7A2	Media	6,65	7,35	6,76	7,16	7,48	7,16
	DT	0,51	0,48	0,43	0,25	0,58	0,39
BMPER	Media	7,31	7,06	7,45	7,32	7,33	7,21
	DT	0,21	0,25	0,11	0,16	0,11	0,20
CNTN1	Media	9,15	8,89	9,26	9,15	9,14	8,90
	DT	0,21	0,36	0,18	0,11	0,19	0,26
CRP	Media	7,84	9,79	7,73	9,00	8,32	10,59
	DT	1,06	1,96	1,09	1,42	1,63	1,39
GHR	Media	7,60	7,45	7,72	7,59	7,80	7,67
	DT	0,13	0,17	0,14	0,10	0,14	0,17
IGFBP2	Media	8,45	8,98	8,51	9,01	8,51	8,92
	DT	0,47	0,61	0,42	0,45	0,45	0,45
IGFBP4	Media	7,89	8,05	8,14	8,27	8,15	8,36
	DT	0,15	0,24	0,14	0,16	0,20	0,22
ITIH4	Media	10,18	10,46	10,60	10,74	10,56	10,82
	DT	0,32	0,34	0,12	0,23	0,15	0,20
KIT	Media	9,39	9,18	9,60	9,50	9,39	9,25
	DT	0,16	0,20	0,14	0,14	0,16	0,19
KLK3-SERPINA3	Media	8,00	8,51	8,10	8,33	8,09	8,68
	DT	0,16	0,53	0,19	0,33	0,23	0,48

Tabla 32: Cálculos obtenidos del conjunto de entrenamiento para clasificador bayesiano simple.

Biomarcador	$\mu_c$	$\mu_d$	$\sigma_c$	$\sigma_d$	$\bar{x}$	$p(c \bar{x})$	$p(d \bar{x})$	$\ln(p(d \bar{x})/p(c \bar{x}))$
BMPER	7,450	7,323	0,108	0,164	7,045	0,003	0,576	5,176
KIT	9,603	9,503	0,139	0,141	9,534	2,546	2,767	0,083
AKR7A2	6,761	7,155	0,432	0,248	6,347	0,583	0,008	-4,309
IGFBP4	8,138	8,268	0,140	0,163	8,336	1,046	2,251	0,767
GHR	7,724	7,595	0,135	0,102	7,756	2,867	1,126	-0,935
ITIH4	10,596	10,738	0,121	0,227	10,600	3,301	1,460	-0,816
IGFBP2	8,514	9,006	0,417	0,448	8,812	0,741	0,811	0,091
KLK3-SERPINA3	8,102	8,327	0,194	0,330	7,909	1,253	0,542	-0,838
CNTN1	9,265	9,149	0,181	0,114	9,410	1,602	0,252	-1,848
CRP	7,733	9,005	1,095	1,422	7,675	0,364	0,181	-0,697

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para diagnosticar que un individuo tiene o no cáncer, comprendiendo el método:
  - 5 detectar, en una muestra de sangre completa, plasma o suero de un individuo, un valor de biomarcador que corresponde a CA6, en donde dicho individuo se clasifica como aquejado o no aquejado de cáncer basándose en dicho valor de biomarcador.
  - 10 2. El método de la reivindicación 1 en donde el método comprende además detectar valores de biomarcadores que corresponden a al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19 y en donde N = 2-23.
  - 15 3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde detectar los valores de biomarcadores comprende realizar un ensayo *in vitro*, en donde dicho ensayo *in vitro* comprende preferentemente al menos un reactivo de captura correspondiente a cada uno de dichos biomarcadores y que comprende además seleccionar dicho al menos un reactivo de captura del grupo que consiste en aptámeros y anticuerpos, preferentemente en donde dicho al menos un reactivo de captura es un aptámero.
  - 20 4. El método de la reivindicación 3, en donde el ensayo *in vitro* se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo o un ensayo basado en aptámeros.
  5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que cada valor de biomarcador se evalúa basándose en un valor predeterminado o un intervalo de valores predeterminado.
  - 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el individuo es un ser humano.
  7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en donde N = 2-15, N = 3-15, N = 3-10, N = 4-20, N = 4-15, N = 4-10, N = 5-20, N = 5-15 o N = 5-10.
  - 30 8. Un método implementado por ordenador para indicar una probabilidad de cáncer, comprendiendo el método:
    - recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador que corresponde a CA6, en donde dicho biomarcador se detectó en una muestra de sangre completa, plasma o suero;
    - 35 realizar con el ordenador una clasificación del valor de biomarcador;
    - e
    - indicar una probabilidad de que dicho individuo tenga cáncer basándose en la clasificación.
  - 40 9. El método implementado por ordenador según la reivindicación 8 en donde la información de biomarcadores comprende además valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 19, en donde N = 3-12.
  - 45 10. Un producto de programa informático para indicar una probabilidad de cáncer, comprendiendo el producto de programa informático:
    - un medio leíble por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o un sistema informáticos, comprendiendo el código de programa:
      - 50 código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden a CA6, en donde dicho biomarcador se detectó en la muestra de sangre completa, plasma o suero; y
      - código que ejecuta un método de clasificación que indica un estado de cáncer del individuo en función de dicho valor de biomarcador.
  - 55 11. El producto de programa informático de la reivindicación 10 en donde los datos comprenden además valores de biomarcadores que corresponden cada uno a al menos un biomarcador y en donde N = 3-12.
  - 60 12. El producto de programa informático de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde dicho método de clasificación usa una función de densidad de probabilidad o en donde dicho método de clasificación usa dos o más clases.
  - 65 13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho individuo se clasifica como aquejado o no aquejado de cáncer basándose en dichos valores de biomarcadores y al menos un elemento de información biomédica adicional correspondiente a dicho individuo.
  14. El método según la reivindicación 1 en donde el cáncer es cáncer de pulmón no microcítico (CPNM).

15. El método según la reivindicación 14 en donde el método comprende además detectar valores de biomarcadores que corresponden a al menos uno de al menos N biomarcadores seleccionados del grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1 y en donde N = 2-59.

5 16. El método según la reivindicación 13, en donde dicho al menos un elemento de información biomédica adicional se selecciona de forma independiente del grupo que consiste en:

- (a) información correspondiente a descriptores físicos de dicho individuo,
- (b) información correspondiente a los descriptores radiológicos de una anomalía pulmonar en dicho individuo,
- 10 (c) información correspondiente a la presencia o ausencia de un nódulo pulmonar en dicho individuo,
- (d) información correspondiente a los descriptores físicos de un nódulo pulmonar en dicho individuo,
- (e) información correspondiente a un cambio en la altura y/o el peso de dicho individuo,
- (f) información correspondiente a la etnia de dicho individuo,
- (g) información correspondiente al género de dicho individuo,
- 15 (h) información correspondiente al historial de tabaquismo de dicho individuo,
- (i) información correspondiente a exposición a tabaco ambiental en dicho individuo,
- (j) información correspondiente a historial de uso de alcohol en dicho individuo,
- (k) información correspondiente al historial ocupacional de dicho individuo,
- (l) información correspondiente al historial familiar de cáncer de pulmón u otro cáncer en dicho individuo,
- 20 (b) información correspondiente a la presencia o ausencia en dicho individuo de al menos un marcador genético correlacionado con un mayor riesgo de cáncer de pulmón o cáncer en dicho individuo o un miembro de la familia de dicho individuo,
- (n) información correspondiente a síntomas clínicos de dicho individuo,
- (o) información correspondiente a otros ensayos de laboratorio,
- 25 (p) información correspondiente a valores de expresión génica de dicho individuo y
- (q) información correspondiente a la exposición de dichos individuos a carcinógenos conocidos.

17. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o 13 a 16 que comprende detectar valores de biomarcadores para los biomarcadores:

- 30 a. CA6;
- b. CA6, YWHAG;
- c. MMP7, CA6 e YWHAG;
- d. C9, CA6 e YWHAG;
- 35 e. CA6, STX1A e YWHAG;
- f. KLK3-SERPINA3 y CA6;
- g. C9 y CA6;
- h. CA6 y CRP;
- i. CA6 y BMPER;
- 40 j. CA6 y AKR7A2;
- k. KLK3-SERPINA3, CA6 y AKR7A2;
- l. KLK3-SERPINA3, CA6 y NME2;
- m. KLK3-SERPINA3, BDNF y CA6;
- n. KLK3-SERPINA3, C9, CA6 y AKR7A2;
- 45 o. KLK3-SERPINA3, BMPER, KIT, AKR7A2, CNTN1, C9 y CA6;
- p. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, CNTN1 y C9;
- q. KLK3-SERPINA3, BMPER, KIT, AKR7A2, GHR, CRP, CNTN1 y CA6;
- r. KLK3-SERPINA3, BMPER, KIT, AKR7A2, GHR, ITIH4, CNTN1 y CA6;
- s. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4, ITIH4 y CNTN1;
- 50 t. KLK3-SERPINA3, BMPER, KIT, AKR7A2, GHR, CRP, IGFBP4, ITIH4 y CA6;
- u. KLK3-SERPINA3, C9, KIT, CA6, GHR, BMPER, IGFBP4, AKR7A2 y CNTN1;
- v. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, CNTN1, CRP y C9;
- w. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4, CRP y CNTN1;
- x. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, AKR7A2, GHR, CRP, IGFBP4, ITIH4 y CNTN1;
- 55 y. KLK3-SERPINA3, BMPER, KIT, AKR7A2, GHR, CRP, CNTN1, ITIH4 y CA6;
- z. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4, ITIH4 y C9;
- aa. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, CNTN1, ITIH4 y C9;
- bb. KLK3-SERPINA3, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4, CRP, GNTN1, ITIH4 y CA6;
- cc. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, CNTN1, CRP y BMP1;
- 60 dd. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, IGFBP2, AKR7A2, GHR, CRP y CNTN1;
- ee. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4, CRP, CNTN1 y ITIH4;
- ff. KLK3-SERPINA3, C9, KIT, CA6, GHR, BMPER, IGFBP4, AKR7A2, CNTN1 y ITIH4;
- gg. KLK3-SERPINA3, BMP1, KIT, CA6, GHR, BMPER, IGFBP4, AKR7A2, CNTN1 y ITIH4;
- hh. KLK3-SERPINA3, BMP1, KIT, CA6, GHR, AKR7A2, IGFBP4, CRP, CNTN1 y ITIH4;
- 65 ii. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, IGFBP2, AKR7A2, GHR, CRP, CNTN1 y ITIH4;
- jj. KLK3-SERPINA3, C9, KIT, CA6, GHR, BMPER, IGRBP4, AKR7A2, CNTN1 y CRP;

kk. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, AHSG, GHR, BMPER, CNTN1, AKR7A2, C9 y CRP;  
ll. KLK3-SERPINA3, C9, KIT, CA6, GHR, AHSG, IGFBP4, BMPER, CNTN1 y AKR7A2;  
mm. KLK3-SERPINA3, BMP1, KIT, CA6, GHR, BMPER, IGFBP4, AKR7A2, CNTN1 y CRP;  
nn. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, IGFBP4, AKR7A2, CNTN1, CRP, BMP1 y ITIH4;  
5 oo. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4, CRP, BMP1 y ITIH4;  
pp. KLK3-SERPINA3, C9, KIT, CA6, IGFBP2, BMPER, GHR, AKR7A2, CNTN1 y CRP;  
qq. KLK3-SERPINA3, CA6, GHR, BMPER, IGFBP4, AKR7A2, CNTN1, CRP, BMP1 y ITIH4;  
rr. KLK3-SERPINA3, CNTN1, KIT, CA6, IGFBP2, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4 y CRP;  
10 ss. KLK3-SERPINA3, CA6, KIT, BMPER, GHR, AKR7A2, IGFBP4, CRP, C9 y ITIH4;

18. El método según la reivindicación 1 en donde el cáncer es cáncer de pulmón, mesotelioma pleural o carcinoma de células renales.

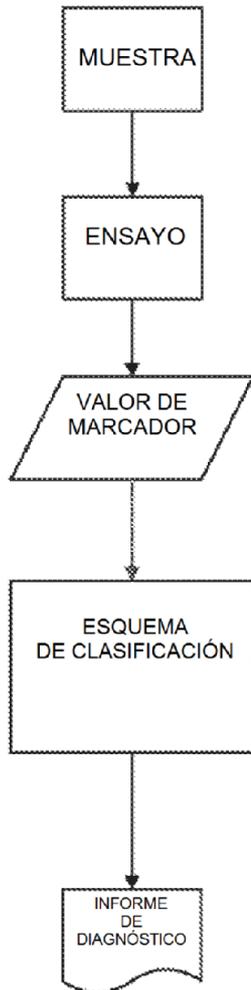


FIG. 1A

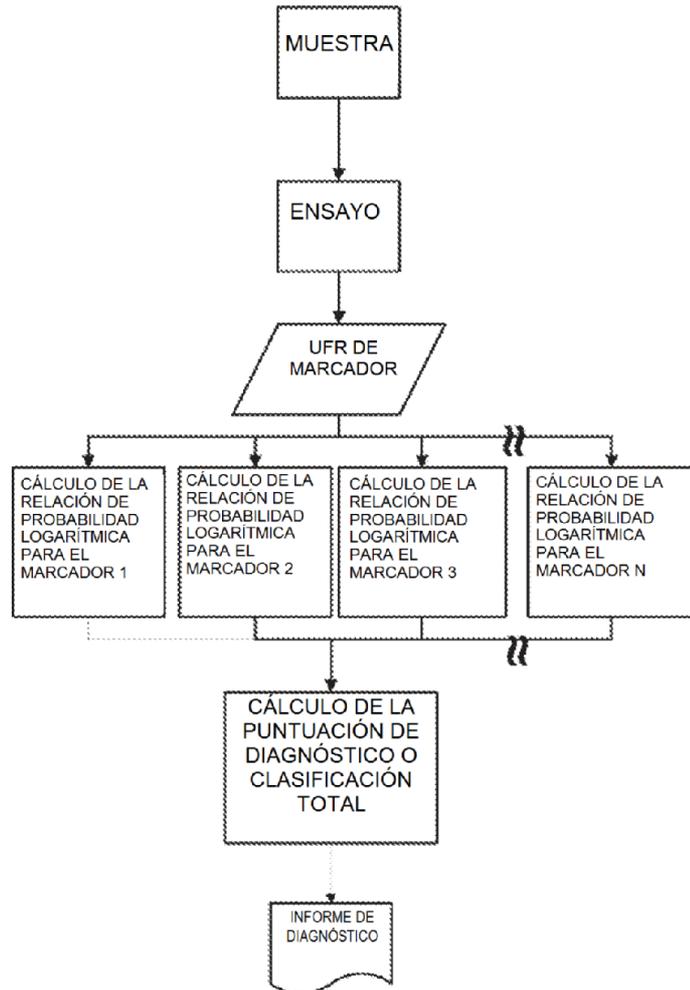


FIG. 1B

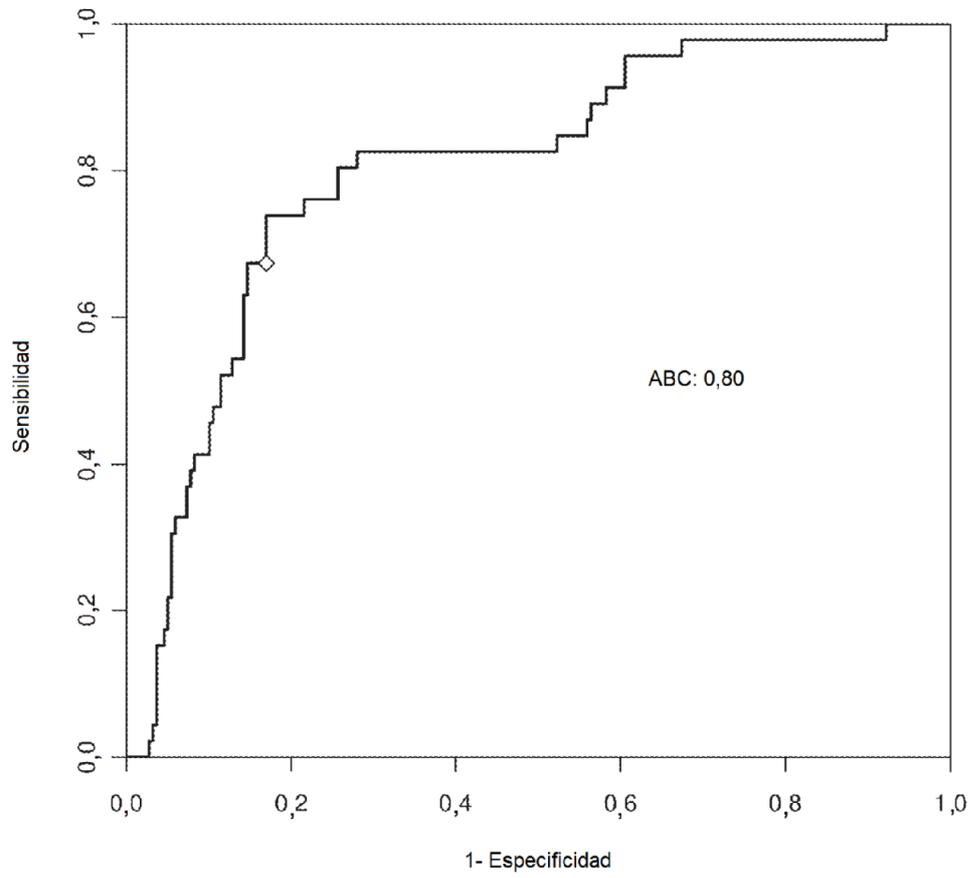


FIG. 2

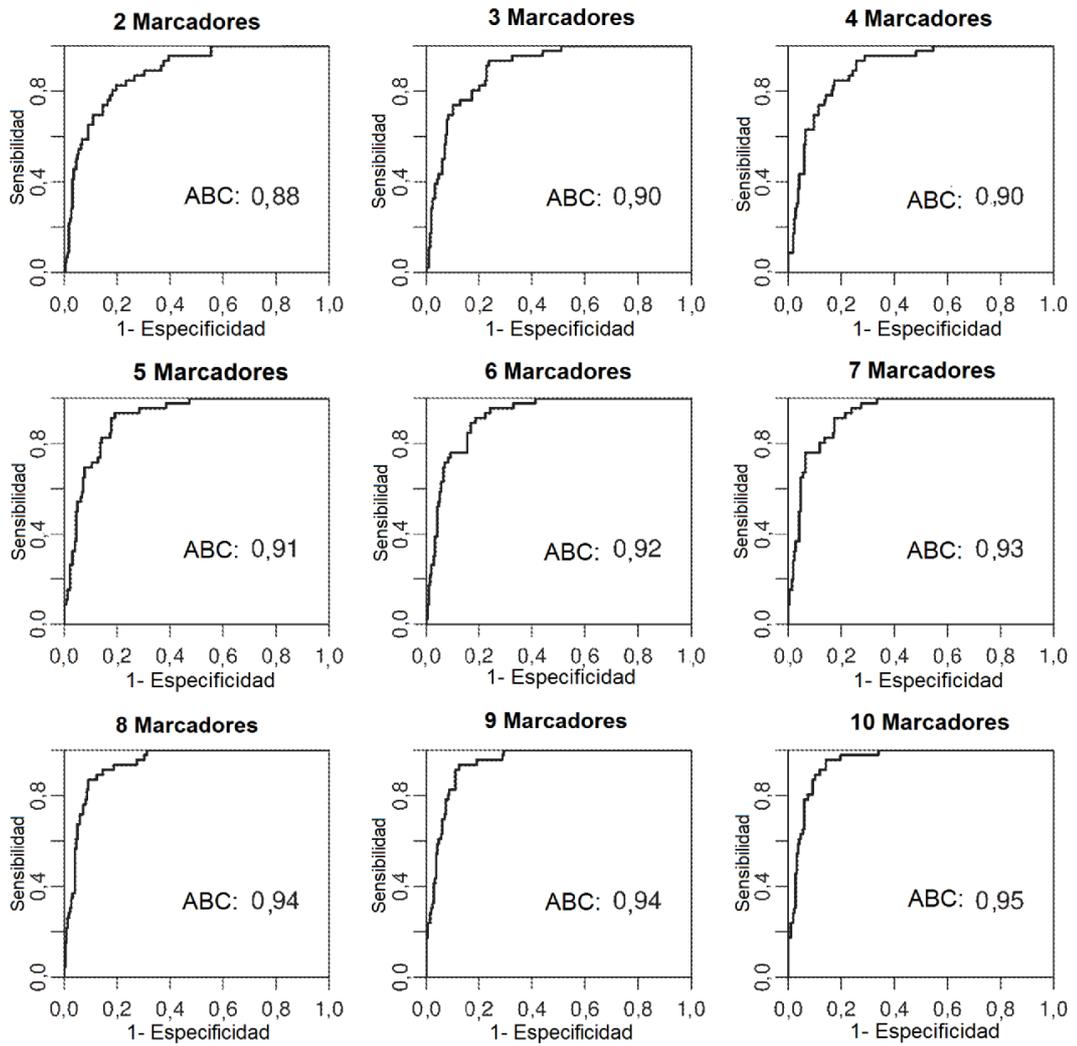


FIG. 3

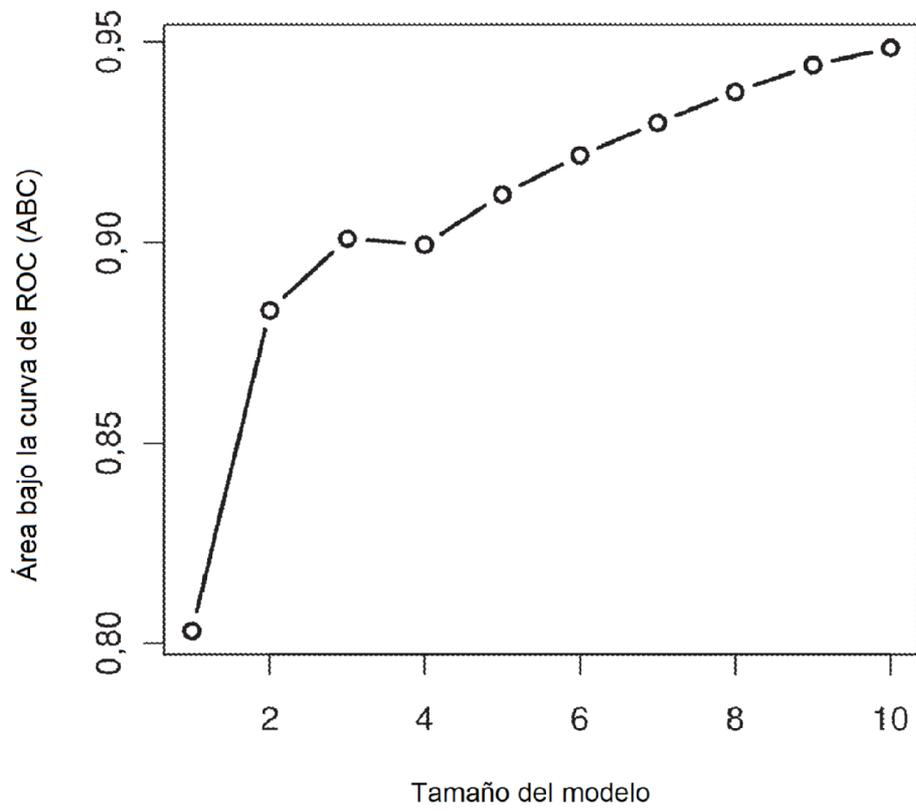


FIG. 4

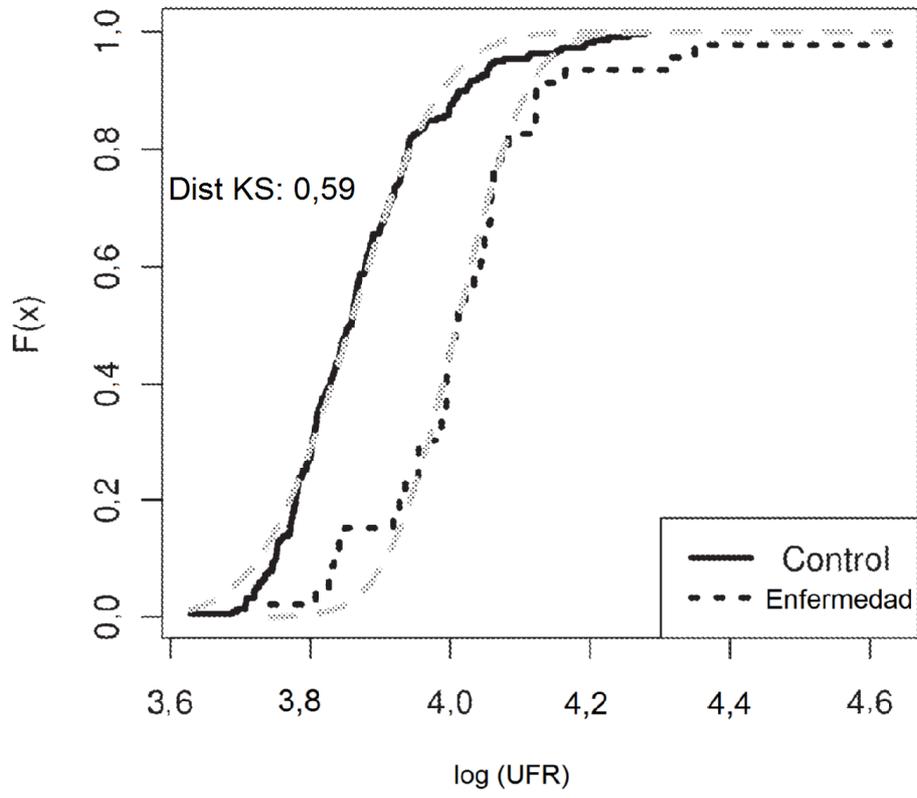


FIG. 5

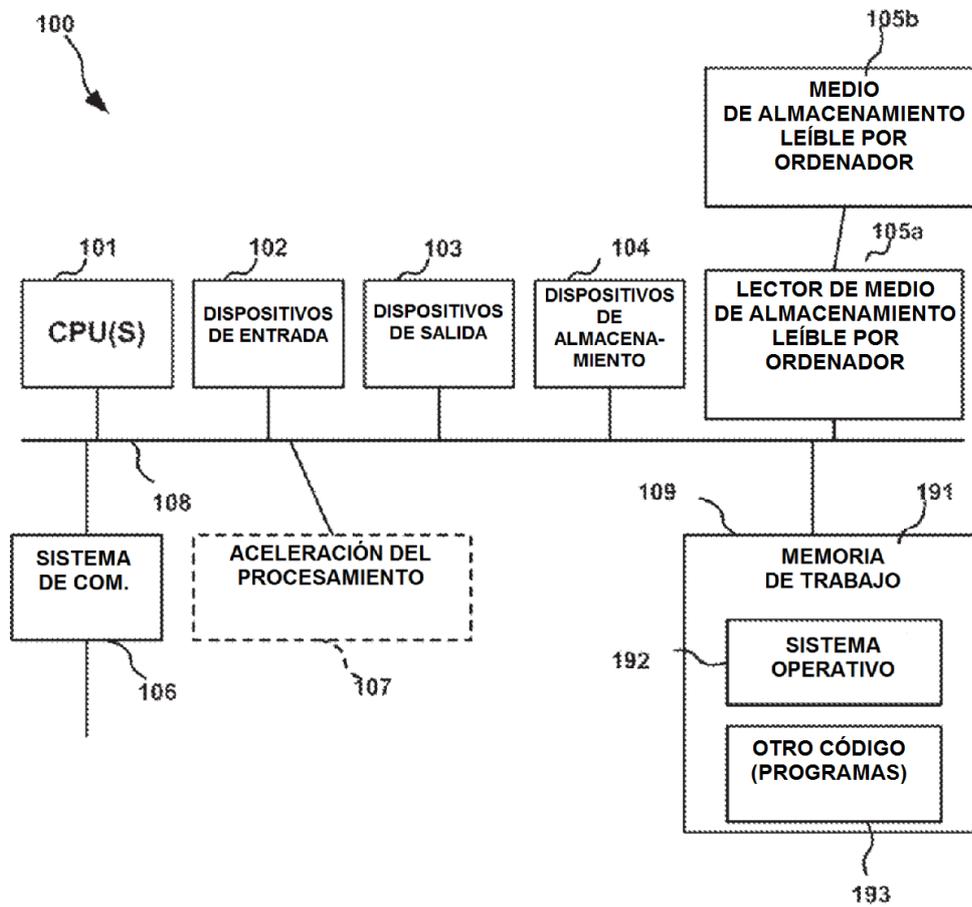


FIG. 6

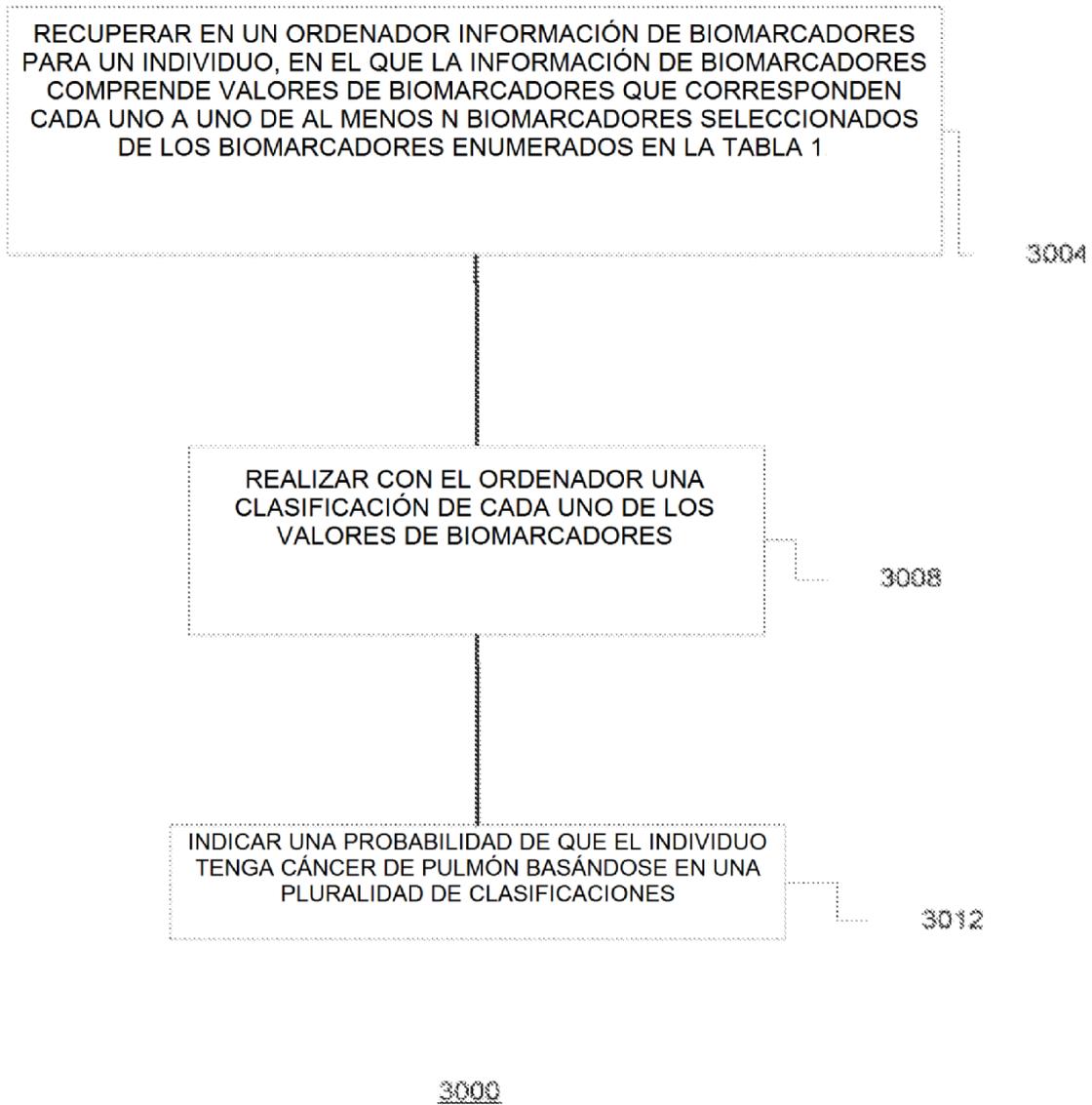


FIG. 7

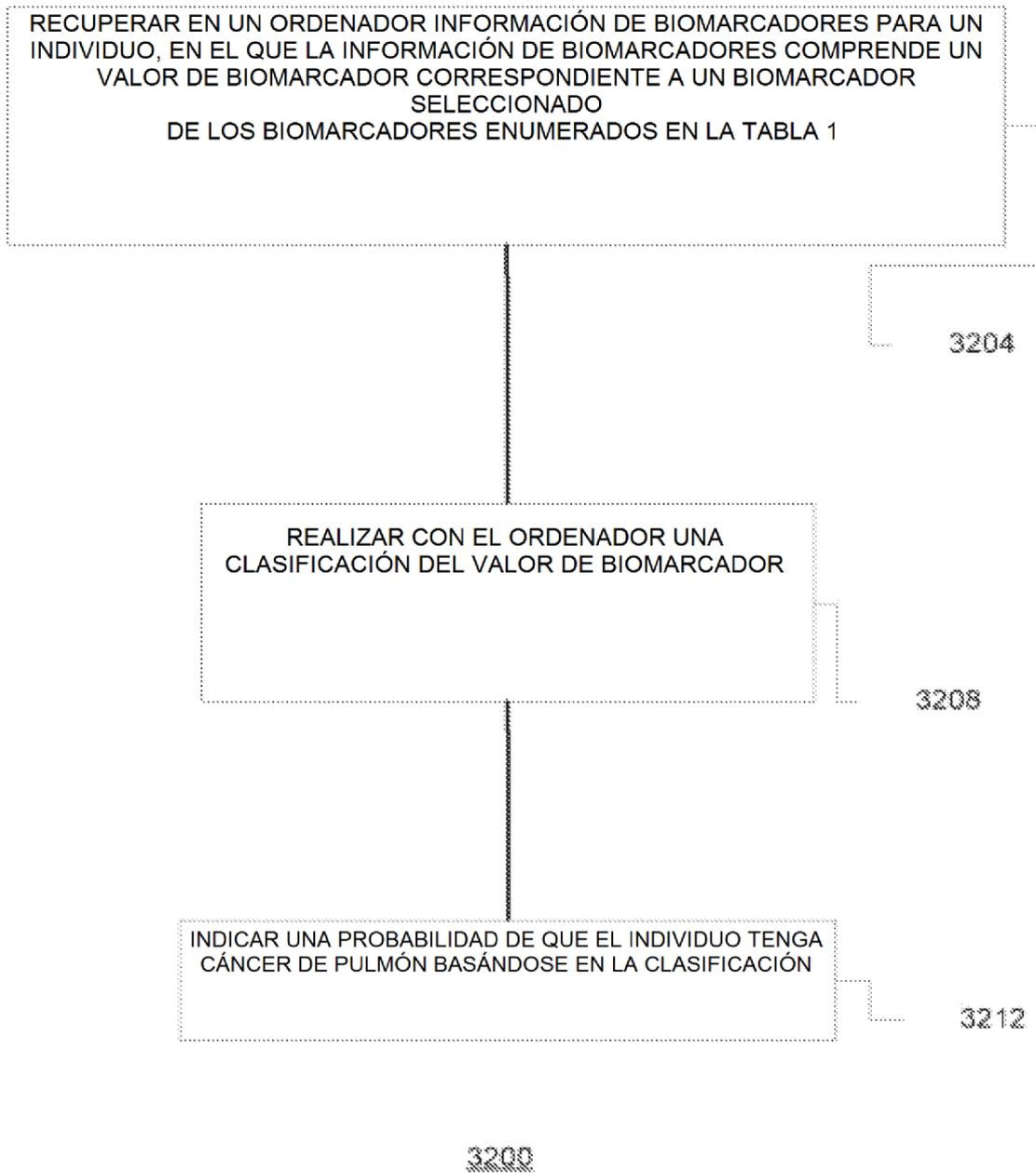


FIG. 8

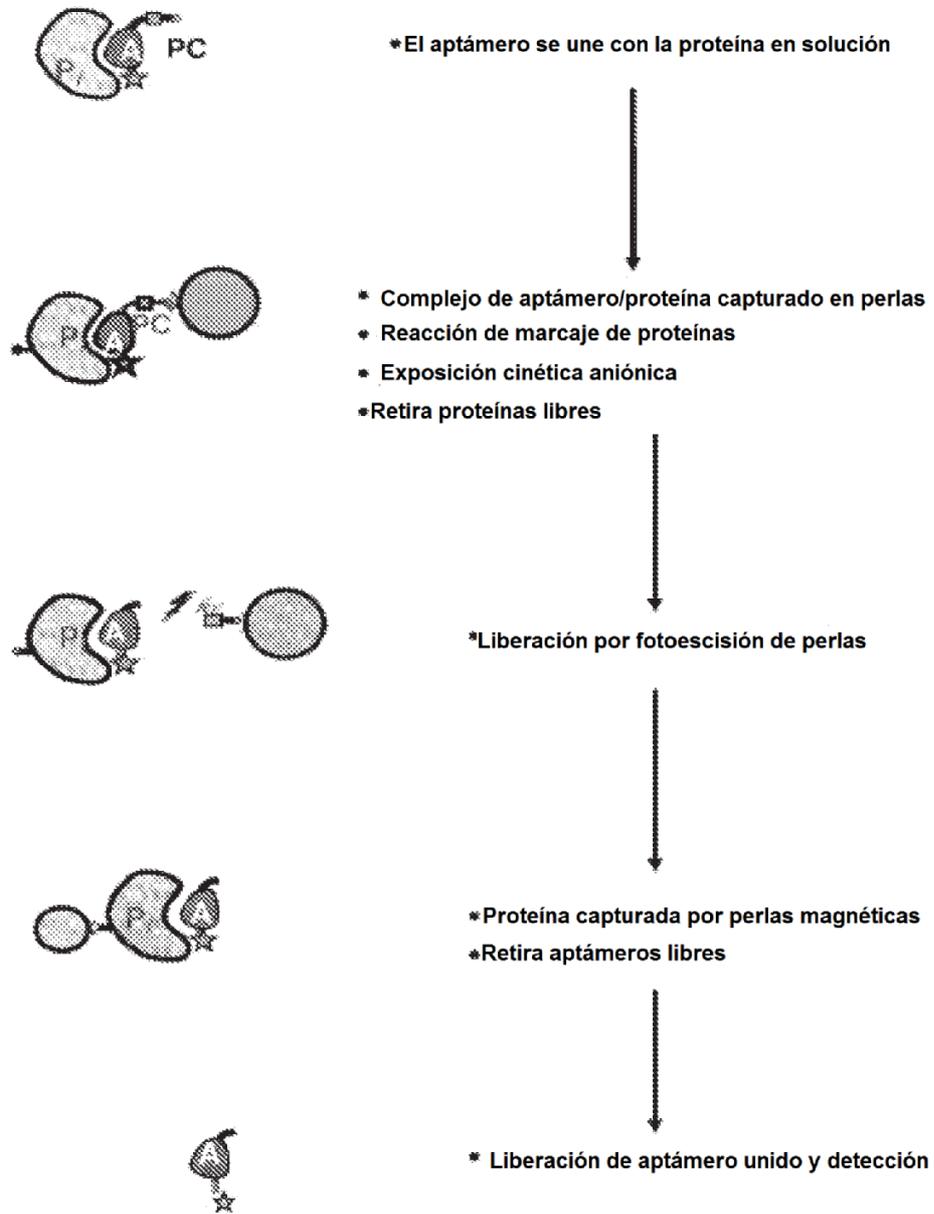


FIG. 9

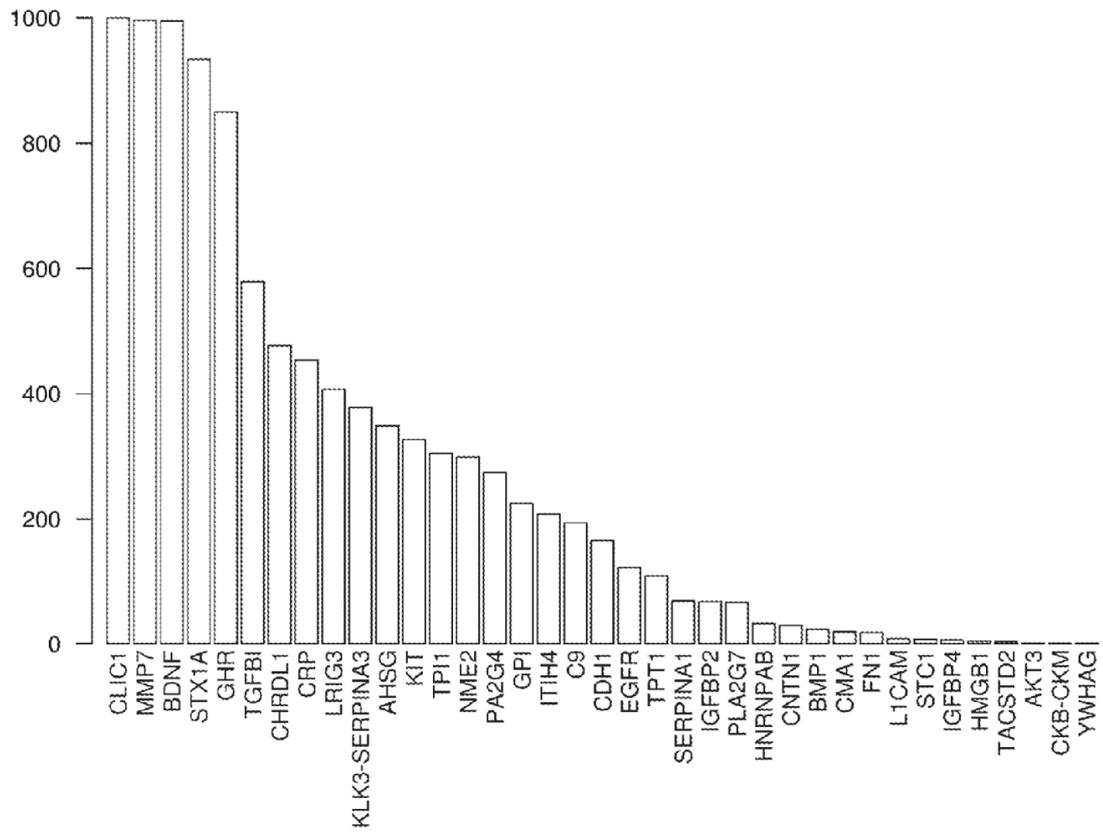


FIG. 10

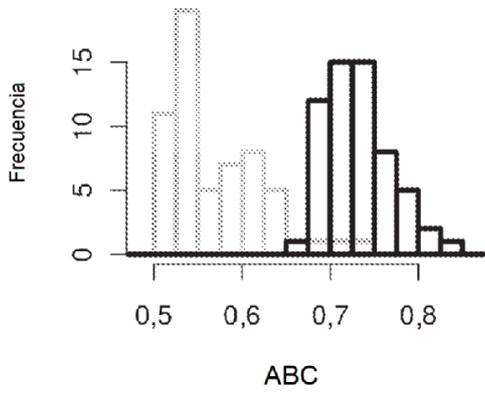


FIG. 11A

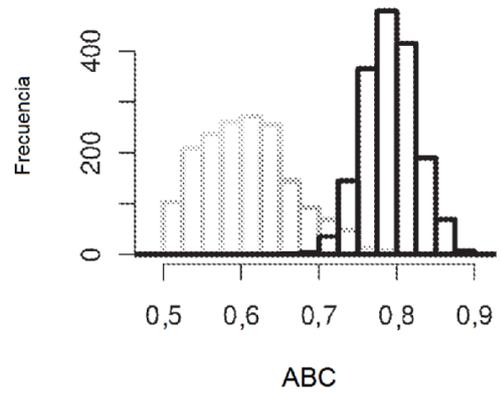


FIG. 11B

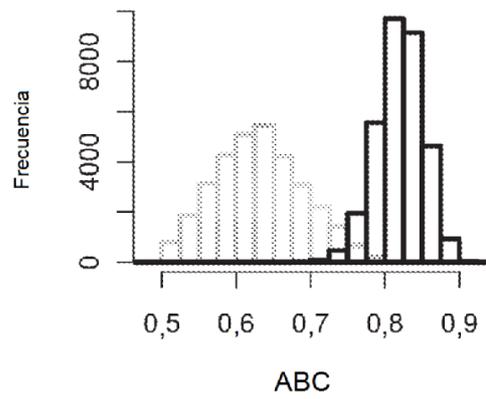


FIG. 11C

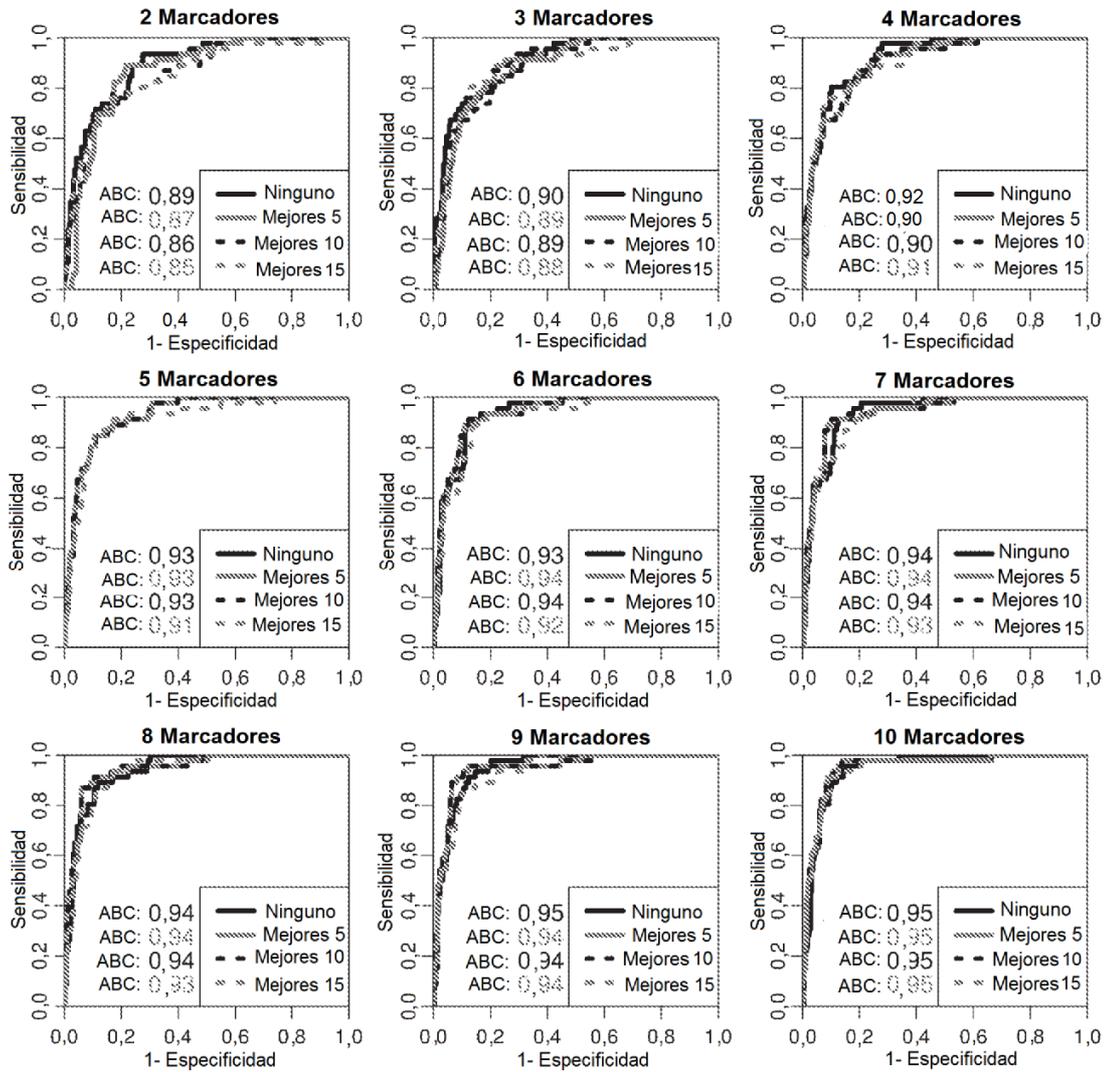


FIG. 12

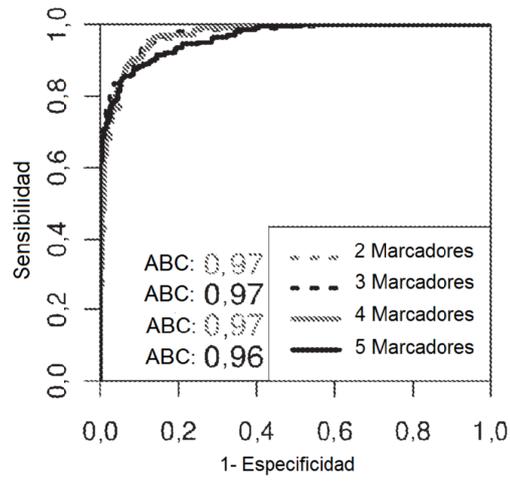


FIG. 13A

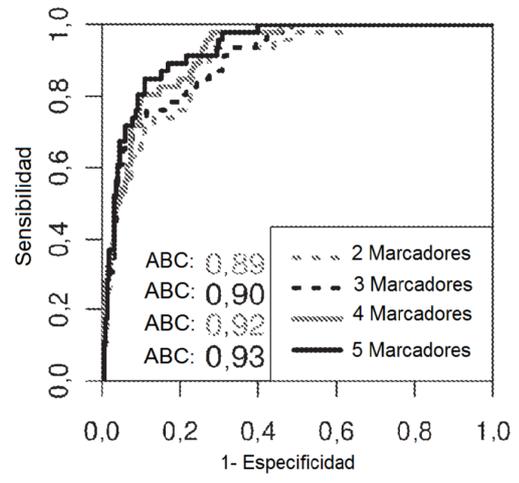


FIG. 13B

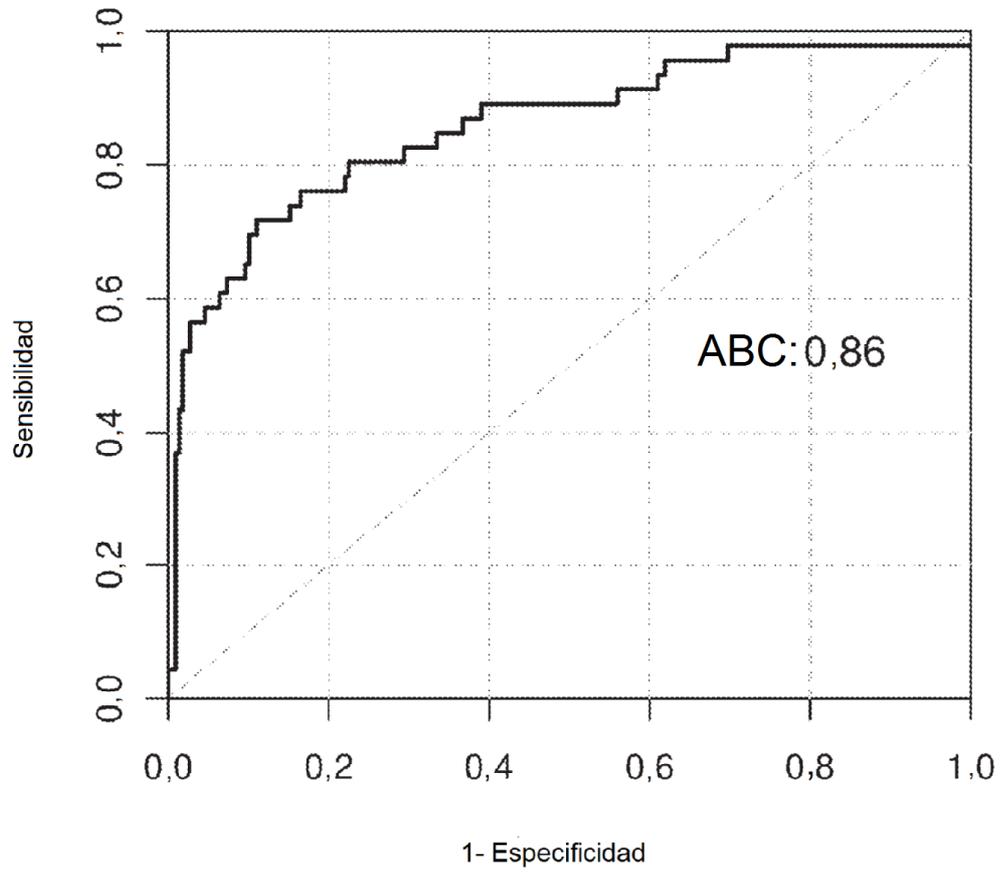
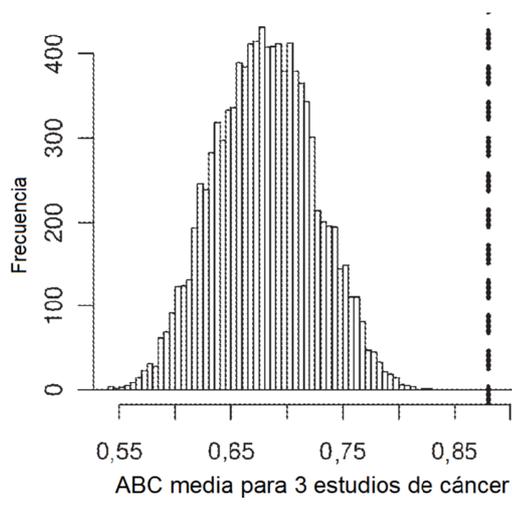
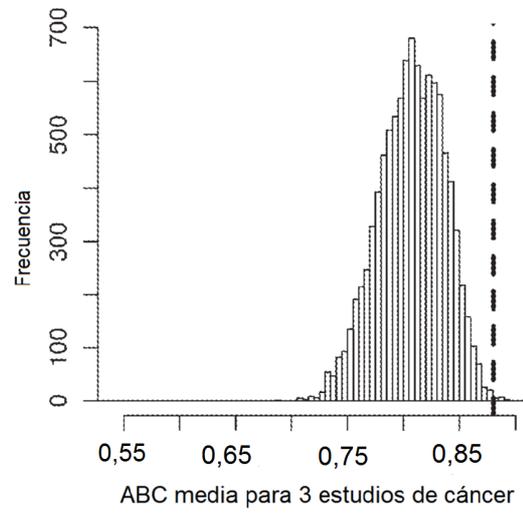


FIG. 14



**FIG. 15A**



**FIG. 15B**

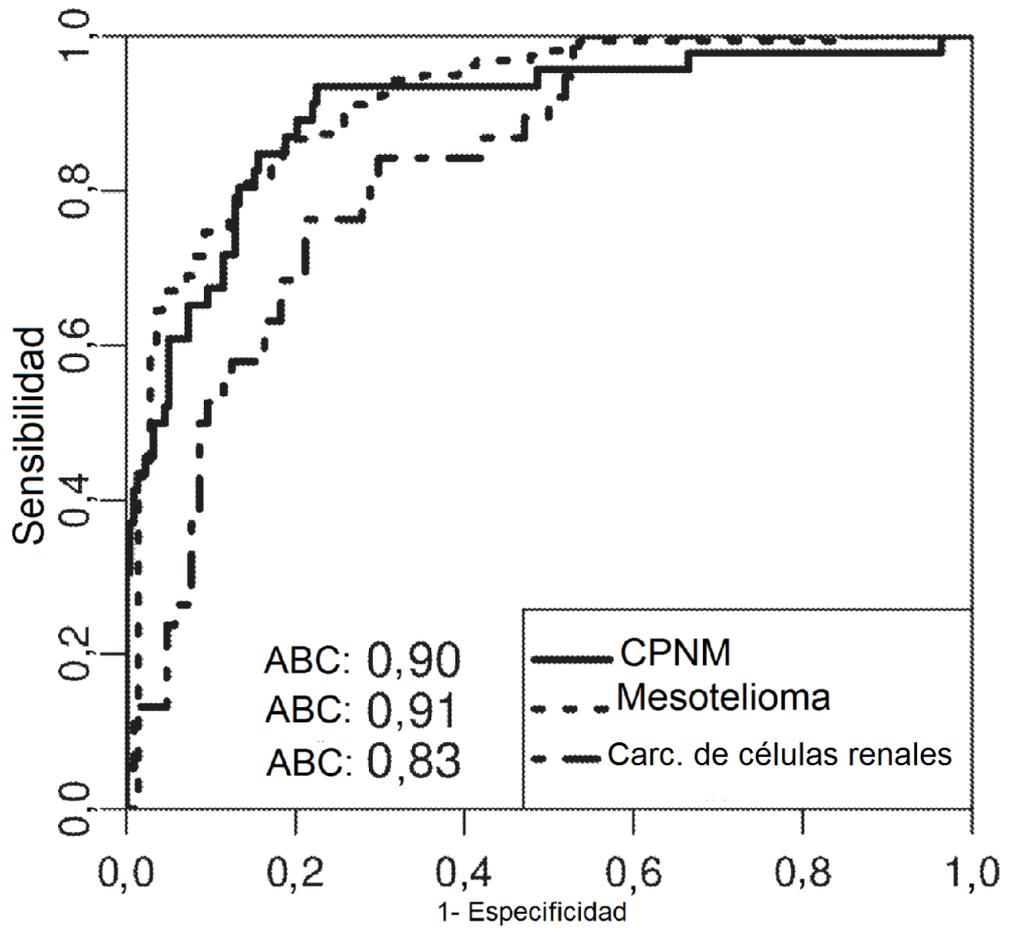


FIG. 16