

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 048**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.09.2011 E 15189622 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3029153**

54 Título: **Biomarcadores del mesotelioma y usos de los mismos**

30 Prioridad:

27.09.2010 US 386840 P
31.03.2011 US 201161470143 P

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

30.10.2018

73 Titular/es:

SOMALOGIC, INC. (100.0%)
2945 Wilderness Place
Boulder, CO 80301, US

72 Inventor/es:

OSTROFF, RACHEL M.;
STEWART, ALEX A. E.;
WILLIAMS, STEPHEN ALARIC;
BRODY, EDWARD N.;
NIKRAD, MALTI y
RIEL-MEHAN, MICHAEL

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 688 048 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 del mesotelioma y usos de los mismos

5 Campo de la invención

La presente solicitud se refiere, generalmente, a la detección de biomarcadores y al diagnóstico de cáncer en un individuo y, más específicamente, a uno o más biomarcadores, procedimientos, dispositivos, reactivos, sistemas y kits para diagnosticar cáncer, más particularmente mesotelioma maligno (mesotelioma), en un individuo.

10 Antecedentes

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

El mesotelioma es un cáncer pulmonar agresivo relacionado con el amianto cuya incidencia está aumentando. Esta enfermedad causa aproximadamente de 15.000 a 20.000 muertes anuales en todo el mundo. Entre 1940 y 1979, en Estados Unidos, aproximadamente 27,5 millones de personas estuvieron expuestas al amianto en el trabajo. La incidencia de mesotelioma en Estados Unidos es de aproximadamente 3.000 casos por año y no alcanzará su punto máximo durante otros 20 años. El mesotelioma tiene un período de latencia de 20-40 años desde la exposición al amianto, pero una vez diagnosticada, esta agresiva enfermedad suele ser mortal en 14 meses. Debido a que el diagnóstico es difícil, la mayoría de los pacientes acuden en una etapa clínicamente avanzada en la que la posibilidad de curación es mínima,

El diagnóstico precoz del mesotelioma en individuos con antecedentes de exposición al amianto es una necesidad clínica no satisfecha. Dicha exposición puede ser directa, tal como durante el tendido de tuberías o la instalación o eliminación de aislamientos a base de amianto, o indirecta, tal como la exposición a la vermiculita o la extracción de carbón. A medida que el descubrimiento de las exposiciones ocupacionales continua creciendo, aumentará la necesidad de detectar a todos los trabajadores expuestos.

El hecho de que la exposición al amianto es el principal factor causante de la enfermedad significa que una población de alto riesgo puede identificarse fácilmente para la detección clínica. Desde 1973, la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional de EE.UU. ha ordenado el control de los individuos con exposición ocupacional al amianto en el aire durante hasta 30 años después de la exposición. El control incluye radiografía de tórax, historial de salud y espirometría. Sin embargo, esta vigilancia ha sido ineficaz en el diagnóstico del mesotelioma en estadio temprano o en la detección de recurrencias. Como resultado, el cumplimiento del control no es bueno y la mayor parte de la enfermedad se detecta demasiado tarde para su curación.

En la actualidad, la mayoría de los pacientes se identifican debido a un derrame pleural y generalmente son necesarias varias consultas antes de que un especialista experimentado vea al paciente y sospeche que tiene mesotelioma. El diagnóstico a menudo se realiza a través de un análisis citológico de un derrame pleural, que tiene buena especificidad pero no es muy sensible.

Los pacientes con mesotelioma pueden presentar diversos síntomas, incluyendo:

- Tos seca o rasposa persistente (generalmente no productiva)
- Hemoptisis (tos con sangre)
- Disfagia (dificultad para tragar)
- Sudores nocturnos o fiebre
- Pérdida de peso inexplicada del 10 por ciento o más
- Fatiga
- Dolor persistente en la zona del pecho o las costillas, o respiración dolorosa
- Falta de aliento que se produce incluso en reposo
- La aparición de bultos debajo de la piel en el pecho
- Escoliosis hacia el lado de la neoplasia maligna

Estos síntomas son inespecíficos y generalmente indican enfermedad en un estadio posterior. Muchos casos de enfermedad pulmonar benigna se someten a procedimientos invasivos porque el derrame pleural también es una presentación común en pacientes con asbestosis y placas pleurales.

5 La detección del mesotelioma tiende a producirse durante los últimos estadios de la enfermedad. La supervivencia del paciente de mesotelioma diagnosticado en un estadio tardío es baja, menos de 15 meses para el estadio III y peor para el estadio IV. La detección en estadios más tempranos, cuando la enfermedad es resecable y tratable, debería aumentar la supervivencia general y beneficiar a los pacientes.

10 Fumar tiene un fuerte efecto sinérgico con la exposición al amianto y la incidencia de cáncer de pulmón aumenta 4-5 veces cuando se combinan estos dos factores de riesgo. El tabaquismo no tiene ningún efecto sobre la incidencia del mesotelioma.

15 La selección de biomarcadores para un estado de enfermedad específico implica en primer lugar la identificación de marcadores que tienen una diferencia mensurable y estadísticamente significativa en una población de enfermedad en comparación con una población de control para una aplicación médica específica. Los biomarcadores pueden incluir moléculas secretadas o desprendidas que se asemejan al desarrollo o la progresión de la enfermedad y se difunden rápidamente en el torrente sanguíneo desde el mesotelioma o el tejido del cáncer de pulmón o desde los tejidos circundantes y las células circulantes en respuesta a una neoplasia maligna. El biomarcador o conjunto de biomarcadores identificados generalmente se validan clínicamente o se muestra que es un indicador fiable para el uso previsto original para el que se seleccionó. Los biomarcadores pueden incluir moléculas pequeñas, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Algunos de los problemas clave que afectan la identificación de biomarcadores incluyen el exceso de ajuste de los datos disponibles y el sesgo en los datos.

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

30 La utilidad de la electroforesis bidimensional está limitada por la baja sensibilidad de detección; los problemas con la solubilidad, la carga y la hidrofobicidad de las proteínas; la reproducibilidad del gel y la posibilidad de que una sola mancha represente varias proteínas. Para la espectrometría de masas, dependiendo del formato utilizado, las limitaciones giran en torno al procesamiento y la separación de la muestra, la sensibilidad a las proteínas poco abundantes, las consideraciones de señal a ruido y la incapacidad de identificar inmediatamente la proteína detectada. Las limitaciones en los enfoques de inmunoensayo para el descubrimiento de biomarcadores se centran en la incapacidad de los ensayos multiplexados basados en anticuerpos para medir una gran cantidad de analitos. SE podría simplemente imprimir una matriz de anticuerpos de alta calidad y, sin sándwiches, medir los analitos unidos a esos anticuerpos. (Este sería el equivalente formal del 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 una prueba estricta de identidad. Incluso los anticuerpos muy buenos no son lo suficientemente rigurosos al seleccionar sus compañeros de unión para funcionar en el contexto de sangre o incluso extractos celulares porque el conjunto de proteínas en esas matrices tiene abundancias extremadamente diferentes). Por tanto, se debe usar un enfoque diferente con los enfoques basados en inmunoensayos para el descubrimiento de biomarcadores, sería necesario usar ensayos ELISA multiplexados (es decir, sándwiches) para obtener la suficiente rigurosidad para medir muchos analitos simultáneamente para decidir qué analitos son realmente biomarcadores. Los inmunoensayos de tipo sándwich no se adaptan a un alto contenido y, por lo tanto, no es posible el descubrimiento de biomarcadores utilizando inmunoensayos de tipo sándwich rigurosos utilizando formatos de matriz estándar. Por último, los reactivos de anticuerpos están sujetos a una gran variabilidad del lote e inestabilidad del reactivo. La presente plataforma para el descubrimiento de biomarcadores de proteínas supera este problema.

55 Muchos de estos procedimientos dependen o requieren algún tipo de fraccionamiento de la muestra antes del análisis. Por lo tanto, la preparación de la muestra requerida para ejecutar un estudio suficientemente potenciado diseñado para identificar y descubrir biomarcadores estadísticamente relevantes en una serie de poblaciones de muestra bien definidas es extremadamente difícil, costoso y lento. Durante el fraccionamiento, se puede introducir un amplio rango de variabilidad en las diversas muestras. Por ejemplo, un marcador potencial podría ser inestable para el proceso, la concentración del marcador podría cambiarse, podría producirse una agregación o desagregación inapropiada y podría ocurrir una contaminación involuntaria de la muestra que enmascararía los cambios sutiles anticipados en el estadio inicial de la enfermedad.

60 Está ampliamente aceptado que los procedimientos de descubrimiento y detección de biomarcadores que usan estas tecnologías tienen serias limitaciones para la identificación de biomarcadores diagnósticos. Estas limitaciones incluyen la incapacidad de detectar biomarcadores poco abundantes, la incapacidad de cubrir sistemáticamente todo el rango dinámico del proteoma, la irreproducibilidad en el procesamiento y fraccionamiento de muestras, y la irreproducibilidad general y la falta de solidez del procedimiento. Además, estos estudios han introducido sesgos en

los datos y no han abordado adecuadamente la complejidad de las poblaciones de muestra, incluidos los controles apropiados, en términos de distribución y aleatorización requeridas para identificar y validar biomarcadores dentro de una población de enfermedad objetivo.

5 Aunque durante varias décadas han continuado los esfuerzos destinados al descubrimiento de biomarcadores nuevos y efectivos, los esfuerzos han sido en gran medida infructuosos. Los biomarcadores para diversas enfermedades generalmente se han identificado en laboratorios académicos, normalmente a través de un descubrimiento accidental mientras se hacía investigación básica sobre algún proceso de enfermedad. En función del descubrimiento y con pequeñas cantidades de datos clínicos se publicaron documentos que sugerían la
10 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 pequeño número de muestras clínicas analizadas, proporciona solo pruebas estadísticas débiles de que se ha encontrado un biomarcador efectivo. Es decir, la identificación inicial no fue rigurosa con respecto a los elementos básicos de las estadísticas. En cada uno de los años 1994 a 2003, una búsqueda de la literatura científica muestra que se publicaron miles de referencias en
15 relación con biomarcadores. Durante ese mismo período de tiempo, sin embargo, la FDA aprobó para el uso diagnóstico, como máximo, tres nuevos biomarcadores de proteínas al año y, en varios años, no se aprobaron nuevos biomarcadores de proteínas.

20 Conforme a la historia de los esfuerzos fallidos de descubrimiento de biomarcadores, se han propuesto teorías matemáticas que promueven aún más la comprensión general de que los biomarcadores para la enfermedad son raros y difíciles de encontrar. La investigación de biomarcadores basada en geles 2D o espectrometría de masas respalda estas ideas. A través de estos enfoques se han identificado muy pocos biomarcadores útiles. Sin embargo, generalmente se pasa por alto que el gel 2D y la espectrometría de masas miden las proteínas que están presentes en la sangre a concentraciones de aproximadamente 1 nM y superiores, y que este conjunto de proteínas puede ser
25 el menos propenso a cambiar con la enfermedad. Además de la presente plataforma de descubrimiento de biomarcadores no existen plataformas de descubrimiento de biomarcadores proteómicos que puedan medir con precisión los niveles de expresión de proteínas a concentraciones mucho más bajas.

30 Se sabe mucho sobre las rutas bioquímicas para la compleja biología humana. Muchas rutas bioquímicas culminan o son iniciadas por proteínas secretadas que funcionan localmente dentro de la patología, por ejemplo, los factores de crecimiento se secretan para estimular la replicación de otras células en la patología y se secretan otros factores para proteger al sistema inmunitario, y así sucesivamente. Si bien muchas de estas proteínas secretadas funcionan de manera paracrina, algunas operan distalmente en el cuerpo. Un experto en la técnica con una comprensión básica de las rutas bioquímicas comprendería que muchas proteínas específicas de la patología deberían existir en
35 la sangre en concentraciones inferiores (incluso muy por debajo) a los límites de detección de los geles 2D y la espectrometría de masas. Lo que debe preceder a la identificación de este número relativamente abundante de biomarcadores de enfermedades es una plataforma proteómica que puede analizar proteínas en concentraciones inferiores a las detectables mediante geles 2D o espectrometría de masas.

40 Por consiguiente, existe la necesidad de biomarcadores, procedimientos, dispositivos, reactivos, sistemas y kits que activen: (a) la diferenciación entre el mesotelioma y las afecciones benignas en individuos expuestos al amianto; (b) la diferenciación entre el mesotelioma y la enfermedad metastásica y otros cánceres, que pueden incluir cáncer de pulmón, de mama, de estómago, de riñón, de ovarios, de timo y de próstata; (c) la diferenciación entre el mesotelioma y el adenocarcinoma de pulmón; (d) la detección de biomarcadores de mesotelioma; y (e) el diagnóstico de mesotelioma.
45

Hadi Yaziji et al (Evaluation of 12 antibodies for distinguishing epithelioid mesothelioma from adenocarcinoma: identification of a three antibody immunohistochemical panel with maximal sensitivity and specificity. *Modern Pathology* vol.19, n.º.4,1 de abril de 2006, páginas 514-523)) describen la evaluación de 10 anticuerpos monoclonales y dos anticuerpos policlonales para distinguir el mesotelioma epitelioides del adenocarcinoma mediante inmunohistoquímica.
50

El documento US2009/104617A1 describe un procedimiento para diagnosticar estados o condiciones biológicas basadas en relaciones de los datos de expresión génica de muestras de tejido, tales como muestras de tejido
55 canceroso.

Sumario

60 La presente aplicación incluye biomarcadores, procedimientos, reactivos, dispositivos, sistemas y kits para la detección y el diagnóstico de cáncer y, más particularmente, del mesotelioma. Los biomarcadores de la presente solicitud se identificaron utilizando un ensayo multiplexado basado en aptámeros que se describe con detalle en el Ejemplo 1. Mediante el uso del procedimiento de identificación de biomarcadores basado en aptámeros descrito en el presente documento, esta solicitud describe un número sorprendentemente grande de biomarcadores de mesotelioma que son útiles para la detección y el diagnóstico del mesotelioma, así como una gran cantidad de
65 biomarcadores de cáncer que son útiles para la detección y el diagnóstico de cáncer en general. Al identificar estos biomarcadores, se midieron más de 1.000 proteínas de cientos de muestras individuales, algunas de las cuales se

encontraban en concentraciones en el intervalo femtomolar bajo. Esto es aproximadamente cuatro órdenes de magnitud menor que los experimentos de descubrimiento de biomarcadores realizados con geles 2D y / o espectrometría de masas.

5 Si bien algunos de los biomarcadores de mesotelioma descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar mesotelioma, en el presente documento se describen procedimientos para la agrupación de subconjuntos múltiples de los biomarcadores de mesotelioma que son útiles como panel de biomarcadores. Una vez que se ha identificado un biomarcador individual o un subconjunto de biomarcadores, la detección o diagnóstico de mesotelioma en un individuo se puede lograr usando cualquier plataforma o formato de ensayo que sea capaz de medir las diferencias en los niveles del biomarcador o biomarcadores seleccionados en una muestra biológica.

15 Sin embargo, solo mediante el uso del procedimiento de identificación de biomarcadores basado en aptámeros descrito en el presente documento, en el que se seleccionaron individualmente más de 1.000 biomarcadores potenciales distintos de un gran número de individuos que habían sido diagnosticados previamente con mesotelioma o no, que era posible identificar los biomarcadores de mesotelioma divulgados en el presente documento. Este enfoque de descubrimiento está en marcado contraste con el descubrimiento de biomarcadores de medios condicionados o células lisadas, ya que consulta un sistema más relevante para el paciente que no requiere traducción a la patología humana.

20 Por tanto, en un aspecto de la presente solicitud, se proporcionan uno o más biomarcadores para su uso solo o en diversas combinaciones para diagnosticar mesotelioma o permitir el diagnóstico diferencial de mesotelioma de afecciones benignas, tales como las encontradas en individuos expuestos al amianto. Las realizaciones a modo de ejemplo incluyen los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, que, como se ha indicado anteriormente, se identificaron utilizando un ensayo multiplexado basado en aptámeros, como se describe generalmente en el Ejemplo 1 y, más específicamente, en el Ejemplo 2. Los marcadores proporcionados en la Tabla 1 son útiles para diagnosticar mesotelioma en una población de alto riesgo y para distinguir enfermedades pulmonares benignas en personas expuestas al amianto del mesotelioma.

30 Si bien algunos de los biomarcadores de mesotelioma descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar mesotelioma, en el presente documento también se describen procedimientos para la agrupación de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de mesotelioma que son útiles como panel de dos o más biomarcadores. Por tanto, varias realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, donde N es al menos dos biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 2-66 biomarcadores.

35 En otras realizaciones más, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 2-5, 2-10, 2-15, 2-20, 2-25, 2-30, 2-35, 2-40, 2-45, 2-50, 2-55, 2-60 o 2-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 3-25, 3-30, 3-35, 3-40, 3-45, 3-50, 3-55, 3-60 o 3-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 4-5, 4-10, 4-15, 4-20, 4-25, 4-30, 4-35, 4-40, 4-45, 4-50, 4-55, 4-60 o 4-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55, 5-60 o 5-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 6-10, 6-15, 6-20, 6-25, 6-30, 6-35, 6-40, 6-45, 6-50, 6-55, 6-60 o 6-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 7-10, 7-15, 7-20, 7-25, 7-30, 7-35, 7-40, 7-45, 7-50, 7-55, 7-60 o 7-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 8-10, 8-15, 8-20, 8-25, 8-30, 8-35, 8-40, 8-45, 8-50, 8-55, 8-60 o 8-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 9-10, 9-15, 9-20, 9-25, 9-30, 9-35, 9-40, 9-45, 9-50, 9-55, 9-60 o 9-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 10-15, 10-20, 10-25, 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-55, 10-60 o 10-66. Se apreciará que N puede seleccionarse de modo que abarque intervalos similares, pero de orden superior.

50 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de al menos un valor de biomarcador correspondiente al menos a un biomarcador seleccionado entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1, en el que el individuo se clasifica como que tiene mesotelioma basándose en al menos un valor de biomarcador.

55 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en el que la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma se determina basándose en los valores de biomarcadores.

60 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en el que el individuo se clasifica como que tiene mesotelioma basándose en los valores de biomarcadores y en el que N=2-10.

5 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1, en el que la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma se determina basándose en los valores de biomarcadores y en el que $N = 2-10$.

10 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar que un individuo no tiene mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de al menos un valor de biomarcador correspondiente al menos a un biomarcador seleccionado entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que el individuo se clasifica como que no tiene mesotelioma basándose en al menos un valor de biomarcador.

15 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar que un individuo no tiene mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que el individuo se clasifica como que no tiene mesotelioma basándose en los valores de biomarcadores y en el que $N = 2-10$.

20 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene mesotelioma, y en el que $N = 3-10$.

25 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene mesotelioma, y en el que $N = 3-10$.

30 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador de un panel de biomarcadores seleccionados del grupo de paneles expuestos en las Tablas 2 -11, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene mesotelioma.

35 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica ausencia de mesotelioma en el individuo tiene mesotelioma y en el que $N = 3-10$.

45 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica ausencia de mesotelioma en el individuo tiene mesotelioma y en el que $N = 3-10$.

50 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de mesotelioma, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, los valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador de un panel de biomarcadores seleccionados del grupo de paneles proporcionados en las Tablas 2 -11, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica ausencia de mesotelioma en el individuo.

55 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar mesotelioma en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, los valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que el individuo se clasifica como que tiene mesotelioma según una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en el que $N = 2-10$.

60 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de mesotelioma en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, los valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 1, en el que dicho individuo se clasifica como que no tiene mesotelioma según una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en el que $N = 2-10$.

65 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento implementado por ordenador para indicar una probabilidad de

mesotelioma. El procedimiento comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores, en el que N es como se ha definido anteriormente, seleccionado entre el 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 mesotelioma según una pluralidad de clasificaciones.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento implementado por ordenador para clasificar a un individuo como que tiene o no tiene mesotelioma. El procedimiento comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el 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 mesotelioma según una pluralidad de clasificaciones.

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

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

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento implementado por ordenador para indicar una probabilidad de mesotelioma. El procedimiento comprende recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador seleccionado entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 1; realizar con el ordenador una clasificación del valor del biomarcador; e indicar una probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma según la clasificación.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento implementado por ordenador para clasificar a un individuo como que tiene o no tiene mesotelioma. El procedimiento comprende recuperar de un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador seleccionado entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1; realizar con el ordenador una clasificación del valor del biomarcador; e indicar si el individuo tiene mesotelioma según la clasificación.

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

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

Si bien algunos de los biomarcadores descritos también son útiles solos para detectar y diagnosticar cáncer en general, en el presente documento se describen procedimientos para la agrupación de subconjuntos múltiples de los biomarcadores de que son útiles como panel de biomarcadores para detectar y diagnosticar cáncer en general. Una vez que se ha identificado un biomarcador individual o un subconjunto de biomarcadores, la detección o diagnóstico

de cáncer en un individuo se puede lograr usando cualquier plataforma o formato de ensayo que sea capaz de medir las diferencias en los niveles del biomarcador o biomarcadores seleccionados en una muestra biológica.

5 Sin embargo, solo mediante el uso del procedimiento de identificación de biomarcadores basado en aptámeros descrito en el presente documento, en el que se seleccionaron individualmente más de 1.000 biomarcadores potenciales distintos de un gran número de individuos que habían sido diagnosticados previamente con cáncer o no, que era posible identificar los biomarcadores de cáncer divulgados en el presente documento. Este enfoque de descubrimiento está en marcado contraste con el descubrimiento de biomarcadores de medios condicionados o células lisadas, ya que consulta un sistema más relevante para el paciente que no requiere traducción a la patología humana.

15 Por 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, se identificaron utilizando un ensayo basado en aptámero multiplexado, como se describe generalmente en el Ejemplo 1 y, más específicamente, en el Ejemplo 5. Los marcadores proporcionados en la Tabla 19 son útiles para distinguir individuos que tienen cáncer de aquellos que no tienen cáncer.

20 Si bien algunos de los biomarcadores de cáncer descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar cáncer, en el presente documento también se describen procedimientos para la agrupación de múltiples subconjuntos de los biomarcadores de cáncer que son útiles cada uno como panel de tres o más biomarcadores. Por tanto, varias realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en las que N es al menos tres biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 3-22 biomarcadores.

25 En otras realizaciones más, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 2-5, 2-10, 2-15, 2-20 o 2-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 3-5, 3-10, 3-15, 3-20 o 3-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 4-5, 4-10, 4-15, 4-20 o 4-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 5-10, 5-15, 5-20 o 5-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 6-10, 6-15, 6-20 o 6-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 7-10, 7-15, 7-20 o 7-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 8-10, 8-15, 8-20 o 8-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 9-10, 9-15, 9-20 o 9-22. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 10-15, 10-20 o 10-22. Se apreciará que N puede seleccionarse de modo que abarque intervalos similares, pero de orden superior.

35 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de al menos un valor de biomarcador correspondiente al menos a un biomarcador seleccionado entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19, en el que el individuo se clasifica como que tiene cáncer basándose en al menos un valor de biomarcador.

40 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en el que la probabilidad de que el individuo tenga cáncer se determina basándose en los valores de biomarcadores.

50 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en el que el individuo se clasifica como que tiene cáncer basándose en los valores de biomarcadores y en el que $N=3-10$.

55 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19, en el que la probabilidad de que el individuo tenga cáncer se determina basándose en los valores de biomarcadores y en el que $N=3-10$.

60 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar que un individuo no tiene cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de al menos un valor de biomarcador correspondiente al menos a un biomarcador seleccionado entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 19, en el que el individuo se clasifica como que no tiene cáncer basándose en al menos un valor de biomarcador.

65 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar que un individuo no tiene cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores

expuestos en la Tabla 19, en el que el individuo se clasifica como que no tiene cáncer basándose en los valores de biomarcadores y en el que N=3-10.

5 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 19, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene cáncer y en el que N = 3-10.

10 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 19, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene cáncer y en el que N = 3-10.

15 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador de un panel de biomarcadores seleccionados entre el grupo de paneles expuestos en las Tablas 20 - 29, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica que el individuo tiene cáncer.

20 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 19, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica ausencia de cáncer en el individuo y en el que N = 3-10.

25 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, de valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador en un panel de N biomarcadores, en el que los biomarcadores se seleccionan entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 19, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica ausencia de cáncer en el individuo y en el que N = 3-10.

30 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de cáncer, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, los valores de biomarcadores que corresponden cada uno a un biomarcador de un panel de biomarcadores seleccionados del grupo de paneles proporcionados en las Tablas 20 -29, en el que una clasificación de los valores de biomarcadores indica ausencia de cáncer en el individuo.

35 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar cáncer en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, los valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 19, en el que el individuo se clasifica como que tiene cáncer según una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en el que N = 3-10.

40 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para diagnosticar ausencia de cáncer en un individuo, en el que el procedimiento incluye la detección, en una muestra biológica de un individuo, los valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el grupo de biomarcadores expuestos en la Tabla 19, en el que dicho individuo se clasifica como que no tiene cáncer según una puntuación de clasificación que se desvía de un umbral predeterminado y en el que N = 3-10.

45 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento implementado por ordenador para indicar una probabilidad cáncer. El procedimiento comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores, en el que N es como se ha definido anteriormente, seleccionado entre el 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 según una pluralidad de clasificaciones.

50 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento implementado por ordenador para clasificar a un individuo como que tiene o no tiene cáncer. El procedimiento comprende: recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados entre el 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 según una pluralidad de clasificaciones.

55 En otro aspecto, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de cáncer. El producto de programa informático incluye un medio legible por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: un

5 código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores, en el que N es como se ha definido anteriormente, en la muestra biológica seleccionada entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica una probabilidad de que el individuo tenga cáncer en función de los valores de biomarcadores.

10 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 legible por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores en la muestra biológica seleccionados entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de cáncer del individuo en función de los valores de biomarcadores.

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

20 En otro aspecto, se proporciona un procedimiento implementado por ordenador para clasificar a un individuo como que tiene o no tiene cáncer. El procedimiento comprende recuperar de un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador seleccionado entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19; realizar con el ordenador una clasificación del valor del biomarcador; e indicar si el individuo tiene cáncer según la clasificación.

25 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 legible por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado entre el grupo de biomarcadores expuesto en la Tabla 19; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica una probabilidad de que el individuo tenga cáncer en función del valor de biomarcador.

30 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 legible por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 19; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de cáncer del individuo en función del valor de biomarcador.

35 **Breve descripción de los dibujos**

45 La figura 1A es un diagrama de flujo para un procedimiento de ejemplo para detectar mesotelioma en una muestra biológica.

La figura 1B es un diagrama de flujo para un procedimiento de ejemplo para detectar mesotelioma en una muestra biológica usando un método de clasificación ingenuo de Bayes.

50 La figura 2 muestra una curva ROC para un solo biomarcador, CDH1, utilizando un clasificador ingenuo de Bayes para una prueba que detecta mesotelioma.

La figura 3 muestra curvas ROC para paneles de biomarcadores de dos a diez biomarcadores utilizando clasificadores ingenuos de Bayes para una prueba que detecta mesotelioma.

55 La figura 4 ilustra el aumento en la puntuación de clasificación (AUC) a medida que aumenta el número de biomarcadores de uno a diez usando la clasificación ingenua de Bayes para un panel de mesotelioma.

La figura 5 muestra las distribuciones de los biomarcadores medidas para CDH1 como una función de distribución acumulativa (cdf) en RFU transformada logarítmicamente para los individuos expuestos a amianto combinados (línea continua) y el grupo de enfermedad de mesotelioma (línea de puntos) junto con sus ajustes de curva a un cdf normal (líneas discontinuas) utilizadas para entrenar los clasificadores ingenuos de Bayes.

60 La figura 6 ilustra un sistema informático a modo de ejemplo para su uso con diversos procedimientos implementados por ordenador descritos en el presente documento.

La figura 7 es un diagrama de flujo para un procedimiento para indicar la probabilidad de que un individuo tenga mesotelioma de acuerdo con una realización.

65 La figura 8 es un diagrama de flujo para un procedimiento para indicar la probabilidad de que un individuo tenga mesotelioma de acuerdo con una realización.

La figura 9 ilustra un ensayo de aptámero a modo de ejemplo que puede usarse para detectar uno o más

biomarcadores de mesotelioma en una muestra biológica.

La figura 10 muestra un histograma de frecuencias para el que se usaron biomarcadores en la construcción de clasificadores para distinguir entre el mesotelioma y los individuos expuestos a amianto a partir de un conjunto agregado de biomarcadores potenciales.

5 La figura 11A muestra un par de histogramas que resumen todas las posibles puntuaciones del clasificador ingenuo de Bayes (AUC) en una sola proteína usando los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 (negro) y un conjunto de marcadores aleatorios (gris).

10 La figura 11B muestra un par de histogramas que resumen todas las posibles puntuaciones del clasificador de proteínas ingenuo de Bayes (AUC) 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 posibles puntuaciones del clasificador ingenuo de Bayes (AUC) de tres proteínas, usando los biomarcadores expuestos en la Tabla 1 (negro) y un conjunto de marcadores aleatorios (gris).

15 La figura 12 muestra el AUC para clasificadores ingenuos de Bayes utilizando de 2 a 10 marcadores seleccionados del panel completo y las puntuaciones obtenidas eliminando los mejores 5, 10 y 15 marcadores durante la generación del clasificador.

La figura 13A muestra un conjunto de curvas ROC modeladas a partir de los datos de la Tabla 14 para paneles de dos a cinco marcadores.

20 La figura 13B muestra un conjunto de curvas ROC calculadas a partir de los datos de entrenamiento para paneles de dos a cinco marcadores como en la figura 12A.

Las figuras 14A y 14B muestran una comparación del rendimiento entre diez biomarcadores de cáncer seleccionados mediante un procedimiento de selección ambicioso descrito en el Ejemplo 5 (Tabla 19) y 1.000 conjuntos de muestras aleatorias de diez biomarcadores "no marcadores". El AUC media para los diez biomarcadores de cáncer en la Tabla 19 se muestra como una línea de puntos vertical. En la figura 14A, se seleccionaron aleatoriamente conjuntos de diez "no marcadores" que no se seleccionaron mediante el procedimiento ambicioso descrito en el Ejemplo 5. En la figura 14B, se usó el mismo procedimiento que en 14A; sin embargo, el muestreo se restringió a los 56 biomarcadores de mesotelioma restantes de la Tabla 1 que no se seleccionaron mediante el procedimiento ambicioso descrito en el Ejemplo 5.

25 La figura 15 muestra las curvas de la característica operativa del receptor (ROC) para los 3 clasificadores ingenuos de Bayes expuestos en la Tabla 19. Para cada estudio, el área bajo la curva (AUC) también se muestra junto a la leyenda.

Descripción detallada

35 A continuación se hará referencia con detalle a realizaciones representativas de la invención. Aunque la invención se describirá junto con las realizaciones enumeradas, debe entenderse que la invención no está limitada a dichas realizaciones. Por el contrario, se pretende que la invención cubra todas las alternativas, modificaciones y equivalentes que pueden incluirse en el alcance de la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones.

40 El experto en la materia reconocerá muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, que podrán utilizarse y están dentro del alcance de la práctica de la presente invención. La presente invención no está limitada de ningún modo a los procedimientos y materiales descritos.

45 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comprende habitualmente un experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque en la puesta en práctica o el ensayo de la presente invención se puede usar cualquier método, dispositivo y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los procedimientos, dispositivos y materiales preferentes.

50 Todas las publicaciones, documentos de patentes publicados y solicitudes de patentes citadas en esta solicitud son indicativos del nivel de habilidad en la técnica o técnicas a las que pertenece la solicitud.

55 Tal como se usa en la presente solicitud, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno/una", y "el/la" incluyen las referencias en plural, a menos que el contenido indique claramente lo contrario y se usan indistintamente con "al menos uno" y "uno o más". Por tanto, la referencia a "un aptámero" incluye mezclas de aptámeros, la referencia a "una sonda" incluye mezclas de sondas, y similares.

60 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 artículo con el que se relaciona el valor numérico no cambia.

65 Como se usa en el presente documento, los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "contiene", "que contiene", y cualquier variación de los mismos, se pretende que abarquen una inclusión no excluyente, de modo que un proceso, procedimiento, producto por proceso o composición de materia que comprende, incluye o contiene un elemento o lista de elementos no incluya solo dichos elementos sino que pueda incluir otros elementos no enumerados expresamente o inherentes a dicho proceso, procedimiento, producto por

proceso o composición de materia.

La presente aplicación incluye biomarcadores, procedimientos, dispositivos, reactivos, sistemas y kits para la detección y el diagnóstico de mesotelioma y, más generalmente, cáncer.

5 En un aspecto, se proporcionan uno o más biomarcadores para su uso solos o en diversas combinaciones para diagnosticar el mesotelioma, permitir el diagnóstico diferencial de mesotelioma de afecciones no malignas observadas en individuos expuestos al amianto, controlar la recurrencia de mesotelioma o abordar otras indicaciones clínicas. Como se describe con detalle a continuación, las realizaciones a modo de ejemplo incluyen los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, que se identificaron usando un ensayo multiplexado basado en aptámeros, como se describe generalmente en el Ejemplo 1 y, más específicamente, en el Ejemplo 2.

15 La Tabla 1 presenta los hallazgos obtenidos al analizar cientos de muestras de sangre individuales de casos de mesotelioma y cientos de muestras de sangre individuales equivalentes de individuos expuestos al amianto. El grupo de individuos expuestos al amianto se diseñó para que coincidiera con las poblaciones con las cuales una prueba de diagnóstico de mesotelioma puede tener el mayor beneficio, incluidos individuos asintomáticos e individuos sintomáticos. El alto riesgo de mesotelioma incluye la exposición ocupacional o ambiental al amianto y a materiales fibrosos relacionados, incluidos nanotubos de carbono y silicatos fibrosos y la exposición a la radiación ionizante.

20 Los biomarcadores potenciales se midieron en muestras individuales en lugar de agrupar la sangre enferma y de control; esto permitió una mejor comprensión de las variaciones individuales y de grupo en los fenotipos asociados con la presencia y la ausencia de enfermedad (en este caso, mesotelioma). Dado que se realizaron más de 1.000 mediciones de proteína en cada muestra y se midieron individualmente varios cientos de muestras de cada una de las poblaciones de enfermedad y control, la Tabla 1 es el resultado de un análisis de un conjunto de datos poco común. Las mediciones se analizaron utilizando los procedimientos descritos en la sección "Clasificación de biomarcadores y cálculo de puntuaciones de enfermedad" en el presente documento. La Tabla 1 enumera los 66 biomarcadores que se encontraron útiles para distinguir muestras obtenidas de individuos con mesotelioma de muestras de "control" obtenidas de individuos expuestos al amianto.

30 Si bien algunos de los biomarcadores de mesotelioma descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar mesotelioma, en el presente documento también se describen procedimientos para la agrupación de múltiples subconjuntos de biomarcadores de mesotelioma, en los que cada selección de grupos o subconjuntos es útil como panel de tres o más biomarcadores, a los que en el presente documento se hace referencia de forma indistinta como "panel de biomarcador" y un panel. Por tanto, varias realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, donde N es al menos dos biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona entre 2-66 biomarcadores.

40 En otras realizaciones más, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 2-5, 2-10, 2-15, 2-20, 2-25, 2-30, 2-35, 2-40, 2-45, 2-50, 2-55, 2-60 o 2-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 3-5, 3-10, 3-15, 3-20, 3-25, 3-30, 3-35, 3-40, 3-45, 3-50, 3-55, 3-60 o 3-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 4-5, 4-10, 4-15, 4-20, 4-25, 4-30, 4-35, 4-40, 4-45, 4-50, 4-55, 4-60 o 4-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 5-10, 5-15, 5-20, 5-25, 5-30, 5-35, 5-40, 5-45, 5-50, 5-55, 5-60 o 5-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 6-10, 6-15, 6-20, 6-25, 6-30, 6-35, 6-40, 6-45, 6-50, 6-55, 6-60 o 6-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 7-10, 7-15, 7-20, 7-25, 7-30, 7-35, 7-40, 7-45, 7-50, 7-55, 7-60 o 7-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo 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, 8-60 u 8-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo 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, 9-60 o 9-66. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número entre 10-15, 10-20, 10-25, 10-30, 10-35, 10-40, 10-45, 10-50, 10-55, 10-60 o 10-66. Se apreciará que N puede seleccionarse de modo que abarque intervalos similares, pero de orden superior.

55 En una realización, el número de biomarcadores útiles para un subconjunto o panel de biomarcadores se basa en el valor de la sensibilidad y la 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 que tiene mesotelioma o que no tiene mesotelioma. "Sensibilidad" indica el rendimiento del biomarcador o biomarcadores con respecto a la clasificación correcta de los individuos que tienen mesotelioma. "Especificidad" indica el rendimiento del biomarcador o biomarcadores con respecto a la clasificación correcta de los individuos que no tienen mesotelioma. Por ejemplo, una especificidad del 85 % y una sensibilidad del 90 % para un panel de marcadores utilizados para analizar un conjunto de muestras de control y muestras de mesotelioma indica que el 85 % de las muestras de control se clasificaron correctamente como muestras de control en el panel y el 90 % de las muestras de mesotelioma se clasificaron correctamente como muestras de mesotelioma en el panel. El valor mínimo deseado o preferente puede determinarse como se describe en el Ejemplo 3. Los paneles representativos se exponen en las Tablas 4-11, en las que se expone 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, el mesotelioma se detecta o diagnostica en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno al menos a uno de los biomarcadores CDH1, BMPER o F9 y al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la lista de biomarcadores de la Tabla 1, en la que N es igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9. En un aspecto adicional, el mesotelioma se detecta o diagnostica en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno a los biomarcadores CDH1, BMPER o F9 y uno de al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la lista de biomarcadores de la Tabla 1, en la que N es igual a 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7. En un aspecto adicional, el mesotelioma se detecta o diagnostica en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno al biomarcador CDH1 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, el mesotelioma se detecta o diagnostica en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno al biomarcador BMPER 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, el mesotelioma se detecta o diagnostica en un individuo realizando un ensayo en una muestra biológica del individuo y detectando valores de biomarcadores que corresponden cada uno al biomarcador F9 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 mesotelioma 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 mesotelioma de manera efectiva. 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 el mesotelioma también pueden incluir biomarcadores que no se encuentran en la Tabla 1 y que la inclusión de biomarcadores adicionales que no se encuentran en la Tabla 1 puede reducir el número de biomarcadores en el subconjunto o panel específico que se selecciona de la Tabla 1. El número de biomarcadores de la Tabla 1 utilizado en un subconjunto o panel también puede reducirse si se usa información biomédica adicional junto con los valores de biomarcadores para establecer valores aceptables de sensibilidad y especificidad para un ensayo dado.

Otro factor que puede afectar a la cantidad de biomarcadores que se utilizarán en un subconjunto o panel de biomarcadores es el procedimiento utilizado para obtener muestras biológicas de individuos a los que se está diagnosticando mesotelioma. En un entorno de obtención de muestras cuidadosamente controlado, la cantidad de biomarcadores necesarios para alcanzar los valores deseados de sensibilidad y especificidad será menor que en una situación en la que puede haber más variación en la recolección, manipulación y almacenamiento de muestras. Al desarrollar la lista de biomarcadores expuesta en la Tabla 1, se utilizaron múltiples sitios de recolección de muestras para recopilar datos para el entrenamiento del clasificador. Esto proporciona biomarcadores más robustos que son menos sensibles a las variaciones en la recolección, manipulación y almacenamiento de muestras, pero también puede requerir que el número de biomarcadores en un subconjunto o panel sea mayor que si todos los datos de entrenamiento se obtuvieron en condiciones muy similares.

Un aspecto de la presente solicitud se puede describir generalmente con referencia a las Figuras 1A y 1B. Se obtiene una muestra biológica de un individuo o individuos de interés. A continuación, la muestra biológica se analiza 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 (a los que se hace referencia en la Figura 1B como marcador de RFU). Una vez que se ha detectado un biomarcador y se le ha asignado un valor de biomarcador, cada marcador se puntúa o clasifica como se describe con detalle en el presente documento. Las puntuaciones del marcador se combinan después para proporcionar una puntuación diagnóstica total, que indica la probabilidad de que el individuo del que se obtuvo la muestra tenga mesotelioma.

"Muestra biológica", "muestra" y "muestra de ensayo" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a cualquier material, fluido biológico, tejido o célula obtenidos o derivados de otro modo de un individuo. Esto incluye sangre (incluyendo sangre entera, leucocitos, células mononucleares de sangre periférica, capa leucocitaria, plasma y suero), esputo, lágrimas, moco, lavados nasales, aspirado nasal, aliento, orina, semen, saliva, lavados peritoneales, ascitis, líquido cístico, fluido meníngeo, líquido amniótico, fluido glandular, fluido pancreático, linfa, líquido pleural, fluido citológico, aspirado de pezón, aspirado bronquial, raspado bronquial, líquido sinovial, aspirado articular, secreciones orgánicas, células, un extracto celular y líquido cefalorraquídeo. Esto también incluye fracciones separadas experimentalmente de todo lo anterior. Por ejemplo, una muestra de sangre puede fraccionarse en suero, plasma o en fracciones que contengan tipos concretos 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 de tejido y de fluido. La expresión "muestra biológica" también incluye materiales que contienen material sólido homogeneizado, tal como de una muestra de heces, una muestra de tejido o una biopsia de tejido, por ejemplo. La expresión "muestra biológica" también incluye materiales derivados de un cultivo tisular o un cultivo celular. Se puede emplear cualquier procedimiento adecuado para obtener una muestra biológica; procedimientos de ejemplo incluyen, por ejemplo, flebotomía, hisopo (por ejemplo, hisopo bucal) y un procedimiento de biopsia de aspiración con aguja fina. Los tejidos de ejemplo susceptibles a la

aspiración con aguja fina incluyen ganglios linfáticos, pulmón, lavados pulmonares, LBA (lavado broncoalveolar), pleura, tiroides, mama, páncreas e hígado. Las muestras también se pueden recoger, por ejemplo, mediante microdissección (por ejemplo, microdissección por captura láser (MCL) o microdissección con láser (MDL)), lavado vesical, frotis (por ejemplo, un frotis PAP) o lavado ductal. Una "muestra biológica" obtenida o derivada de un individuo incluye cualquier muestra que se haya procesado de cualquier manera adecuada después de su obtención del individuo.

Además, se debe tener en cuenta que una muestra biológica se puede obtener tomando muestras biológicas de un número de individuos y combinándolas o combinando una alícuota de la muestra biológica de cada individuo. La muestra combinada se puede tratar como una muestra de un solo individuo y, si se establece la presencia de cáncer en la muestra combinada, cada muestra biológica individual puede volver a analizarse para determinar qué individuo o individuos tiene mesotelioma.

Para los fines de la presente memoria descriptiva, se pretende que la frase "datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo" signifique que los datos en alguna forma derivaron o se generaron utilizando la muestra biológica del individuo. Los datos pueden haberse reformateado, revisado o alterado matemáticamente hasta cierto punto después de haber sido generados, tal como mediante la conversión desde unas unidades en un sistema de medición a unidades en otro sistema de medición; pero, se entiende que los datos se han obtenido a partir de la muestra biológica o se han generado usando la muestra biológica.

"Diana", "molécula diana" y "analito" se usan de forma intercambiable en el presente documento para hacer referencia a cualquier molécula de interés que pueda estar presente en una muestra biológica. Una "molécula de interés" incluye cualquier variación menor de una molécula en particular, tales 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 mediante conjugación con un componente de marcaje, que no altera sustancialmente la de 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" hacen referencia a más de uno de dichos conjuntos de moléculas. Las moléculas diana de ejemplo incluyen proteínas, polipéptidos, ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, polisacáridos, glucoproteínas, hormonas, receptores, antígenos, anticuerpos, autoanticuerpos, aficuerpos, miméticos de anticuerpos, virus, patógenos, sustancias tóxicas, sustratos, metabolitos, análogos del estado de transición, cofactores, inhibidores, fármacos, colorantes, nutrientes, factores de crecimiento, células, tejidos y cualquier fragmento o porción de cualquiera de los anteriores.

Como se usa en el presente documento, "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por no aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácido que se ha modificado de forma natural o por intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como mediante conjugación con un componente de marcaje. También se incluyen dentro de la definición, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (que incluyen, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los polipéptidos pueden ser cadenas simples o cadenas asociadas. También se incluyen dentro de 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 de proteínas con modificaciones de aminoácidos, deleciones o sustituciones; fracciones digeridas; y modificaciones postraduccionales, tales como glicosilación, acetilación, fosforilación y similares.

Como se usa en el presente documento, "marcador" y "biomarcador" se usan de forma intercambiable para hacer referencia a una molécula diana que indica o es un signo de un proceso normal o anormal 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, ya sea normal o anormal y, si es anormal, ya sea crónico o agudo. Los biomarcadores son detectables y se pueden medir mediante diversos procedimientos que incluyen análisis de laboratorio e imágenes médicas. Cuando un biomarcador es una proteína, también es posible usar la expresión del gen correspondiente como una medida indirecta 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 hacer referencia a una medición que se realiza usando cualquier procedimiento analítico para detectar el biomarcador en una muestra biológica y que indica la presencia, ausencia, cantidad o concentración absoluta, cantidad o concentración relativa, 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 los componentes del procedimiento analítico en particular empleado para detectar el biomarcador.

Quando un biomarcador indica o es un signo de un proceso anormal o una enfermedad u otra afección en un individuo, dicho biomarcador generalmente se describe como sobreexpresado o subexpresado en comparación con un nivel de expresión o valor del biomarcador que indica o es un signo de un proceso normal o una ausencia de una enfermedad u otra afección en un individuo. "Regulación por aumento", "regulado por aumento", "sobreexpresión", "sobreexpresado" y cualquier variación de los mismos se utilizan indistintamente para hacer referencia 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 normalmente se detecta en muestras biológicas similares de individuos sanos o normales. Los términos también pueden hacer referencia 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 en particular.

"Regulación por disminución", "regulado por disminución", "subexpresión", "subexpresado" y cualquier variación de los mismos se utilizan indistintamente para hacer referencia 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 normalmente se detecta en muestras biológicas similares de individuos sanos o normales. Los términos también pueden hacer referencia 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 en particular.

Además, un biomarcador que está sobreexpresado o subexpresado también se puede decir que "se expresa de forma diferencial" o que tiene un "nivel diferencial" o "valor diferencial" en comparación con un nivel de expresión o valor del biomarcador "normal" que indica o es un signo de un proceso normal o una ausencia de una enfermedad u otra afección en un individuo. Por tanto, la "expresión diferencial" de un biomarcador también se puede denominar como una variación desde un nivel de expresión "normal" del biomarcador.

El término "expresión génica diferencial" y "expresión diferencial" se usan indistintamente para hacer referencia a un gen (o su correspondiente producto de expresión proteica) cuya expresión se activa a 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. Los términos también incluyen genes (o los productos de expresión de proteínas correspondientes) cuya expresión se activa a un nivel mayor o menor en diferentes estadios de la misma enfermedad. También se entiende que un gen expresado diferencialmente puede ser activado o inhibido a nivel de ácido nucleico o a nivel de proteína, o puede estar sujeto a corte y empalme alternativo para dar como resultado un producto polipeptídico diferente. Tales diferencias se pueden poner de manifiesto mediante diversos cambios, que incluyen los niveles de ARNm, la expresión en superficie, la secreción u otro reparto de un polipéptido. La expresión génica diferencial puede incluir una comparación de la 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 del mismo gen procesados de manera diferente, que difieren entre sujetos normales y sujetos que padecen una enfermedad; o entre varios 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 o sus productos de expresión entre, por ejemplo, células normales y enfermas, o entre células que han sufrido 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 un no mamífero. En diversas realizaciones, el individuo es un mamífero. Un individuo mamífero puede ser un ser humano o no humano. En diversas realizaciones, el individuo es un ser humano. Un individuo sano o normal es un individuo en el que la enfermedad o afección de interés (que incluye, por ejemplo, enfermedades del mesotelio pleural y peritoneal, enfermedades asociadas a anomalías pleurales u otras afecciones de anomalía pleural) no es detectable mediante procedimientos de diagnóstico convencionales.

"Diagnosticar", "diagnosticando", "diagnóstico" y sus variaciones se refieren a la detección, determinación o reconocimiento de un estado o condición de salud de un individuo sobre la base de uno o más signos, síntomas, datos u otra información pertinente a ese individuo. El estado de salud de un individuo puede diagnosticarse como sano / normal (es decir, un diagnóstico de la ausencia de una enfermedad o afección) o diagnosticarse como enfermo / anormal (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 en particular, la detección inicial de la enfermedad; la caracterización o clasificación de la enfermedad; la detección de la progresión, remisión o recurrencia de la enfermedad; y la detección de la respuesta de la enfermedad después de la administración al individuo de un tratamiento o terapia. El diagnóstico de mesotelioma incluye distinguir individuos que tienen cáncer de individuos que no lo tienen. Además, incluye distinguir a las personas expuestas al amianto del mesotelioma.

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

“Evaluar”, “evaluando”, “evaluación” y sus variaciones abarcan tanto “diagnosticar” como “pronosticar” y también abarcar determinaciones o predicciones sobre el curso futuro de una enfermedad o afección en un individuo que no padece la enfermedad, así como determinaciones o predicciones con respecto a la probabilidad de que una enfermedad o afección recurra en un individuo que aparentemente se ha curado de la enfermedad. El término “evaluar” también abarca la evaluación de la respuesta de un individuo a una terapia, tales como, por ejemplo, predecir si es probable que un individuo responda favorablemente a un agente terapéutico o si es poco probable que responda a un agente terapéutico (o experimentará toxicidad u otros efectos secundarios indeseables, por ejemplo), seleccionar un agente terapéutico para la administración a un individuo o controlar o determinar la respuesta de un individuo a una terapia que se ha administrado al individuo. Por tanto, “evaluar” el mesotelioma puede incluir, por ejemplo, cualquiera de los siguientes: pronosticar el curso futuro del mesotelioma en un individuo; predecir la recurrencia de mesotelioma en un individuo que aparentemente ha sido curado del mesotelioma; o determinar o predecir la respuesta de un individuo a un tratamiento de mesotelioma o seleccionar un tratamiento de mesotelioma para administrar a un individuo basándose en una determinación de los valores de biomarcador derivados de la muestra biológica del individuo.

Cualquiera de los siguientes ejemplos puede denominarse “diagnóstico” o “evaluación” de mesotelioma: detección inicial de la presencia o ausencia de mesotelioma; determinación de un estadio, tipo o subtipo específico u otra clasificación o característica de mesotelioma; determinación de si una posible anomalía pleural es mesotelioma benigno o maligno; o detección / controla de la progresión del mesotelioma (por ejemplo, control del crecimiento tumoral o la diseminación metastásica), remisión o recurrencia.

Como se usa en el presente documento, “información biomédica adicional” se refiere a una o más evaluaciones de un individuo, distintas de usar cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento, que están asociadas con el riesgo de cáncer o, más específicamente, con el riesgo de mesotelioma. Información biomédica adicional” incluye cualquiera de los siguientes: descriptores físicos de un individuo, incluyendo una anomalía o derrame peritoneal o pleural observados mediante cualquiera de tomografía computarizada (TC) helicoidal multicorte (multidetector) con contraste y reconstrucción tridimensional, radiografía de tórax, PET, ecografía, formación de imágenes mediante resonancia magnética (IRM); antecedentes de exposición al amianto; mediciones espirométricas; la altura y / o peso de un individuo; variaciones en el peso; la etnia de un individuo; los antecedentes ocupacionales; antecedentes familiares de mesotelioma (u otro tipo de cáncer); la presencia de uno o más marcadores genéticos que se correlacionan con un mayor riesgo de mesotelioma (u otro tipo de cáncer) en el individuo o en un miembro de la familia; la presencia o ausencia de una anomalía pleural; el tamaño de la anomalía pleural; la localización de la anomalía pleural; la morfología de la anomalía pleural y la región de la anomalía pleural asociada (por ejemplo, como se observa mediante la obtención de imágenes); síntomas clínicos, tales como disnea, dolor en el pecho, masas palpables en la pared torácica, derrame pleural, escoliosis hacia el lado de la neoplasia maligna, pérdida de peso; valores de expresión génica; descriptores físicos de un individuo, incluidos los descriptores físicos observados mediante imágenes radiológicas; la altura y / o peso de un individuo; el sexo de un individuo; la etnia de un individuo; el historial de tabaquismo; los antecedentes ocupacionales; la exposición a carcinógenos conocidos (por ejemplo, la exposición a cualquiera de amianto, gas radón, sustancias químicas, humo de incendios y contaminación del aire, que puede incluir emisiones de fuentes inmóviles o móviles, tales como emisiones industriales / de fábrica o automotrices / marinas/aeronaves); exposición al humo de segunda mano; y antecedentes familiares de mesotelioma u otro tipo de cáncer. El análisis de los niveles de biomarcadores en combinación con una evaluación de cualquier información biomédica adicional, incluyendo otras pruebas de laboratorio (por ejemplo, la concentración de mesotelina, del péptido soluble relacionado con la mesotelina o la osteopontina), puede, por ejemplo, mejorar la sensibilidad, la especificidad y / o el AUC para detectar el mesotelioma (u otros usos relacionados con el mesotelioma) en comparación con la prueba de biomarcadores de forma individual o la evaluación de cualquier artículo concreto de información biomédica adicional solo (por ejemplo, imágenes de ultrasonidos de forma individual). Se puede obtener información biomédica adicional de un individuo usando técnicas rutinarias conocidas en la materia, tales como los propios individuos mediante el uso de un cuestionario de rutina para el paciente o un cuestionario del historial de salud, etc., o de un médico, etc. El análisis de los niveles de biomarcadores en combinación con una evaluación de cualquier información biomédica adicional puede, por ejemplo, mejorar la sensibilidad, la especificidad y / o el AUC para detectar el mesotelioma (u otros usos relacionados con el mesotelioma) en comparación con la prueba de biomarcadores de forma individual o la evaluación de cualquier artículo concreto de información biomédica adicional solo (por ejemplo, imágenes de TC de forma individual).

El término “área bajo la curva” o “AUC” se refiere al área bajo la curva de una curva de la característica operativa del receptor (ROC), ambos conocidos bien en la materia. Las medidas de la AUC son útiles para comparar la precisión de un clasificador en todo el intervalo de datos. Los clasificadores con una AUC mayor tienen una mayor capacidad para clasificar correctamente las incógnitas entre dos grupos de interés (por ejemplo, muestras de mesotelioma y muestras normales o de control). Las curvas ROC son útiles para representar el rendimiento de una característica en particular (por ejemplo, cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento y / o cualquier artículo de información biomédica adicional) para distinguir entre dos poblaciones (por ejemplo, casos que tienen mesotelioma y controles sin mesotelioma). Normalmente, los datos de características en toda la población (por ejemplo, casos y controles) se ordenan en orden ascendente según el valor de una característica única. Después, para cada valor para esa característica, se calculan las tasas de verdaderos positivos y falsos positivos para los

datos. La tasa de verdaderos positivos se determina contando el número de casos por encima del valor de esa característica y, a continuación, dividiendo por el número total de casos. La tasa de falsos positivos se determina contando el número de controles por encima del valor de esa característica y, a continuación, dividiendo por el número total de controles. Aunque esta definición se refiere a escenarios en los que una característica es elevada en los casos comparados con controles, esta definición también se aplica a escenarios en los que una característica es menor en los casos en comparación con los controles (en ese escenario, se contarían las muestras por debajo del valor de esa característica). Las curvas ROC se pueden generar para una única característica, así como para otras salidas individuales, por ejemplo, una combinación de dos o más características se puede combinar matemáticamente (por ejemplo, sumar, restar, multiplicar, etc.) para proporcionar un valor de suma única, y este valor de suma única se puede representar en una curva ROC. Adicionalmente, cualquier combinación de características múltiples, en la cual la combinación derive un único valor de salida, se puede representar en una curva ROC. Estas combinaciones de características pueden comprender una prueba. La curva ROC es la gráfica de la tasa de verdaderos positivos (sensibilidad) de una prueba contra la tasa de falsos positivos (1-especificidad) de la prueba.

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 el material o materiales requeridos para generar esa señal. En diversas realizaciones, el valor del biomarcador se detecta usando cualquier procedimiento adecuado, incluyendo fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia de plasmón superficial, ondas acústicas superficiales, espectrometría de masas, espectroscopia de infrarrojos, espectroscopia Raman, microscopia de fuerza atómica, microscopia de efecto túnel de exploración, procedimientos 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 las moléculas puedan unirse, directa o indirectamente, a través de enlaces covalentes o no covalentes. Un "soporte sólido" puede tener diversos formatos físicos, que pueden incluir, por ejemplo, una membrana; un chip (un chip de proteína); un portaobjetos (por ejemplo, un portaobjetos o un cubreobjetos de vidrio); una columna; una partícula hueca, sólida, semisólida, que contiene poros o cavidades, tales 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 de ejemplo incluyen pocillos para muestras, tubos, capilares, viales y cualquier otro recipiente, ranura o hendidura que puede contener una muestra. Un receptáculo de muestras puede estar contenido en una plataforma de múltiples muestras, tal como una placa de microtitulación, un portaobjetos, un dispositivo microfluídico y similares. Un soporte puede estar compuesto por un material natural o sintético, un material orgánico o inorgánico. La composición del soporte sólido al cual se fijan los reactivos de captura generalmente depende del procedimiento de fijación (por ejemplo, unión covalente). Otros receptáculos a modo de ejemplo incluyen microgotas y emulsiones acuosas / oleosas controladas en microfluidos o en volumen dentro de las cuales pueden producirse ensayos y manipulaciones relacionadas. Los soportes sólidos adecuados incluyen, por ejemplo, plásticos, resinas, polisacáridos, sílice o materiales basados en sílice, vidrio funcionalizado, silicona modificada, carbono, metales, vidrios inorgánicos, membranas, nailon, fibras naturales (tales como, por ejemplo, seda, lana y algodón), polímeros y similares. El material que compone el soporte sólido puede incluir grupos reactivos tales como, por ejemplo, grupos carboxi, amino o hidroxilo, que se usan para la 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 estirenobutadieno, caucho natural, polietileno, polipropileno, (poli)tetrafluoroetileno, fluoruro de (poli)vinilideno, policarbonato y polimetilpenteno. Las partículas de soporte sólido adecuadas que se pueden usar incluyen, por ejemplo, partículas codificadas, tales como partículas codificadas de tipo Luminex, partículas magnéticas y partículas de vidrio.

Ejemplos de usos de biomarcadores

En varias realizaciones de ejemplo se proporcionan procedimientos para diagnosticar mesotelioma en un individuo mediante la detección de 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, mediante cualquier número de procedimientos analíticos, incluido cualquiera de los procedimientos analíticos descritos en el presente documento. Estos biomarcadores, por ejemplo, expresan diferencialmente en individuos con mesotelioma en comparación con los individuos sin mesotelioma. La detección de la expresión diferencial de un biomarcador en un individuo puede usarse, por ejemplo, para permitir el diagnóstico precoz del mesotelioma, para distinguir entre una masa benigna y maligna (tal como, por ejemplo, una masa observada en una tomografía computarizada (CT), radiografía de tórax, resonancia magnética o ecografía), para controlar la recurrencia del mesotelioma o para el diagnóstico diferencial de otras afecciones clínicas, tales como los individuos expuestos al amianto.

Cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento se puede usar en diversas indicaciones clínicas para mesotelioma, incluidas cualquiera de las siguientes: detección de mesotelioma (tal como en un individuo o población de alto riesgo); caracterizar el mesotelioma (por ejemplo, determinar el tipo de mesotelioma, el subtipo o el estadio), tal como distinguir entre mesotelioma e individuos expuestos al amianto y / o entre mesotelioma y adenocarcinoma y otros tipos de células malignas (o facilitar de otro modo la histopatología);

determinar si una anomalía o masa pleural es benigna o maligna; determinar el pronóstico del mesotelioma; vigilar la progresión o la remisión del mesotelioma; vigilar la recurrencia del mesotelioma; vigilar la metástasis; selección de tratamiento; vigilar la respuesta a un agente terapéutico u otro tratamiento; estratificación de individuos para TC de tórax (por ejemplo, identificación de los individuos con mayor riesgo de mesotelioma y, por lo tanto, con mayor probabilidad de beneficiarse de la exploración radiológica, aumentando así el valor predictivo positivo de la TC de tórax); combinar pruebas de biomarcadores con información biomédica adicional, tal como el historial de exposición al amianto, la presencia de uno o más marcadores genéticos que indique un mayor riesgo de mesotelioma, etc., o con el tamaño de la masa, la morfología, la presencia de derrame, etc. (tal como proporcionar un ensayo con mayor rendimiento de diagnóstico en comparación con otras pruebas de laboratorio o con el tamaño de la masa, la morfología, etc.); facilitar el diagnóstico de una anomalía pleural maligna o benigna; facilitar la toma de decisiones clínicas una vez que se observa una anomalía pleural en las pruebas de TC, IRM, PET o US (por ejemplo, solicitar repeticiones de radiografías si la anomalía pleural se considera de bajo riesgo, tal como si una prueba basada en biomarcadores es negativa, o considerar la biopsia si la anomalía pleural se considera de riesgo medio a alto, tal como si la prueba basada en biomarcadores es positiva, con o sin clasificación de la anomalía pleural o extensión de la invasión tisular); y facilitar las decisiones con respecto al seguimiento clínico (por ejemplo, si se deben realizar varias exploraciones de imagen radiológicas, biopsia con aguja fina, radiación, terapia sistémica o cirugía después de observar una anomalía pleural en las imágenes). Las pruebas de biomarcadores pueden mejorar el valor predictivo positivo (VPP) sobre la TC o la detección por radiografía torácica en individuos de alto riesgo solo. Además de sus utilidades junto con la detección selectiva por TC, los biomarcadores descritos en el presente documento también se pueden usar junto con cualquier otra modalidad de imagen utilizada para el mesotelioma, tal como radiografía de tórax, RM o PET. Adicionalmente, los biomarcadores descritos también pueden ser útiles para permitir algunos de estos usos antes de que se detecten las indicaciones de mesotelioma mediante modalidades de imagen u otros correlatos clínicos, o antes de que aparezcan los síntomas. Además, incluye distinguir a los individuos expuestos al amianto del mesotelioma.

Como ejemplo de la forma en que cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento puede usarse para diagnosticar mesotelioma, la expresión diferencial de uno o más de los biomarcadores descritos en un individuo que no se sabe que tiene mesotelioma puede indicar que el individuo tiene mesotelioma, permitiendo de este modo la detección de mesotelioma en un estadio temprano de la enfermedad cuando el tratamiento es más eficaz, tal vez antes de que el mesotelioma se detecte por otros medios o antes de que aparezcan los síntomas. La sobreexpresión de uno o más de los biomarcadores durante la evolución del mesotelioma puede ser indicativa de progresión del mesotelioma, por ejemplo, un tumor de mesotelioma está creciendo y / o produciendo metástasis (y, por lo tanto, indica un mal pronóstico), mientras que una disminución en el grado al que uno o más de los biomarcadores se expresa diferencialmente (es decir, en pruebas de biomarcadores posteriores, el nivel de expresión en el individuo se mueve o se acerca al nivel de expresión "normal") puede ser indicativo de remisión del mesotelioma, por ejemplo, un tumor de mesotelioma se está reduciendo (y así indicar un pronóstico bueno o mejor). De manera similar, un aumento en el grado en que uno o más de los biomarcadores se expresan diferencialmente (es decir, en pruebas de biomarcadores posteriores, el nivel de expresión en el individuo se aleja de un nivel de expresión "normal") durante el curso del tratamiento del mesotelioma puede indicar que el mesotelioma está progresando y, por lo tanto, indicar que el tratamiento es ineficaz, mientras que una disminución en la expresión diferencial de uno o más de los biomarcadores durante el curso del tratamiento del mesotelioma puede ser indicativa de remisión del mesotelioma y, por lo tanto, indica que el tratamiento está funcionando con éxito. Adicionalmente, un aumento o disminución de la expresión diferencial de uno o más de los biomarcadores después de que un individuo se haya curado aparentemente del mesotelioma puede ser indicativo de recurrencia de mesotelioma. 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 la dosis, si el individuo ha mantenido la terapia) en un estadio anterior a si la recurrencia del mesotelioma no se detectó hasta más tarde. Adicionalmente, 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 en particular. En la monitorización de la recurrencia o progresión del mesotelioma, los cambios en los niveles de expresión de biomarcadores pueden indicar la necesidad de repetir las imágenes, tal como para determinar la actividad del mesotelioma o 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 del tratamiento del mesotelioma o a la vez que el mismo, tal como para evaluar el éxito del tratamiento o controlar la remisión, recurrencia y / o progresión del mesotelioma (incluyendo la metástasis) después del tratamiento. El tratamiento del mesotelioma 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 mesotelioma o la extirpación del mesotelioma y el tejido circundante), la administración de radioterapia o cualquier otro tipo de tratamiento del mesotelioma utilizado en la técnica, y cualquier combinación de estos tratamientos. 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 en el tiempo pueden ser indicativos de progresión, remisión o recurrencia del mesotelioma, ejemplos de los cuales incluyen cualquiera de los siguientes: un aumento o disminución 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 disminución en el nivel de expresión del biomarcador en un punto de tiempo posterior

después del tratamiento en comparación con el nivel de expresión del biomarcador en un punto de tiempo anterior después del tratamiento; y un nivel de expresión diferencial del biomarcador en un único punto de tiempo después del tratamiento en comparación con los niveles normales del biomarcador.

- 5 Como ejemplo específico, los niveles de biomarcadores para cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento pueden determinarse en muestras de suero o plasma previas a la cirugía y después de la cirugía (por ejemplo, 2-16 semanas después de la cirugía). Un aumento en los niveles de expresión de biomarcadores en la muestra postoperatoria en comparación con la muestra previa a la cirugía puede indicar progresión del mesotelioma (por ejemplo, cirugía fallida), mientras que una disminución en los niveles de expresión
- 10 de los biomarcadores en la muestra postoperatoria en comparación con la muestra previa a la cirugía puede indicar una regresión del mesotelioma (por ejemplo, la cirugía eliminó con éxito el tumor del mesotelio). Se pueden llevar 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 la administración de un agente terapéutico o vacuna contra el cáncer.
- 15 Además de evaluar los niveles de biomarcadores como una prueba de diagnóstico independiente, los niveles de biomarcadores también pueden evaluarse junto con la determinación de SNP u otras lesiones genéticas o variabilidad que son indicativas de un mayor riesgo de susceptibilidad de la enfermedad. (Véase, por ejemplo, Amos et al., Nature Genetics 40, 616-622 (2009)).
- 20 Además de evaluar los niveles de biomarcadores como una prueba de diagnóstico independiente, los niveles de biomarcadores también se pueden evaluar junto con exploración radiológica. Además de evaluar los niveles de biomarcadores como una prueba de diagnóstico independiente, los niveles de biomarcadores también se pueden evaluar junto con síntomas relevantes o pruebas genéticas. La detección de cualquiera de los biomarcadores descritos en el presente documento puede ser útil después de que se haya observado una anomalía o masa pleural
- 25 a través de imágenes para ayudar en el diagnóstico de mesotelioma y guiar la atención clínica apropiada del individuo, incluida la atención de un especialista quirúrgico apropiado o mediante terapia paliativa en el paciente irreseccable. Además de evaluar los niveles de biomarcadores junto con síntomas relevantes o factores de riesgo, la información con respecto a los biomarcadores también se puede evaluar junto con otros tipos de datos, particularmente datos que indican el riesgo de un individuo de sufrir mesotelioma (por ejemplo, historial clínico del
- 30 paciente, exposición ocupacional, síntomas, antecedentes familiares de mesotelioma, antecedentes de exposición al amianto, tabaquismo, factores de riesgo tales como la presencia de uno o más marcadores genéticos y / o el estado de otros biomarcadores, etc.). Estos diversos datos pueden evaluarse mediante procedimientos automáticos, tal como un programa / software informático, que pueden incorporarse en un ordenador u otro aparato / dispositivo.
- 35 Además de evaluar los niveles de biomarcadores junto con la exploración radiológica en individuos de alto riesgo (por ejemplo, evaluar los niveles de biomarcadores junto con el tamaño u otras características de una anomalía o masa pleural observada en una exploración por imágenes), la información con respecto a los biomarcadores también se puede evaluar junto con otros tipos de datos, particularmente datos que indican el riesgo de un individuo de sufrir mesotelioma (por ejemplo, historial clínico del paciente, antecedentes de exposición ocupacional, síntomas,
- 40 antecedentes familiares de cáncer, factores de riesgo tales como si el individuo estuvo expuesto o no al amianto y / o el estado de otros biomarcadores, etc.). Estos diversos datos pueden evaluarse mediante procedimientos automáticos, tal como un programa / software informático, que pueden incorporarse en un ordenador u otro aparato / dispositivo.
- 45 Cualquiera de los biomarcadores descritos también se puede usar en pruebas de imagen. Por ejemplo, un agente de formación de imágenes puede acoplarse a cualquiera de los biomarcadores descritos, que pueden utilizarse para ayudar en el diagnóstico de mesotelioma, controlar la progresión / remisión o metástasis de la enfermedad, controlar la recurrencia de la enfermedad o controlar la respuesta al tratamiento, entre otros usos.

50 **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 procedimientos analíticos conocidos. En una realización, se detecta un valor de biomarcador usando un reactivo de captura. Como se usa en el presente documento, un "agente de captura" o "reactivo de
- 55 captura" se refiere a una molécula que es capaz de unirse específicamente a un biomarcador. En diversas realizaciones, el reactivo de captura puede exponerse al biomarcador en solución o puede exponerse al biomarcador mientras el reactivo de captura está inmovilizado en un soporte sólido. En otras realizaciones, el reactivo de captura contiene una característica que reacciona con una característica secundaria en un soporte sólido. En estas realizaciones, el reactivo de captura puede exponerse al biomarcador en solución y, después, la característica del
- 60 reactivo de captura puede usarse junto con la característica secundaria sobre el soporte sólido para inmovilizar el biomarcador sobre el soporte sólido. El reactivo de captura se selecciona según el tipo de análisis que se va a realizar. Los reactivos de captura incluyen, pero sin limitación, aptámeros, anticuerpos, antígenos, adnectinas, anquirina, otros miméticos de anticuerpos y otros armazones de proteínas, autoanticuerpos, quimeras, moléculas pequeñas, un fragmento F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fv monocatenario, un ácido nucleico, una lectina, un receptor de unión a ligando, aficuerpos, nanocuerpos, polímeros impresos, avímeros, peptidomiméticos, un receptor de hormonas, un receptor de citocinas y receptores sintéticos, y
- 65

modificaciones y fragmentos de estos.

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

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

- 10 En algunas realizaciones, el valor del biomarcador se detecta directamente a partir del biomarcador en una muestra biológica.

- 15 En una realización, los biomarcadores se detectan usando un formato multiplexado que permite la detección simultánea de dos o más biomarcadores en una muestra biológica. En una realización del formato multiplexado, los reactivos de captura se inmovilizan, directa o indirectamente, de forma covalente o no covalente, en ubicaciones discretas sobre un soporte sólido. En otra realización, un formato multiplexado usa soportes sólidos discretos en el que cada soporte 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. Los dispositivos individuales se pueden configurar para permitir que cada biomarcador en la muestra biológica se procese simultáneamente. Por ejemplo, se puede usar una
20 placa de microtitulación de manera que cada pocillo en la placa se use para analizar de manera única uno de múltiples biomarcadores que se detectarán en una muestra biológica.

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

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

- 40 La fluorescencia se puede medir con diversos instrumentos compatibles con una amplia gama de formatos de ensayo. Por ejemplo, los espectrofluorímetros se han diseñado para analizar placas de microtitulación, portaobjetos de microscopio, matrices impresas, cubetas, etc. Véase *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, de J. R. Lakowicz, Springer Science + Business Media, Inc., 2004. Véase *Bioluminescence & Chemiluminescence: Progress & Current Applications*; Philip E. Stanley y Larry J. Kricka editors, World Scientific Publishing Company, enero de 2002.

- 45 En una o más de las realizaciones anteriores, opcionalmente, se puede usar un marcador de quimioluminiscencia para marcar un componente del complejo biomarcador / reactivo de captura para permitir la detección del valor del biomarcador. Los materiales quimioluminiscentes adecuados incluyen cualquiera de cloruro de oxalilo, rodamina 6G, $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$, TMAE (tetrakis(dimetilamino)etileno), pirogalol (1,2,3-trihidroxibenceno), lucigenina, peroxioxalatos, oxalatos de arilo, ésteres de acridinio, dioxetanos y otros.

- 50 En otras realizaciones más, el procedimiento de detección incluye una combinación de enzima / sustrato que genera una señal detectable que corresponde al valor del biomarcador. Generalmente, la enzima cataliza una alteración química del sustrato cromogénico que se puede medir 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.

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

- 65 Más específicamente, los valores de biomarcadores para los biomarcadores descritos en el presente documento pueden detectarse utilizando procedimientos analíticos conocidos, incluidos ensayos de aptámeros unplexados,

ensayos de aptámeros multiplexados, inmunoensayos multiplexados o uniplexados, perfiles de expresión de ARNm, perfiles de expresión de miARN, análisis de espectrometría de masas, procedimientos histológicos / citológicos, etc. como se detalla a continuación.

5 Determinación de valores de biomarcadores utilizando ensayos basados en aptámeros

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 en el campo del cuidado de la salud. Una clase de tales ensayos implica el uso de una micromatriz que incluye uno o más aptámeros inmovilizados sobre un soporte sólido. Los aptámeros son capaces de unirse a una molécula diana de una manera altamente específica y con una afinidad muy alta. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.475.096 titulada "Ligando de ácido nucleico"; véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.242.246, la patente de Estados Unidos n.º 6.458.543 y la patente de Estados Unidos n.º 6.503.715, cada una de las cuales se titula "Biochip diagnóstico con ligando de ácido nucleico". Una vez que la micromatriz se pone en contacto con una muestra, los aptámeros se unen a sus moléculas diana respectivas presentes en la muestra y, de ese modo, permiten la determinación de un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador.

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 generalmente con un grado de afinidad mucho más alto que con el que se une a otros componentes en una muestra de prueba. Un "aptámero" es un conjunto de copias de un tipo o especie de molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos en particular. Un aptámero puede incluir cualquier número adecuado de nucleótidos, incluyendo cualquier número de nucleótidos químicamente modificados. "Aptámeros" se refiere a más de un conjunto de moléculas de este tipo. Diferentes aptámeros pueden tener el mismo número o un número diferente de nucleótidos. Los aptámeros pueden ser ADN o ARN o ácidos nucleicos modificados químicamente y pueden ser monocatenarios, bicatenarios o contener regiones bicatenarias, y pueden incluir estructuras superiores ordenadas. Un aptámero también puede ser un fotoaptámero, en el que un grupo funcional fotoreactivo o químicamente reactivo se incluye en el aptámero para permitir que se una covalentemente a su diana correspondiente. Cualquiera de los procedimientos del aptámero divulgados en el presente documento puede incluir el uso de dos o más aptámeros que se unen específicamente a la misma molécula diana. Como se describe con más detalle 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 cada uno de los diferentes aptámeros incluye un marcador, estos diferentes aptámeros pueden tener el mismo marcador o un marcador diferente.

Un aptámero puede identificarse utilizando cualquier procedimiento conocido, incluido el proceso SELEX. Una vez identificado, un aptámero puede prepararse o sintetizarse de acuerdo con cualquier procedimiento conocido, incluidos los procedimientos de síntesis química y los procedimientos de síntesis enzimática.

Como se usa en el presente documento, un aptámero modificado SOMAmer o de velocidad de disociación lenta se refiere a un aptámero que tiene características mejoradas de velocidad de disociación. Los SOMAmer se pueden generar utilizando los procedimientos SELEX mejorados descritos en la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0004667, titulada "Procedimiento para generar aptámeros con velocidades de disociación mejoradas".

Los términos "SELEX" y "proceso SELEX" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia en general a una combinación de (1) la selección de aptámeros que interaccionan con una molécula diana de una manera deseable, por ejemplo unión con alta afinidad a una proteína, con (2) la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. El proceso SELEX se puede usar para identificar los aptámeros con alta afinidad a una diana o biomarcador específico.

SELEX, generalmente, incluye preparar una mezcla candidata de ácidos nucleicos, la unión de 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 rondas para refinar aún más la afinidad del aptámero seleccionado. El proceso puede incluir etapas de amplificación en uno o más puntos en el proceso. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.475.096, titulada "Ligandos de ácido nucleico". El proceso SELEX puede usarse para generar un aptámero que se una covalentemente a su diana, así como un aptámero que se una no covalentemente a su diana. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.705.337 titulada "Evolución sistemática de ligandos de ácido nucleico mediante enriquecimiento exponencial: Chemi- SELEX".

El proceso SELEX también se puede usar para identificar aptámeros de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas al aptámero, tal como, por ejemplo, estabilidad *in vivo* mejorada o características de liberación mejoradas. Los ejemplos de tales modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de ribosa y / o fosfato y / o base. Los aptámeros identificados con el proceso SELEX que contienen

nucleótidos modificados se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.660.985, titulada "Ligandos de ácido nucleico de alta afinidad que contienen nucleótidos modificados", que describe oligonucleótidos que contienen derivados de nucleótidos químicamente modificados en las posiciones 5' y 2' de las pirimidinas. La patente de Estados Unidos n.º 5.580.737, véase anteriormente, describe aptámeros altamente específicos que contienen uno o
5 más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH₂), 2'-flouro (2'-F) y/o 2'-O-metil (2'-OMe). Véase también, la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2009/0098549, titulada "SELEX y PHOTOSELEX", que describe bibliotecas de ácidos nucleicos que tienen propiedades físicas y químicas expandidas y su uso en SELEX y photoSELEX.

10 SELEX también se puede usar para identificar aptámeros que tienen características de velocidad de disociación deseables. Véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos 2009/0004667, titulada "Procedimiento para generar aptámeros con velocidades de disociación mejoradas", que describe procedimientos SELEX mejorados para generar aptámeros que pueden unirse a moléculas diana. Se describen procedimientos para producir
15 aptámeros y fotoaptámeros que tienen velocidades de disociación más lentas con respecto a sus respectivas moléculas diana. Los procedimientos implican poner en contacto la mezcla candidata con la molécula diana, lo que permite la formación de complejos ácido nucleico-diana y realizar un proceso de enriquecimiento de velocidad de disociación lenta en el que los complejos de ácido nucleico-diana con velocidades de disociación rápidas se disocian y no se vuelven a formar, mientras que los complejos con velocidades de disociación lentas permanecerán intactos. Adicionalmente, los procedimientos incluyen el uso de nucleótidos modificados en la producción de mezclas de
20 ácidos nucleicos candidatas para generar aptámeros con un rendimiento de velocidad de disociación mejorado.

Una variación de este ensayo emplea aptámeros que incluyen grupos funcionales fotorreactivos que permiten a los aptámeros unirse covalentemente o "fotorreticular" sus moléculas diana. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.544.776 titulada "Biochip diagnóstico del ligando de ácido nucleico". Estos aptámeros fotorreactivos
25 también se conocen como fotoaptámeros. Véase, por ejemplo, La patente de Estados Unidos n.º 5.763.177, la patente de Estados Unidos n.º 6.001.577 y la patente de Estados Unidos n.º 6.291.184, cada una de las cuales se titula "Evolución sistemática de ligandos de ácido nucleico mediante enriquecimiento exponencial: fotoselección de ligandos de ácido nucleico y solución SELEX"; véase también, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.458.539, titulada "Fotoselección de ligandos de ácido nucleico". Después de que la micromatriz se pone en
30 contacto con la muestra y los fotoaptámeros han tenido la oportunidad de unirse a sus moléculas diana, los fotoaptámeros se fotoactivan y el soporte sólido se lava para eliminar cualquier molécula no unida específicamente. Se pueden usar condiciones de lavado duras, ya que las moléculas diana que están unidas a los fotoaptámeros generalmente no se eliminan, debido a los enlaces covalentes creados por el grupo o grupos funcionales fotoactivados en los fotoaptámeros. De esta manera, el ensayo permite la detección de un valor de biomarcador
35 correspondiente a un biomarcador en la muestra de prueba.

En ambos de estos formatos de ensayo, los aptámeros se inmovilizan en el soporte sólido antes de ponerse en contacto con la muestra. En ciertas circunstancias, sin embargo, la inmovilización de los aptámeros antes del
40 contacto con la muestra puede no proporcionar un ensayo óptimo. Por ejemplo, la inmovilización previa de los aptámeros puede dar como resultado una mezcla ineficiente de los aptámeros con las moléculas diana en la superficie del soporte sólido, lo que tal vez provoque largos tiempos de reacción y, por lo tanto, períodos de incubación prolongados para permitir la unión eficaz de los aptámeros a sus moléculas diana. Además, cuando se emplean fotoaptámeros en el ensayo y dependiendo del material utilizado como soporte sólido, el soporte sólido puede tender a dispersar o absorber la luz utilizada para efectuar la formación de enlaces covalentes entre los
45 fotoaptámeros y sus moléculas diana. Además, dependiendo del procedimiento empleado, la detección de moléculas diana unidas a sus aptámeros puede estar sujeta a imprecisión, ya que la superficie del soporte sólido también puede exponerse y verse afectada por cualquier agente de marcaje que se use. Finalmente, la inmovilización de los aptámeros en el soporte sólido generalmente implica una etapa de preparación del aptámero (es decir, la inmovilización) antes de la exposición de los aptámeros a la muestra y esta etapa de preparación puede afectar a la
50 actividad o funcionalidad de los aptámeros.

También se han descrito ensayos de aptámeros que permiten a un aptámero capturar su diana en solución y, después, emplear etapas de separación que están diseñadas para eliminar componentes específicos de la mezcla de aptámero y diana antes de la detección (véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos
55 2009/0042206, titulada "Análisis multiplexados de muestras de prueba"). Los procedimientos de ensayo de aptámeros descritos permiten la detección y cuantificación de una diana de ácido no nucleico (por ejemplo, una diana proteica) en una muestra de prueba detectando y cuantificando un ácido nucleico (es decir, un aptámero). Los procedimientos descritos crean un sustituto de ácido nucleico (es decir, el aptámero) para detectar y cuantificar una diana de ácido no nucleico, permitiendo así que la amplia variedad de tecnologías de ácido nucleico, incluida la
60 amplificación, se aplique a una gama más amplia de dianas deseadas, incluidos las dianas proteicas.

Los aptámeros pueden construirse para facilitar la separación de los componentes del ensayo de un complejo de biomarcador aptámero (o complejo covalente de biomarcador fotoaptámero) y permiten el aislamiento del aptámero para su detección y / o cuantificación. En una realización, estas construcciones pueden incluir un elemento escindible o liberable dentro de la secuencia del aptámero. En otras realizaciones, se puede introducir una
65 funcionalidad adicional en el aptámero, por ejemplo, un componente marcado o detectable, un componente

espaciador o un marcador de unión específico o elemento de inmovilización. Por ejemplo, el aptámero puede incluir un marcador conectado al aptámero a través de 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 a un resto de biotina y una sección espaciadora, puede incluir un grupo NHS para la derivatización de aminas y puede usarse para introducir un grupo biotina en un aptámero, permitiendo de ese modo la liberación del aptámero más adelante en un procedimiento de ensayo.

Los ensayos homogéneos, realizados con todos los componentes del ensayo en solución, no requieren la separación de la muestra y los reactivos antes de la detección de la señal. Estos procedimientos son rápidos y fáciles de usar. Estos procedimientos generan señales basadas en un reactivo de unión o de captura molecular que reacciona con su diana específica. Para el mesotelioma, los reactivos de captura molecular serían un aptámero o un anticuerpo o similar y la diana específica sería un biomarcador de mesotelioma de la Tabla 1.

En una realización, un procedimiento para la 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 aumento del peso molecular hace que el movimiento de rotación del fluoróforo unido al complejo sea mucho más lento cambiando el valor de anisotropía. Al monitorizar el cambio de anisotropía, los acontecimientos de unión se pueden usar para medir cuantitativamente los biomarcadores en soluciones. Otros procedimientos incluyen ensayos de polarización de fluorescencia, procedimientos de baliza molecular, inactivación de fluorescencia resuelta en el tiempo, quimioluminiscencia, transferencia de energía de resonancia de fluorescencia y similares.

Un ejemplo de ensayo de aptámeros basado en solución 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 un afinidad específica por el biomarcador, en el que 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) eliminar cualquier componente de la mezcla no asociado con el primer soporte sólido; (d) unir un segundo marcador al componente biomarcador del complejo de afinidad de aptámero; (e) liberar el complejo de afinidad del 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) eliminar cualquier aptámero que no está en complejo de la mezcla mediante reparto del aptámero que no está en complejo del complejo de afinidad de aptámero; (h) eluir el aptámero del soporte sólido; y (i) detectar el biomarcador detectando el componente aptámero del complejo de afinidad del aptámero.

Se puede usar cualquier medio conocido en la técnica para detectar un valor de biomarcador detectando el componente aptámero de un complejo de afinidad de aptámero. Se pueden utilizar varios procedimientos de detección diferentes para detectar el componente aptámero de un complejo de afinidad, tal como, por ejemplo, ensayos de hibridación, espectroscopia de masas o QPCR. En algunas realizaciones, los procedimientos de secuenciación de ácido nucleico pueden usarse para detectar el componente aptámero de un complejo de afinidad de aptámero y detectar de ese modo un valor de biomarcador. Brevemente, una muestra de prueba puede someterse a cualquier tipo de procedimiento de secuenciación de ácido nucleico para identificar y cuantificar la secuencia o secuencias de uno o más aptámeros presentes en la muestra de prueba. En algunas realizaciones, la secuencia incluye la molécula de aptámero completa o cualquier porción de la molécula que puede usarse para identificar de manera única la molécula. En otras realizaciones, la secuenciación de identificación es una secuencia específica añadida al aptámero; dichas secuencias a menudo se denominan "marcadores", "códigos de barras", o "códigos postales". En algunas realizaciones, el procedimiento de secuenciación incluye etapas enzimáticas para amplificar la secuencia de aptámero o para 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 la secuenciación.

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

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

En algunas realizaciones, el procedimiento de secuenciación incluye etapas enzimáticas para amplificar la molécula dirigida para la secuenciación. En otras realizaciones, el procedimiento de secuenciación secuencia directamente moléculas individuales. Un procedimiento de ejemplo basado en secuenciación de ácido nucleico 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 aleatoriamente los ácidos nucleicos no modificados resultantes con una plataforma de secuenciación masivamente paralela, 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 HeliScope Single Molecule Sequencer (Helicos Biosciences) o el sistema de secuenciación de molécula sencilla 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 mediante secuencia específica y recuento de secuencias.

Determinación de los valores de biomarcador usando inmunoensayos

Los procedimientos de inmunoensayo se basan en la reacción de un anticuerpo contra su diana o analito correspondiente y pueden detectar el analito en una muestra dependiendo del formato del ensayo específico. Para mejorar la especificidad y la sensibilidad de un procedimiento de ensayo basado en inmunorreactividad, a menudo se usan anticuerpos monoclonales debido a su reconocimiento específico de epítopos. Los anticuerpos policlonales también se han utilizado con éxito en diversos inmunoensayos debido a su mayor afinidad por la diana en comparación con los anticuerpos monoclonales. Los inmunoensayos se han diseñado para su uso con una amplia gama de matrices de muestras biológicas. Los formatos de inmunoanálisis se han diseñado para proporcionar resultados cualitativos, semicuantitativos y cuantitativos.

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

Se han diseñado numerosos formatos de inmunoensayo. Los ensayos ELISA o EIA pueden ser cuantitativos para la detección de un analito. Este procedimiento se basa en la unión de un marcador al analito o al anticuerpo y el componente marcador incluye, tanto directa como indirectamente, una enzima. Los ensayos de ELISA pueden formatearse para la detección directa, indirecta, competitiva o de tipo sándwich del analito. Otros procedimientos dependen de marcadores, tales como, por ejemplo, radioisótopos (^{125}I) o fluorescencia. Otras técnicas incluyen, por ejemplo, aglutinación, nefelometría, turbidimetría, transferencia de tipo Western, inmunoprecipitación, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, citometría de flujo, ensayo Luminex y otros (véase *ImmunoAssay: A Practical Guide*, editado por Brian Law, publicado por Taylor & Francis, Ltd., edición de 2005).

Entre los formatos de ensayo de ejemplo se incluyen ensayo de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), radioinmunoensayo, fluorescentes, quimioluminiscencia y transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) o inmunoensayos FRET resueltos en el tiempo (TR-FRET). Los ejemplos de procedimientos para detectar biomarcadores incluyen inmunoprecipitación de biomarcadores, seguida de procedimientos cuantitativos que permiten la discriminación por tamaño y nivel de péptido, tales como electroforesis en gel, electroforesis capilar, electrocromatografía plana y similares.

Los procedimientos para detectar y / o cuantificar un marcador detectable o material generador de señal dependen de la naturaleza del marcador. Los productos de reacciones catalizadas por enzimas apropiadas (en las que 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 tales marcadores detectables incluyen, sin limitación, película de rayos X, contadores de radiactividad, contadores de centelleo, espectrofotómetros, colorímetros, fluorómetros, luminómetros y densitómetros.

Cualquiera de los procedimientos para la detección se puede realizar en cualquier formato que permita cualquier preparación, procesamiento y análisis adecuados de las reacciones. Esto puede ser, por ejemplo, en placas de ensayo de múltiples pocillos (por ejemplo, 96 pocillos o 384 pocillos) o usando cualquier matriz o micromatriz adecuada. Las soluciones madre para varios agentes se pueden realizar de forma manual o robótica, y el pipeteo, dilución, mezcla, distribución, lavado, incubación, lectura de muestras, recopilación y análisis de datos posteriores se pueden realizar de forma robotizada utilizando software de análisis, robótica e instrumentos de detección disponibles comercialmente capaces de detectar un marcador detectable.

Determinación de valores de biomarcadores utilizando perfiles de expresión génica

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

Los niveles de expresión de ARNm se miden mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-PCR, seguida de qPCR). La RT-PCR se usa para crear un ADNc a partir del ARNm. El ADNc puede usarse en un ensayo de qPCR para producir fluorescencia a medida que progresa el proceso de amplificación del ADN. En comparación con una curva patrón, la qPCR puede producir una medición absoluta, tal como el número de copias de ARNm por célula. Se han usado transferencias de tipo Northern, micromatrices, ensayos Invader y RT-PCR combinados con electroforesis capilar 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 codifican pero que pueden regular la expresión génica. Cualquiera de los procedimientos adecuados para la medición de los niveles de expresión de ARNm también puede usarse para el miARN correspondiente. Recientemente, muchos laboratorios han investigado el uso de miARN como biomarcadores de enfermedad. Muchas enfermedades implican una amplia regulación transcripcional y no es sorprendente que los miARN puedan encontrar un papel como biomarcadores. La conexión entre las concentraciones de miARN y la enfermedad a menudo es aún menos clara que las conexiones entre los niveles de proteína y la enfermedad, sin embargo, el valor de los biomarcadores de miARN podría ser sustancial. Por supuesto, como con cualquier ARN expresado diferencialmente durante la enfermedad, los problemas que 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 el análisis o que los miARN se liberen en la sangre u otras matrices donde deben sobrevivir el tiempo suficiente para medirse. Los biomarcadores de proteínas tienen requisitos similares, aunque muchos posibles biomarcadores de proteínas se secretan intencionadamente en el sitio de la patología y la función, durante la enfermedad, de manera paracrina. Muchos posibles biomarcadores de proteínas están diseñados para funcionar fuera de las células dentro de las cuales se sintetizan esas proteínas.

Detección de biomarcadores utilizando tecnologías de imagen molecular *in vivo*

Cualquiera de los biomarcadores descritos (véase la Tabla 1) también se puede usar en pruebas de imagen molecular. Por ejemplo, un agente de formación de imágenes puede acoplarse a cualquiera de los biomarcadores descritos, que pueden utilizarse para ayudar en el diagnóstico de mesotelioma, controlar la progresión / remisión o metástasis de la enfermedad, controlar la recurrencia de la enfermedad o controlar la respuesta al tratamiento, entre otros usos.

Las tecnologías de imagen *in vivo* proporcionan procedimientos no invasivos para determinar el estado de una enfermedad en particular en el cuerpo de un individuo. Por ejemplo, partes enteras del cuerpo, o incluso todo el cuerpo, pueden verse como una imagen tridimensional, proporcionando así información valiosa sobre la morfología y las estructuras del cuerpo. Dichas tecnologías se pueden combinar con la detección de los biomarcadores descritos en el presente documento para proporcionar información sobre el estado del cáncer, en particular el estado del mesotelioma, de un individuo.

El uso de tecnologías de imagen molecular *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 marcadores radiactivos y / o marcadores fluorescentes, que pueden proporcionar señales fuertes dentro del cuerpo; y el desarrollo de una potente y nueva tecnología de obtención de imagen, que puede detectar y analizar estas señales desde el exterior del cuerpo, con suficiente sensibilidad y precisión para proporcionar información útil. El agente de contraste se puede visualizar en un sistema de formación de imágenes apropiado, proporcionando de ese modo una imagen de la porción o porciones del cuerpo en el que se encuentra el agente de contraste. El agente de contraste puede estar unido a o asociado 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 particuladas.

El agente de contraste también puede presentar un átomo radiactivo que es útil en la obtención de imágenes. Los átomos radiactivos adecuados incluyen tecnecio-99m o yodo-123 para estudios gammagráficos. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcadores de espín para imágenes de 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. Tales marcadores son bien conocidos en la técnica y r un experto en la técnica podría seleccionarlos fácilmente.

Las técnicas de obtención de imágenes estándar incluyen, pero sin limitaciones, imágenes por resonancia magnética, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de foton único (SPECT) y similares. Para la obtención de imágenes de diagnóstico *in vivo*, el tipo de instrumento de detección disponible es un factor principal en la selección de un agente de contraste dado, tal como un radionúclido dado y el biomarcador en particular que se usa como diana (proteína, ARNm y similares). El radionúclido elegido normalmente tiene un tipo de descomposición que es detectable por un tipo dado de instrumento. Asimismo, cuando se selecciona un radionúclido para el diagnóstico *in vivo*, su semivida debería ser lo suficientemente larga como para permitir la detección en el momento de la captación máxima por el tejido diana, pero lo suficientemente corto como para minimizar la radiación perjudicial del huésped.

Las técnicas de formación de imágenes a modo de ejemplo incluyen, pero sin limitaciones, PET y SPECT, que son técnicas de formación de imágenes en las que un radionúclido se administra de forma sintética o local a un individuo. La captación posterior del radiotrazador se mide a lo largo del tiempo y se utiliza para obtener información sobre el tejido diana y el biomarcador. Debido a las emisiones de alta energía (rayos gamma) de los isótopos específicos empleados y a la sensibilidad y sofisticación de los instrumentos utilizados para detectarlos, la distribución bidimensional de la radiactividad puede deducirse desde fuera del cuerpo.

Los nucleidos emisores de positrones de uso habitual en PET incluyen, por ejemplo, carbono-11, nitrógeno-13,

oxígeno-15 y flúor-18. Los isótopos que se descomponen por captura de electrones y / o emisión gamma se usan en SPECT e incluyen, por ejemplo, yodo-123 y tecnecio-99m. Un procedimiento de ejemplo para marcar aminoácidos con tecnecio-99m es la reducción del ion pertechnetato 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 un metal de un péptido quimiotáctico bifuncionalmente modificado para formar un conjugado peptídico de tecnecio-99m quimiotáctico.

Los anticuerpos se usan con frecuencia para tales procedimientos de diagnóstico por imagen *in vivo*. La preparación y uso de anticuerpos para el diagnóstico *in vivo* se conocen bien en la técnica. Los anticuerpos marcados que se unen específicamente a cualquiera de los biomarcadores en la Tabla 1 se pueden inyectar en un individuo del que se sospecha que tiene un cierto tipo de cáncer (por ejemplo, mesotelioma), detectable de acuerdo con el biomarcador en particular utilizado, con el fin de diagnosticar o evaluar el estado de enfermedad del individuo. El marcador utilizado se seleccionará de acuerdo con la modalidad de imágenes que se utilizará, como se ha descrito anteriormente. 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 manera similar, los aptámeros pueden usarse para tales procedimientos de diagnóstico por imagen *in vivo*. Por ejemplo, un aptámero que se usó para identificar un biomarcador en particular descrito en la Tabla 1 (y, por lo tanto, se une específicamente a ese biomarcador particular) se puede marcar e inyectar apropiadamente en un individuo del que se sospecha que tiene mesotelioma, detectable de acuerdo con el biomarcador en particular, con el fin de diagnosticar o evaluar el estado del mesotelioma del individuo. El marcador utilizado se seleccionará de acuerdo con la modalidad de imágenes que se utilizará, como se ha descrito anteriormente. 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 formación de imágenes dirigidos por el aptámero podrían tener características únicas y ventajosas relacionadas con la penetración del tejido, la distribución tisular, la cinética, la eliminación, la potencia y la selectividad en comparación con otros agentes de formación de imágenes.

Dichas técnicas también se pueden realizar opcionalmente con oligonucleótidos marcados, por ejemplo, para la detección de la expresión génica a través de imágenes con oligonucleótidos antisentido. Estos procedimientos se usan para la hibridación *in situ*, por ejemplo, con moléculas fluorescentes o radionúclidos como marcador. Otros procedimientos para la detección de la expresión génica incluyen, por ejemplo, la detección de la actividad de un gen indicador.

Otro tipo general de tecnología de imagen es la imagen óptica, en la que las señales fluorescentes dentro del sujeto son detectadas por 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 las imágenes ópticas para los ensayos de diagnóstico *in vivo*.

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

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

Determinación de valores de biomarcadores usando procedimientos de histología / citología

Para la evaluación del mesotelioma, se pueden usar diversas muestras de tejido en procedimientos histológicos o citológicos. La selección de la muestra depende de la ubicación del tumor primario y los sitios de metástasis. Por ejemplo, las muestras de tejido o derrame (biopsia con pinzas, aspiración con aguja fina (AAF) y / o citología con cepillo) recogidas en el momento de la TC o de la AAF guiada por ultrasonidos se pueden usar para histología. Los lavados de ascitis o peritoneales, derrames pleurales o líquido del mesotelio se pueden utilizar para la citología. Cualquiera de los biomarcadores identificados en el presente documento que mostraron una regulación por aumento (Tabla 1) en los individuos con anomalía pleural se puede usar para teñir una muestra histológica como una indicación de enfermedad.

En una realización, uno o más reactivos de captura específicos para el biomarcador o biomarcadores correspondientes se usan en una evaluación citológica de una muestra de células del mesotelio 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 la recuperación de analitos, teñir, decolorar, 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.

En otra realización, uno o más reactivos de captura específicos del biomarcador o biomarcadores correspondientes se utilizan en una evaluación histológica de una muestra de tejido de anomalía peritoneal o pleural y pueden incluir

5 uno o más de los siguientes: recoger una muestra de tejido, fijar la muestra de tejido, deshidratar, aclarar, inmovilizar la muestra de tejido en un portaobjetos de microscopio, permeabilizar la muestra de tejido, tratar para la recuperación de analitos, teñir, decolorar, lavar, bloquear, rehidratar y hacer reaccionar con uno o más reactivos de captura en una solución tamponada. En otra realización, la fijación y la deshidratación se reemplazan por congelación.

10 En otra realización, el uno o más aptámeros (s) específicos del biomarcador o biomarcadores correspondientes se hacen reaccionar con la muestra histológica o citológica y pueden servir como el ácido nucleico diana en un procedimiento de amplificación de ácido nucleico. Los procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos adecuados incluyen, por ejemplo, PCR, q-beta replicasa, 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 con circularización y restricción.

15 En una realización, el uno o más reactivos de captura específicos de 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.

20 Un "protocolo de citología" generalmente incluye la recolección de muestras, la fijación de la muestra, la inmovilización y la tinción de la muestra. La "preparación celular" puede incluir varias etapas de procesamiento después de la recolección de muestras, incluido el uso de uno o más aptámeros de baja velocidad de disociación para la tinción de las células preparadas.

25 La recolección de muestras puede incluir colocar directamente la muestra en un recipiente de transporte no tratado, colocar la muestra en un recipiente de transporte que contenga algún tipo de medio o colocar la muestra directamente en un portaobjetos (inmovilización) sin ningún tratamiento o fijación.

30 La inmovilización de la muestra se puede mejorar aplicando una porción de la muestra recolectada a un portaobjetos de vidrio que se trata con polilisina, gelatina o un silano. Los portaobjetos se pueden preparar frotando una capa fina y uniforme de células por el portaobjetos. Por lo general, se tiene cuidado para minimizar la distorsión mecánica y los artefactos de secado. Las muestras líquidas se pueden procesar en un procedimiento de bloqueo de células. O, como alternativa, las muestras líquidas se pueden mezclar 1:1 con la solución de fijación durante aproximadamente 10 minutos a temperatura ambiente.

35 Los bloques de células se pueden preparar a partir de derrames residuales, esputo, sedimentos de orina, fluidos gastrointestinales, raspado celular o aspiración con aguja fina. Las células se concentran o se concentran mediante centrifugación o filtración por membrana. Se han desarrollado varios procedimientos para la preparación de bloques de células. Los procedimientos representativos incluyen los procedimientos de sedimentación fija, agar bacteriano o filtración por membrana. En el procedimiento de sedimentación fija, 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. El sobrenadante se elimina, secando el sedimento celular lo más completamente posible. El sedimento se recoge y se envuelve en papel de óptica y, a continuación, se coloca en un casete de papel tisú. El casete de tejido se coloca en un bote con fijador adicional y se procesa como una muestra de tejido. El procedimiento de agar es muy similar, pero el sedimento se retira y se seca en una toalla de papel y luego se corta por la mitad. El lado cortado se coloca en una gota de agar fundido sobre un portaobjetos de vidrio y, después, el sedimento se cubre con agar, asegurándose de que no se formen burbujas en el agar. Se deja endurecer el agar y luego se elimina el exceso de agar. Esto se coloca en un casete de tejido y el procesamiento del tejido se completa. Como alternativa, el sedimento puede suspenderse directamente en agar líquido al 2 % a 65 °C y centrifugarse la muestra. El sedimento celular en agar se deja solidificar durante una hora a 4 °C. El agar sólido puede extraerse del tubo de centrifuga y cortarse por la mitad. El agar se envuelve en papel de filtro y, luego, el casete de tejido. El procesamiento a partir de este punto es como se ha descrito anteriormente. La centrifugación se puede reemplazar en cualquiera de estos procedimientos por filtración por membrana. Cualquiera de estos procedimientos puede usarse para generar una "muestra de bloque de célula".

55 Los bloques de células se pueden preparar usando resinas especializadas, incluyendo resinas Lowicryl, LR White, LR Gold, Unicryl y MonoStep. Estas resinas tienen baja viscosidad y pueden polimerizarse a bajas temperaturas y con luz ultravioleta (UV). El procedimiento 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 baja temperatura final a la longitud de onda UV apropiada.

60 Las secciones del bloque celular se pueden teñir con hematoxilina-eosina para el examen citomorfológico, mientras que se usan secciones adicionales para el examen de marcadores específicos.

65 Si el procedimiento es citológico o histológico, la muestra puede fijarse antes del procesamiento adicional para evitar la degradación de la muestra. Este procedimiento se llama "fijación" y describe una amplia gama de materiales y procedimientos que pueden usarse indistintamente. El protocolo de fijación de muestras y los reactivos se

seleccionan mejor de forma empírica en función de las dianas que se van a detectar y del tipo de célula / tejido específico que se va a analizar. La fijación de la muestra se basa en reactivos tales como etanol, polietilenglicol, metanol, formalina o isopropanol. Las muestras deben fijarse tan pronto como sea posible después de la recolección y fijación al portaobjetos. Sin embargo, el fijador seleccionado puede introducir cambios estructurales en varias dianas moleculares, dificultando su posterior detección. Los procedimientos de fijación e inmovilización y su secuencia pueden modificar el aspecto de la célula y el citotécnico debe prever y reconocer estos cambios. Los fijadores pueden causar la contracción de ciertos tipos de células y hacer que el citoplasma parezca granular o reticular. Muchos fijadores funcionan reticulando los componentes celulares. Esto puede dañar o modificar epítomos específicos, generar nuevos epítomos, causar asociaciones moleculares y reducir la permeabilidad de la membrana. La fijación en formalina es uno de los enfoques citológicos / histológicos más frecuentes. La formalina forma puentes de metilo entre las proteínas vecinas o dentro de las proteínas. La precipitación o coagulación también se usa para la fijación y el etanol se usa con frecuencia en este tipo de fijación. Una combinación de reticulación y precipitación también se puede usar para la fijación. Un procedimiento de fijación fuerte es mejor para preservar la información morfológica, mientras que un procedimiento de fijación más débil es mejor para la conservación de las dianas moleculares.

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

Se puede usar una amplia gama de colorantes para resaltar y contrastar o "teñir" diferencialmente las estructuras morfológicas o características celulares, subcelulares y tisulares. La hematoxilina se usa para teñir los núcleos de un color azul o negro. El naranja G-6 y la eosina Azure tiñen ambas el citoplasma de la célula. El naranja G tiñe de color amarillo las células que contienen queratina y glucógeno. La eosina Y se usa para teñir los nucleolos, los cilios, los glóbulos rojos y las células epiteliales escamosas superficiales. Las tinciones de Romanowsky se utilizan para portaobjetos secados al aire y son útiles para mejorar el pleomorfismo y distinguir el material extracelular del intracitoplásmico.

El procedimiento 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 se pueden tratar adicionalmente con disolventes, saponinas o detergentes no iónicos. La digestión enzimática también puede mejorar el acceso a dianas específicas en una muestra de tejido.

Después de la tinción, la muestra se deshidrata usando una sucesión de enjuagues con alcohol con una concentración creciente de alcohol. El lavado final se realiza con xileno o un sustituto de xileno, tal como un terpeno de cítricos, que tiene un índice de refracción cercano al del cubreobjetos que se aplicará al portaobjetos. Esta etapa final se conoce como aclaramiento. Una vez que la muestra se deshidrata y se aclara, se aplica un medio de montaje. El medio de montaje se selecciona de modo que tenga un índice de refracción cercano al del vidrio y es capaz de unir el cubreobjetos al portaobjetos. También inhibirá el secado, la contracción o la decoloración adicionales de la muestra celular.

Independientemente de las tinciones o el procesamiento utilizado, la evaluación final de la muestra citológica de mesotelio se realiza mediante algún tipo de microscopio para permitir una inspección visual de la morfología y una determinación de la presencia o ausencia del marcador. Los procedimientos microscópicos de ejemplo incluyen campo claro, contraste de fase, fluorescencia y contraste de interferencia diferencial.

Si se requieren pruebas secundarias en la muestra después del examen, se puede retirar el cubreobjetos y quitar la tinción del portaobjetos. La eliminación del colorante implica el uso de los sistemas de disolventes originales utilizados en la tinción del portaobjetos originalmente sin el colorante añadido y en orden inverso al procedimiento de tinción original. La eliminación del colorante también puede completarse sumergiendo el portaobjetos en un alcohol ácido hasta que las células no tengan color. Una vez incoloros, los portaobjetos se enjuagan 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 ácidos nucleicos o aptámeros. Esto mejora la precisión de la citología de diagnóstico. La microdissección puede usarse para aislar una subpoblación de células para una evaluación adicional, en particular, para la evaluación genética de cromosomas anormales, la expresión génica o mutaciones.

La preparación de una muestra de tejido para la evaluación histológica implica fijación, deshidratación, infiltración, inclusión y corte. Los reactivos de fijación utilizados en histología son muy similares o idénticos a los utilizados en citología y tienen los mismos problemas de conservar las características morfológicas a expensas de las moleculares, tales como las proteínas individuales. Se puede ahorrar tiempo si la muestra de tejido no se fija y se

deshidrata, sino que se congela y luego se secciona mientras está congelada. Este es un procedimiento de procesamiento más suave y puede conservar más marcadores individuales. Sin embargo, la congelación no es aceptable para el almacenamiento a largo plazo de una muestra de tejido, ya que la información subcelular se pierde debido a la introducción de cristales de hielo. El hielo en la muestra de tejido congelado también evita que el procedimiento de corte produzca una lámina muy delgada y, por lo tanto, se puede perder algo de resolución microscópica e imágenes de las estructuras subcelulares. Además de la fijación en formalina, el tetróxido de osmio se usa para fijar y teñir fosfolípidos (membranas).

La deshidratación de los tejidos se logra con lavados sucesivos con concentraciones crecientes de alcohol. El aclaramiento emplea un material que es miscible con el alcohol y el material de inclusión e implica un proceso gradual que comienza con alcohol 50:50 como reactivo de aclaramiento y, luego, con agente de aclaramiento al 100 % (xileno o sustituto de xileno). La infiltración implica incubar el tejido con una forma líquida del agente de inclusión (cera tibia, solución de nitrocelulosa) primero a 50:50 del agente de inclusión: agente de eliminación y el agente de inclusión fundido, ta como cera, agar o gelatina. Se deja que el agente de inclusión se endurezca. La muestra de tejido endurecido se puede cortar en secciones finas para su tinción y el examen posterior.

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

La microdissección por captura láser permite el aislamiento de una subpoblación de células para su posterior análisis desde una sección de tejido.

Al igual que en la citología, para mejorar la visualización de las características microscópicas, la sección o lámina de tejido se puede teñir con diversas tinciones. Se puede usar un menú grande de tinciones comercialmente disponibles para mejorar o identificar características específicas.

Para aumentar aún más la interacción de reactivos moleculares con muestras citológicas / histológicas, se han desarrollado varias técnicas para la "recuperación de analitos". La primera técnica de este tipo usa calentamiento a alta temperatura de una muestra fijada. Este procedimiento también se denomina recuperación del epítipo inducida por calor o HIER. Se han usado diversas técnicas de calentamiento, incluyendo calentamiento con vapor, microondas, autoclave, baños de agua y cocción a presión o una combinación de estos procedimientos de calentamiento. Las soluciones de recuperación de analitos incluyen, por ejemplo, agua, citrato y tampones salinos normales. La clave para la recuperación del analito es el tiempo a alta temperatura, pero también se han utilizado con éxito temperaturas más bajas durante más tiempo. Otra clave para la recuperación de analitos es el pH de la solución de calentamiento. Se ha encontrado que el pH bajo proporciona la mejor inmunotinción, pero también da lugar a antecedentes que frecuentemente requieren el uso de una segunda sección de tejido como control negativo. El beneficio más consistente (inmunotinción aumentada sin aumento del fondo) generalmente se obtiene con una solución de pH alto independientemente de la composición del tampón. El proceso de recuperación de analitos para una diana específica se optimiza empíricamente para la diana utilizando calor, tiempo, el pH y la composición del tampón como variables para la optimización del proceso. El uso del procedimiento de recuperación de analitos con microondas permite la tinción secuencial de diferentes dianas con reactivos de anticuerpos. Pero también se ha demostrado que el tiempo requerido para lograr complejos de anticuerpos y enzimas entre las etapas de tinción degrada los analitos de la membrana celular. Los procedimientos de calentamiento por microondas también han mejorado los procedimientos de hibridación *in situ*.

Para iniciar el procedimiento de recuperación del analito, la sección primero se desparafina y se hidrata. El portaobjetos se coloca después en un tampón de citrato de sodio 10 mM a pH 6,0 en una placa o bote. Un procedimiento representativo utiliza un microondas de 1100 W y coloca en el microondas el portaobjetos al 100 % de potencia durante 2 minutos, seguido de aplicación de microondas con un 20 % de potencia durante 18 minutos después de verificar que el portaobjetos permanezca cubierto de líquido. A continuación, se deja enfriar el portaobjetos en el recipiente descubierto y luego se enjuaga con agua destilada. Puede usarse HIER en combinación con una digestión enzimática para mejorar la reactividad de la diana los reactivos inmunoquímicos.

Uno de tales protocolos de digestión enzimática usa proteinasa K. Se prepara una concentración de proteinasa K de 20 g / ml en Tris Base 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 0,5 %, tampón a pH 8,0. El procedimiento primero implica desparafinar las secciones en 2 cambios de xileno, de 5 minutos cada uno. Después, la muestra se hidrata en 2 cambios de etanol al 100 % durante 3 minutos cada uno, etanol al 95 % y al 80 % durante 1 minuto cada uno y después se enjuaga en agua destilada. Las secciones se cubren con una 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 según el tipo de tejido y el grado de fijación). Las secciones se enfrían a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se enjuagan en PBS Tween 20 durante 2x2 minutos. Si se desea, las secciones se pueden bloquear para eliminar la interferencia potencial de compuestos endógenos y enzimas. La sección se incuba luego con anticuerpo primario a la dilución apropiada en tampón de dilución de anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente

o durante la noche a 4 °C. La sección se enjuaga después con PBS Tween 20 durante 2x2 minutos. Se puede realizar un bloqueo adicional, si es necesario para la aplicación específica, seguido de enjuague adicional con PBS Tween 20 durante 3x2 minutos y, después, finalmente, se completa el protocolo de inmunotinción.

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

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

15 Las reacciones de bloqueo pueden incluir la necesidad de reducir el nivel de biotina endógena; eliminar los efectos de carga endógenos; inactivar nucleasas endógenas; y / o inactivar enzimas endógenas como la peroxidasa y la fosfatasa alcalina. Las nucleasas endógenas pueden inactivarse por degradación con proteinasa K, mediante tratamiento térmico, uso de un agente quelante, tal como EDTA o EGTA, la introducción de ADN o ARN portador, el tratamiento con un caótopo, tal como urea, tiourea, hidrocloreuro de guanidina, tiocianato de guanidina, perclorato de litio, etc., o pirocarbonato de dietilo. La fosfatasa alcalina se puede inactivar mediante tratamiento con HCl 0,1 N durante 5 minutos a temperatura ambiente o tratamiento con levamisol 1 mM. La actividad de la peroxidasa puede eliminarse mediante tratamiento con peróxido de hidrógeno al 0,03 %. La biotina endógena se puede bloquear empapando el portaobjetos o la sección en una solución de avidina (se puede sustituir por estreptavidina, neutravidina) durante al menos 15 minutos a temperatura ambiente. El portaobjetos o sección se lava a continuación luego durante al menos 10 minutos en tampón. Esto puede repetirse al menos tres veces. Después, el portaobjetos o sección se empapa en una solución de biotina durante 10 minutos. Esto puede repetirse al menos tres veces con una solución de biotina recién preparada cada vez. El procedimiento de lavado con tampón se repite. Los protocolos de bloqueo deben 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 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, de Richard G. Kessel, Oxford University Press, 1998.

Determinación de valores de biomarcadores utilizando procedimientos de espectrometría de masas

35 Se pueden usar diversas configuraciones de espectrómetros de masas para detectar valores de biomarcadores. Se dispone de 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 para muestras, una fuente de iones, un analizador de masas, un detector, un sistema de vacío y un sistema de control de instrumentos. La diferencia en la entrada para muestras, la fuente de iones y el analizador de masas generalmente define el tipo de instrumento y sus capacidades. Por ejemplo, una entrada puede ser una fuente de cromatografía líquida de columna capilar o puede ser una sonda o directa o paso tal como se utiliza en la desorción láser asistida por matriz. Las fuentes de iones comunes son, por ejemplo, electropulverización, incluyendo nanopulverización y micropulverización o desorción láser asistida por matriz. Los analizadores de masas comunes incluyen un filtro de masa cuadrupolar, un analizador de masas de trampa iónica y un analizador de masas de tiempo de vuelo. Los procedimientos de espectrometría de masas adicionales son bien conocidos en la técnica (véase Burlingame et al. Anal. Chem. 70:647 R-716R (1998); Kinter y Sherman, Nueva York (2000)).

50 Los biomarcadores de proteínas y los valores de biomarcadores se pueden detectar y medir mediante cualquiera de los siguientes: espectrometría de masas por ionización por electropulverización (ESI-MS), ESI-MS/MS, ESI-MS/(MS)_n, ionización por desorción láser asistida por matriz espectrometría de masas de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS), espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción / ionización láser mejorada en superficie (SELDI-TOF-MS), desorción / ionización en silicio (DIOS), espectrometría de masas de iones secundarios (SIMS), tiempo de vuelo cuadrupolar (Q-TOF), tiempo de vuelo en tándem (TOF / TOF), llamado ultraflex III TOF / TOF, espectrometría de masas por ionización química a presión atmosférica (APCI-MS), APCI-MS/MS, APCI-(MS)_n, espectrometría de masas de fotoionización a presión atmosférica (APPI-MS), APPI-MS/MS y APPI-(MS)_n, espectrometría de masas cuadrupolar, espectrometría de masas por transformada de Fourier (FTMS), espectrometría de masas cuantitativa y espectrometría de masas de trampa iónica.

60 Las estrategias de preparación de muestras se utilizan para marcar y enriquecer muestras antes de la caracterización espectroscópica de masas de los biomarcadores de proteínas y la determinación de los valores de biomarcadores. Los procedimientos de marcaje incluyen, pero sin limitaciones, el marcador isobárico para la cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ) y el marcaje de isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular (SILAC). Los reactivos de captura utilizados para enriquecer selectivamente muestras de proteínas biomarcadoras candidatas antes del análisis espectroscópico de masas incluyen, pero sin limitaciones, anticuerpos, sondas de ácido nucleico, quimeras, moléculas pequeñas, un fragmento F(ab')₂, un fragmento de anticuerpo monocatenario, un fragmento Fv, un fragmento Fv monocatenario, un ácido nucleico, una lectina, un receptor de unión a ligando, afucos, nanocuerpos, anquirina, anticuerpos de dominio, armazones de anticuerpos alternativos (por ejemplo,

diacuerpos, etc.), polímeros impresos, avímeros, peptidomiméticos, peptoides, ácidos nucleicos peptídicos, ácido nucleico treosa, un receptor de hormonas, un receptor de citocinas y receptores sintéticos, y modificaciones y fragmentos de estos.

5 Determinación de valores de biomarcadores usando un ensayo de ligadura de proximidad

Se puede usar un ensayo de ligadura de proximidad para determinar los valores de biomarcadores. Brevemente, una muestra de prueba se pone en contacto 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 determinantes distintos en una proteína o un determinante en cada una de las dos proteínas diferentes, que pueden existir como complejos homopoliméricos o heteromultiméricos. Cuando las sondas se unen a las dianas determinantes, los extremos libres de las extensiones de oligonucleótidos se ponen lo suficientemente cerca para hibridar juntos. La hibridación de las extensiones de oligonucleótidos se ve facilitada por un oligonucleótido conector común que sirve para unir entre sí las extensiones de los oligonucleótidos cuando se colocan en una proximidad suficiente. Una vez que las extensiones de oligonucleótidos de las sondas se hibridan, los extremos de las extensiones se unen mediante ligamiento enzimático de ADN.

Cada extensión de oligonucleótido comprende un sitio de cebador para la amplificación por PCR. Una vez que las extensiones de oligonucleótidos se ligan, los oligonucleótidos forman una secuencia continua de ADN que, a través de amplificación por PCR, revela información sobre la identidad y la cantidad de la proteína diana, así como, información sobre las interacciones proteína-proteína en las que los determinantes de la diana están en dos proteínas diferentes. La ligación de proximidad puede proporcionar un ensayo altamente sensible y específico para la información sobre la interacción y concentración de la proteína en tiempo real mediante el uso de PCR en tiempo real. Las sondas que no se unen a los determinantes de interés no tienen las correspondientes extensiones de oligonucleótidos puestas en proximidad y no puede procederse a la ligación ni a la amplificación por PCR, lo que da como resultado que no se produzca ninguna señal.

Los ensayos anteriores permiten la detección de valores de biomarcadores que son útiles en los procedimientos para diagnosticar mesotelioma, en los que los procedimientos comprenden detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos N valores de biomarcador que corresponden cada uno a un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, en el que una clasificación, como se describe con detalle a continuación, usando los valores de biomarcador indica si el individuo tiene mesotelioma. Si bien algunos de los biomarcadores de mesotelioma descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar mesotelioma, en el presente documento también se describen procedimientos para la agrupación de múltiples subconjuntos de biomarcadores de mesotelioma que son útiles cada uno como panel de tres o más biomarcadores. Por tanto, varias realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en las que N es al menos tres biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 2-66 biomarcadores. Se apreciará que N se puede seleccionar de modo que sea cualquier número de cualquiera de los intervalos descritos anteriormente, así como intervalos similares, pero de orden superior. De acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los valores de los 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 procedimientos para detectar una ausencia de mesotelioma, comprendiendo los procedimientos detectar, en una muestra biológica de un individuo, al menos N valores de biomarcador que corresponden cada uno a un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, en el que una clasificación, como se describe con detalle a continuación, de los valores de biomarcadores indica ausencia de mesotelioma en el individuo. Si bien algunos de los biomarcadores de mesotelioma descritos son útiles solos para detectar y diagnosticar la ausencia de mesotelioma, en el presente documento también se describen procedimientos para la agrupación de múltiples subconjuntos de biomarcadores de mesotelioma que son útiles cada uno como panel de tres o más biomarcadores. Por tanto, varias realizaciones de la presente solicitud proporcionan combinaciones que comprenden N biomarcadores, en las que N es al menos tres biomarcadores. En otras realizaciones, N se selecciona de modo que sea cualquier número de 2-66 biomarcadores. Se apreciará que N se puede seleccionar de modo que sea cualquier número de cualquiera de los intervalos descritos anteriormente, así como intervalos similares, pero de orden superior. De acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento, los valores de los biomarcadores pueden detectarse y clasificarse individualmente o pueden detectarse y clasificarse colectivamente, como por ejemplo en un formato de ensayo múltiple.

60 Clasificación de biomarcadores y cálculo de puntuaciones de la enfermedad

Una "firma" de biomarcador para una prueba de diagnóstico dada contiene un conjunto de marcadores, teniendo cada marcador diferentes niveles en las poblaciones de interés. Los diferentes niveles, en este contexto, pueden hacer referencia a diferentes medios de los niveles del marcador para los individuos en dos o más grupos, o diferentes variaciones en los dos o más grupos, o una combinación de ambos. Para la forma más simple de una prueba de diagnóstico, estos marcadores se pueden usar para asignar una muestra desconocida de un individuo a

uno de dos grupos, esté enfermo o no. La asignación de una muestra a uno de dos grupos se conoce como clasificación y el procedimiento utilizado para realizar esta asignación se conoce como clasificador o procedimiento de clasificación. Los procedimientos de clasificación también pueden denominarse procedimientos de puntuación. Hay muchos procedimientos de clasificación que se pueden usar para construir un clasificador de diagnóstico a partir de un conjunto de valores de biomarcadores. En general, los procedimientos de clasificación se realizan más fácilmente utilizando técnicas de aprendizaje supervisado en las que se recopila un conjunto de datos utilizando muestras obtenidas de individuos dentro de dos (o más, para múltiples estados de clasificación) grupos distintos que se desea distinguir. Dado que la clase (grupo o población) a la que pertenece cada muestra se conoce de antemano para cada muestra, se puede entrenar al procedimiento de clasificación para dar la respuesta de clasificación deseada. También es posible usar técnicas de aprendizaje no supervisado para producir un clasificador de diagnóstico.

Los enfoques comunes para desarrollar clasificadores de diagnóstico incluyen árboles de decisión; empaquetado, potenciación, bosques y bosques aleatorios; aprendizaje basado en inferencia de reglas; ventanas de Parzen; modelos lineales; logística; procedimientos de redes neuronales; agrupamiento no supervisado; K-medias; ascendente / descendente jerárquico; aprendizaje semisupervisado; procedimientos prototipo; vecino más próximo; estimación de la densidad de Kernel; máquinas de vectores de soporte; modelos ocultos de Markov; aprendizaje Boltzmann; y los clasificadores pueden combinarse de manera simple o de maneras que minimicen funciones objetivo 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.

Para producir un clasificador usando técnicas de aprendizaje supervisado, se obtiene un conjunto de muestras llamadas datos de entrenamiento. En el contexto de las pruebas de diagnóstico, los datos de entrenamiento incluyen muestras de los distintos grupos (clases) a los que posteriormente se asignarán muestras desconocidas. Por ejemplo, las muestras recolectadas de individuos en una población de control y de individuos en una población de enfermedad en particular pueden constituir datos de entrenamiento para desarrollar un clasificador que pueda clasificar las muestras desconocidas (o, más particularmente, los individuos de los que se obtuvieron las muestras) como que tienen la enfermedad o están libres de la enfermedad. El desarrollo del clasificador a partir de los datos de entrenamiento se conoce como entrenamiento del clasificador. Los detalles específicos sobre el entrenamiento del clasificador dependen de la naturaleza de la técnica de aprendizaje supervisado. Con fines ilustrativos, a continuación se describirá un ejemplo de entrenamiento de un clasificador bayesiano ingenuo (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).

Dado que, por lo general, hay muchos más valores de biomarcadores potenciales que muestras en un conjunto de entrenamiento, se debe tener cuidado para evitar el exceso de ajuste. El exceso de ajuste ocurre cuando un modelo estadístico describe un error o ruido aleatorio en lugar de la relación subyacente. El exceso de ajuste puede evitarse de varias maneras, incluyendo, por ejemplo, limitando el número de marcadores utilizados para desarrollar el clasificador, suponiendo que las respuestas del marcador son independientes unas de otras, limitando la complejidad del modelo estadístico subyacente y asegurando que el modelo estadístico subyacente se ajuste a los datos.

Un ejemplo ilustrativo del desarrollo de una prueba de diagnóstico usando un conjunto de biomarcadores incluye la aplicación de un clasificador ingenuo de Bayes, un clasificador probabilístico simple basado en el teorema de Bayes con un tratamiento estrictamente independiente de los biomarcadores. Cada biomarcador se describe mediante una función de densidad de probabilidad dependiente de clase (pdf) para los valores de RFU medidos o los valores de log de RFU (unidades de fluorescencia relativas) en cada clase. Se supone que los pdfs conjuntos para el conjunto de marcadores en una clase son el producto de los pdfs individuales dependientes de clase para cada biomarcador. El entrenamiento de un clasificador ingenuo de Bayes en este contexto equivale a la asignación de parámetros ("parametrización") para caracterizar los pdfs dependientes de la clase. Se puede usar cualquier modelo subyacente para los pdfs dependientes de la clase, pero el modelo generalmente debe ajustarse 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 ingenua general de Bayes de observar n marcadores con

valores $\tilde{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ se escribe como $p(\tilde{x}|d) = \prod_{i=1}^n p(x_i|d)$ cuando los x s individuales son los niveles del biomarcador medido en RFU o log de RFU. 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 libre de enfermedad (control) $p(c|\tilde{x})$ para los mismos valores medidos. La relación de estas probabilidades se calcula a partir de los pdfs dependientes de la clase mediante la aplicación del teorema de Bayes, es decir, $\frac{p(d|\tilde{x})}{p(c|\tilde{x})} = \frac{p(\tilde{x}|d)p(d)}{p(\tilde{x}|c)(1-p(d))}$ cuando $p(d)$ es la prevalencia de la enfermedad en la población apropiada para la

prueba. Tomando el logaritmo de ambos lados de esta relación y sustituyendo las probabilidades dependientes de la

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

5 forma se conoce como la razón de verosimilitud logarítmica y simplemente establece que la verosimilitud logarítmica de estar libre de la enfermedad en particular frente a tener la enfermedad y se compone principalmente de la suma de las razones de verosimilitud logarítmica individuales de los n biomarcadores individuales. En su forma más simple, una muestra desconocida (o, más particularmente, el individuo de quien se obtuvo la muestra) se clasifica como libre de la enfermedad si la razón anterior es mayor que cero y tiene la enfermedad si la razón es menor que

10 En una realización de ejemplo, se supone que los pdfs de biomarcador dependientes de clase $p(x_i|c)$ y $p(x_i|d)$ son distribuciones normales o log-normales en los valores de RFU 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 μ_d y σ_d . La parametrización del modelo requiere la estimación de dos parámetros para cada pdf dependiente de clase, una media μ y una varianza σ^2 , de los datos de entrenamiento. Esto se puede lograr de varias maneras, incluyendo,

15 por ejemplo, estimaciones de la probabilidad máxima, por mínimos cuadrados y por cualquier otro procedimiento conocido por los expertos en la técnica. Al sustituir las distribuciones normales por la razón de verosimilitud logarítmica definida anteriormente, se obtiene la siguiente expresión:

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

20 Una vez que un conjunto de μ s y σ^2 s se han definido para cada pdf en cada clase a partir de los datos de entrenamiento y se especifica la prevalencia de la enfermedad en la población, el clasificador de Bayes está completamente determinado y se puede usar para clasificar muestras desconocidas con valores medidos \tilde{x} .

25 El rendimiento del clasificador ingenuo de Bayes depende del número y la calidad de los biomarcadores utilizados para construir y entrenar al clasificador. Un único biomarcador funcionará de acuerdo con su distancia KS (Kolmogorov-Smirnov), como se define en el Ejemplo 3, a continuación. Si una métrica de rendimiento del clasificador se define como el área bajo la curva característica del operador receptor (AUC), un clasificador perfecto tendrá una puntuación de 1 y un clasificador aleatorio, en promedio, tendrá una puntuación de 0,5. La definición de

30 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 (cdf) empíricas. La cdf empírica para un conjunto A de n

observaciones X_i se define como, $F_{A,n}(x) = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n I_{X_i \leq x}$, donde $I_{x_i \leq x}$ es la función del indicador que es igual a 1 si $X_i < x$ es, de otro modo, igual a 0. Por definición, este valor está limitado entre 0 y 1, donde una distancia KS de 1 indica que las distribuciones empíricas no se superponen.

35 La adición de marcadores posteriores con buenas distancias KS ($> 0,3$, por ejemplo, en general, mejorará el rendimiento de la clasificación si los marcadores añadidos posteriormente son independientes del primer marcador. Utilizando el área bajo la curva ROC (AUC) como puntuación del clasificador, es sencillo generar muchos clasificadores de puntuación alta con una variación de un algoritmo ambicioso. (Un algoritmo ambicioso es cualquier

40 algoritmo que sigue la metaheurística de resolución de problemas de realizar la elección localmente óptima en cada etapa con la esperanza de encontrar el óptimo global).

El enfoque de algoritmo usado en el presente documento se describe con detalle en el Ejemplo 4. Brevemente, todos los clasificadores de analito individuales se generan a partir de una tabla de biomarcadores potenciales y se

45 añaden a una lista. A continuación, se realizan todas las adiciones posibles de un segundo analito a cada uno de los clasificadores de analitos individuales almacenados, guardando un número predeterminado de los mejores pares de puntuación, dígame, por ejemplo, mil, en una nueva lista. Se exploran todos los posibles tres clasificadores de marcadores usando esta nueva lista de los mejores clasificadores de dos marcadores, guardando de nuevo los mejores miles de estos. Este proceso continúa hasta que la puntuación o bien se estabiliza o comienza a

50 deteriorarse a medida que se añaden marcadores adicionales. Los clasificadores de alta puntuación que quedan después de la convergencia pueden evaluarse para el rendimiento deseado para un uso previsto. Por ejemplo, en una aplicación de diagnóstico, los clasificadores con una alta sensibilidad y una especificidad modesta pueden ser más deseables que la sensibilidad modesta y la especificidad alta. En otra aplicación de diagnóstico, los clasificadores con una especificidad alta y una sensibilidad modesta pueden ser más deseables. El nivel de

55 rendimiento deseado generalmente se selecciona en función de una compensación que debe establecerse entre el

número de falsos positivos y falsos negativos que pueden tolerarse para cada aplicación de diagnóstico en particular. Tales compensaciones generalmente dependen de las consecuencias médicas de un error, ya sea un falso positivo o un falso negativo.

5 Se conocen otras diversas técnicas en la materia y pueden emplearse para generar muchos clasificadores potenciales a partir de una lista de biomarcadores usando un clasificador ingenuo de Bayes. En una realización, lo que se denomina algoritmo genético se puede usar para combinar marcadores diferentes usando la puntuación de aptitud como se ha definido anteriormente. Los algoritmos genéticos son particularmente adecuados para explorar una gran población diversa de clasificadores potenciales. En otra realización, la denominada optimización de colonias de hormigas puede usarse para generar conjuntos de clasificadores. También se pueden emplear otras estrategias que se conocen en la técnica, incluyendo, por ejemplo, otras estrategias evolutivas así como la hibridación simulada y otros procedimientos de búsqueda estocástica. También se pueden emplear procedimientos metaheurísticos, tal como, por ejemplo, búsqueda de armonía.

15 Las realizaciones a modo de ejemplo usan cualquier número de biomarcadores de mesotelioma enumerados en la Tabla 1 en diversas combinaciones para producir pruebas de diagnóstico para detectar mesotelioma (véase el Ejemplo 2 para una descripción detallada de cómo se identificaron estos biomarcadores). En una realización, un procedimiento para diagnosticar mesotelioma usa un procedimiento de clasificación ingenua de Bayes junto con cualquier número de biomarcadores de mesotelioma enumerados en la Tabla 1. En un ejemplo ilustrativo (Ejemplo 3), la prueba más simple para detectar mesotelioma de una población de individuos expuestos a amianto puede construirse usando un solo biomarcador, por ejemplo, CDH1, que se expresa diferencialmente en el mesotelioma con una distancia KS de 0,63. Usando los parámetros, $\mu_{c,i}$, $\sigma_{c,i}$, $\mu_{d,i}$ y $\sigma_{d,i}$, para CDH1 de la Tabla 16 y la ecuación para la verosimilitud logarítmica descrita anteriormente, se puede obtener una prueba de diagnóstico con una AUC de 0,884, véase la tabla 15. La curva ROC para esta prueba se muestra en la Figura 2.

25 La adición del biomarcador BMPER, por ejemplo, con una distancia KS de 0,60, mejora significativamente el rendimiento del clasificador a una AUC de 0,947. Obsérvese que la puntuación para un clasificador construido de dos biomarcadores no es una suma simple de las distancias KS; las distancias KS no son aditivas cuando se combinan biomarcadores y se necesitan muchos marcadores más débiles para lograr el mismo nivel de rendimiento que un marcador fuerte. La adición de un tercer marcador, F9, por ejemplo, aumenta el rendimiento del clasificador a una AUC de 0,951. La adición de biomarcadores adicionales, tales como, por ejemplo, CCL23, CRK, BMP1, TPT1, FRZB, MDK e ICAM2, produce una serie de pruebas de mesotelioma resumidas en la Tabla 15 y mostradas como una serie de curvas ROC en la Figura 3. La puntuación de los clasificadores como una función del número de analitos usados en la construcción del clasificador se muestran en la Figura 4. La AUC de este clasificador de diez marcadores a modo de ejemplo es 0,993.

Los marcadores enumerados en la Tabla 1 se pueden combinar de muchas maneras para producir clasificadores para diagnosticar el mesotelioma. En algunas realizaciones, los paneles de biomarcadores están compuestos por diferentes números de analitos dependiendo de un criterio de rendimiento de diagnóstico específico que se selecciona. Por ejemplo, ciertas combinaciones de biomarcadores producirán pruebas que son más sensibles (o más específicas) que otras combinaciones.

Una vez que se define un panel para incluir un conjunto particular de biomarcadores de la Tabla 1 y se construye un clasificador a partir de un conjunto de datos de entrenamiento, se completa la definición de la prueba de diagnóstico. En una realización, el procedimiento utilizado para clasificar una muestra desconocida se resume en la Figura 1A. En otra realización, el procedimiento utilizado para clasificar una muestra desconocida se describe en la Figura 1B. La muestra biológica se diluye adecuadamente y luego se procesa en uno o más ensayos para producir los niveles de biomarcadores cuantitativos relevantes utilizados para la clasificación. Los niveles de biomarcadores medidos se utilizan como entrada para el procedimiento de clasificación que arroja una clasificación y una puntuación opcional para la muestra que refleja la confianza de la asignación de clase.

La Tabla 1 identifica 66 biomarcadores que son útiles para diagnosticar el mesotelioma. Este es un número sorprendentemente mayor de lo esperado cuando se compara con lo que se encuentra normalmente durante los esfuerzos de descubrimiento de biomarcadores y puede atribuirse a la escala del estudio descrito, que abarcó más de 1.000 proteínas medidas en cientos de muestras individuales, en algunos casos en concentraciones en el intervalo femtomolar bajo. Presumiblemente, la gran cantidad de biomarcadores descubiertos refleja las diversas rutas bioquímicas implicadas tanto en la biología del tumor como en la respuesta del cuerpo a la presencia del tumor; cada ruta y proceso involucra a muchas proteínas. Los resultados muestran que ninguna proteína individual de un pequeño grupo de proteínas es únicamente informativa sobre tales procesos complejos; más bien, que múltiples proteínas están involucradas en procesos relevantes, tales como la apoptosis o la reparación de la matriz extracelular, por ejemplo.

Dados los numerosos biomarcadores identificados durante el estudio descrito, cabría esperar obtener un gran número de clasificadores de alto rendimiento que puedan utilizarse en diversos procedimientos de diagnóstico. Para probar esta noción, 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 se pueden

combinar para generar clasificadores útiles. A modo de ejemplo, se proporcionan descripciones para los clasificadores que contienen 1, 2 y 3 biomarcadores para la detección de mesotelioma. Como se describe en el Ejemplo 4, todos los clasificadores que se construyeron utilizando los biomarcadores en la Tabla 1 funcionan claramente mejor que los clasificadores que se construyeron usando "no marcadores".

5 También se probó el rendimiento de los clasificadores obtenidos al excluir aleatoriamente algunos de los marcadores en la Tabla 1, que dio como resultado subconjuntos más pequeños a partir de los cuales construir los clasificadores. Como se describe en el Ejemplo 4, Parte 3, los clasificadores que se construyeron a partir de subconjuntos aleatorios de los marcadores en la Tabla 1 se comportaron de manera similar a los clasificadores óptimos que se construyeron usando la lista completa de marcadores de la Tabla 1.

15 También se probó el rendimiento de los clasificadores de diez marcadores obtenidos al excluir los "mejores" marcadores individuales de la agregación de diez marcadores. Como se describe en el Ejemplo 4, Parte 3, los clasificadores construidos sin los "mejores" marcadores de la Tabla 1 también funcionaron bien. Muchos subconjuntos de los biomarcadores enumerados en la Tabla 1 funcionaron de forma óptima, incluso después de eliminar los 15 principales marcadores enumerados en la Tabla. Esto implica que las características de rendimiento de cualquier clasificador particular probablemente no se deban a un pequeño grupo central de biomarcadores y que el proceso de la enfermedad probablemente afecte a numerosas rutas bioquímicas, lo que altera el nivel de expresión de muchas proteínas.

20 Los resultados del ejemplo 4 sugieren ciertas conclusiones posibles: En primer lugar, la identificación de un gran número de biomarcadores permite su agregación en un gran número de clasificadores que ofrecen un rendimiento similarmente alto. En segundo lugar, los clasificadores pueden construirse de modo que los biomarcadores particulares puedan sustituirse por otros biomarcadores de una manera que refleje las redundancias que indudablemente impregnan las complejidades de los procesos de enfermedad subyacentes. Es decir, la información sobre la enfermedad a la que contribuyó cualquier biomarcador individual identificado en la Tabla 1 se solapa con la información a la que han contribuido otros biomarcadores, de forma que puede ser que ningún biomarcador en particular o un pequeño grupo de biomarcadores en la Tabla 1 deba incluirse en ningún clasificador.

25 Las realizaciones a modo de ejemplo usan clasificadores ingenuos de Bayes construidos a partir de los datos de la Tabla 16 para clasificar una muestra desconocida. El procedimiento se describe en las Figuras 1A y 1B. En una realización, la muestra biológica se diluye opcionalmente y se procesa en un ensayo de aptámeros multiplexado. Los datos del ensayo se normalizan y calibran como se describe en el Ejemplo 3 y los niveles de biomarcadores resultantes se usan como entrada para un esquema de clasificación de Bayes. La razón logarítmica de verosimilitud se calcula para cada biomarcador medido individualmente y, después, se suma para producir una puntuación final de clasificación, que también se conoce como puntuación de diagnóstico. La asignación resultante así como la puntuación general de clasificación pueden notificarse. Opcionalmente, también se pueden notificar los factores de riesgo de la verosimilitud logarítmica individuales computados para cada nivel de biomarcador. Los detalles del cálculo de la puntuación de clasificación se presentan en el Ejemplo 3.

40 **Kits**

Se puede detectar cualquier combinación de los biomarcadores de la Tabla 1 (así como información biomédica adicional) utilizando un kit adecuado, tal como para usar en la realización de los procedimientos descritos en el presente documento. Adicionalmente, cualquier kit puede contener uno o más marcadores detectables como se describe en el presente documento, tal como un resto fluorescente, etc.

50 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 el que los biomarcadores incluyen cualquiera del conjunto de biomarcadores expuesto en la Tabla 1 y, opcionalmente, (b) uno o más productos de software o programas informáticos para clasificar al individuo del que se obtuvo la muestra biológica que tiene o no mesotelioma o para determinar la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma, como se describe adicionalmente en el presente documento. Como alternativa, en lugar de uno o más productos de programas informáticos, se puede proporcionar una o más instrucciones para realizar manualmente las etapas anteriores por parte de un ser humano.

60 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 e informar el resultado del análisis de la muestra biológica.

65 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, guías y datos de referencia.

En un aspecto, la invención proporciona kits para el análisis del estado del mesotelioma. 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 el mesotelioma. 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 el ADN de la 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 un reactivo de captura para cuantificar uno o más biomarcadores en una muestra de prueba, en el que dichos biomarcadores comprenden el conjunto de biomarcadores expuestos en la Tabla 1 o 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 prueba con uno o más puntos de corte predeterminados y asignar una puntuación para cada biomarcador cuantificado según dicha comparación, combinando las puntuaciones asignadas para cada biomarcador cuantificado para obtener una puntuación total, comparando la puntuación total con una puntuación predeterminada y usando dicha comparación para determinar si un individuo tiene mesotelioma. Como alternativa, en lugar de uno o más algoritmos o programas informáticos, se puede proporcionar una o más instrucciones para realizar manualmente las etapas anteriores por parte de un ser humano.

20 Procedimientos y software informáticos

Una vez que se selecciona un biomarcador o panel de biomarcadores, un procedimiento para diagnosticar a un individuo puede comprender lo siguiente: 1) recolectar u obtener de otro modo una muestra biológica; 2) realizar un procedimiento analítico para detectar y medir el biomarcador o biomarcadores en el panel en la muestra biológica; 3) realizar cualquier normalización o estandarización de datos requerida para el procedimiento utilizado para recopilar los valores de biomarcadores; 4) calcular la puntuación del marcador; 5) combinar las puntuaciones del marcador para obtener una puntuación de diagnóstico total; y 6) notificar la puntuación de diagnóstico del individuo. En este enfoque, la puntuación de diagnóstico puede ser un número único determinado a partir de la suma de todos los cálculos de marcador que se compara con un valor umbral preestablecido que es una indicación de la presencia o ausencia de enfermedad. O la puntuación de diagnóstico puede ser una serie de barras que representan un valor de biomarcador y el patrón de las respuestas se puede comparar con un patrón preestablecido para la determinación de la presencia o ausencia de enfermedad.

Al menos algunas realizaciones de los procedimientos descritos en el presente documento pueden implementarse con el uso de un ordenador. En la figura 6 se muestra un ejemplo de un sistema informático 100. Con referencia a la figura 6, el sistema 100 se muestra compuesto por elementos de hardware que están acoplados eléctricamente a través del bus 108, que incluye un procesador 101, un dispositivo de entrada 102, un dispositivo de salida 103, un dispositivo de almacenamiento 104, un lector de medios de almacenamiento legible por ordenador 105a, aceleración de procesamiento del sistema de comunicaciones 106 (por ejemplo, DSP o procesadores de propósito especial) 107 y memoria 109. El lector de medios de almacenamiento legible por ordenador 105a está acoplado además a medios de almacenamiento legibles por ordenador 105b, representando la combinación de manera integral dispositivos de almacenamiento remotos, local, fijos y / o extraíbles, además de medios de almacenamiento, memoria, etc., para información que puede leerse de forma temporal y / o permanente, que puede incluir el dispositivo de almacenamiento 104, memoria 109 y / o cualquier otro recurso de sistema 100 accesible. El sistema 100 también comprende elementos de software (que se muestran localizados actualmente dentro de la memoria de trabajo 191) que incluyen un sistema operativo 192 y otro código 193, tales como programas, datos y similares.

Con respecto a la Figura 6, el sistema 100 tiene una amplia flexibilidad y configurabilidad. Por tanto, por ejemplo, se puede utilizar una única arquitectura para implementar uno o más servidores que pueden configurarse adicionalmente de acuerdo con protocolos deseables, variaciones de protocolo, extensiones, etc. Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que las realizaciones bien puede utilizarse de acuerdo con requisitos de aplicación más específicos. Por ejemplo, uno o más elementos del sistema podrían implementarse como subelementos dentro de un componente del sistema 100 (por ejemplo, dentro del sistema de comunicaciones 106). También se puede utilizar hardware personalizado y / o se pueden implementar elementos particulares en el hardware, el software o ambos. Además, aunque puede emplearse la conexión a otros dispositivos informáticos, tales como dispositivos de entrada / salida de red (no mostrados), debe entenderse que también se pueden utilizar conexiones cableadas, inalámbricas, módem y / o de otros tipos a otros dispositivos informáticos.

En un aspecto, el sistema puede comprender una base de datos que contiene características de biomarcadores característicos del mesotelioma. Los datos de biomarcadores (o información de biomarcadores) se pueden utilizar como una entrada al ordenador para usar como parte de un procedimiento implementado por ordenador. Los datos de biomarcadores pueden incluir los datos como se describe en el presente documento.

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

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

5 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 un lector de chips de genes.

10 El sistema adicionalmente puede comprender un sistema de gestión de base de datos. Las solicitudes o consultas de los usuarios pueden formatearse en un lenguaje apropiado que entienda el sistema de gestión de la base de datos que procesa la consulta para extraer la información relevante de la base de datos de los conjuntos de entrenamiento.

15 El sistema puede conectarse a una red a la que están conectados 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 es conocido en la materia. Preferentemente, el servidor incluye el hardware necesario para ejecutar los productos del programa informático (por ejemplo, el software) para acceder a los datos de la base de datos para procesar las solicitudes del usuario.

20 El sistema puede incluir un sistema operativo (por ejemplo, UNIX o Linux) para ejecutar instrucciones desde un sistema de gestión de bases de datos. En un aspecto, el sistema operativo puede operar en una red de comunicaciones global, tal como internet y utilizar un servidor de red de comunicaciones global para conectarse a dicha red.

25 El sistema puede incluir uno o más dispositivos que comprenden una interfaz de visualización gráfica que comprende elementos de interfaz tales como botones, menús desplegados, barras de desplazamiento, campos para introducir texto y similares, como se encuentran rutinariamente en interfaces gráficas de usuario conocidas en la técnica. Las solicitudes introducidas en una interfaz de usuario pueden transmitirse 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 solicitudes o consultas introducidas por un usuario se pueden construir en cualquier lenguaje de base de datos adecuado.

30 La interfaz gráfica de usuario puede generarse mediante un código de interfaz gráfica de usuario como parte del sistema operativo y puede usarse para ingresar datos y / o para visualizar los datos introducidos. El resultado de los datos procesados puede mostrarse 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 de un medio legible por ordenador.

35 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, un chip de gen o un lector de matriz, y similares.

40 Los procedimientos y aparatos para analizar la información del biomarcador de mesotelioma de acuerdo con diversas realizaciones pueden implementarse de cualquier manera adecuada, por ejemplo, usando un programa informático que opera en un sistema informático. Se puede usar un sistema informático convencional que comprende un procesador y una memoria de acceso aleatorio, tal como un servidor de aplicaciones accesible remotamente, un servidor de red, un ordenador personal o una estación de trabajo. Los componentes adicionales del sistema informático 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, un teclado y dispositivo de seguimiento convencionales. El sistema informático puede ser un sistema autónomo o parte de una red de ordenadores que incluye un servidor y una o más bases de datos.

45 El sistema de análisis de biomarcador de mesotelioma puede proporcionar funciones y operaciones para completar el análisis de datos, tal como recopilación de datos, procesamiento, análisis, notificación y / o diagnóstico. Por ejemplo, en una realización, el sistema informático puede ejecutar el programa informático que puede recibir, almacenar, buscar, analizar y notificar información relacionada con los biomarcadores de mesotelioma. El programa informático puede comprender múltiples módulos que realizan diversas funciones u operaciones, tales como un módulo de procesamiento para procesar datos brutos y generar datos complementarios y un módulo de análisis para analizar datos brutos y datos complementarios para generar un estado y / o diagnóstico de mesotelioma. El diagnóstico del estado del mesotelioma puede comprender la generación o recopilación de cualquier otra información, incluida información biomédica adicional, con respecto a la afección del individuo en relación con la enfermedad, la identificación de si pueden ser deseables pruebas adicionales o la evaluación del estado de salud del individuo.

50 En referencia ahora a la Figura 7, se puede ver un ejemplo de un procedimiento para utilizar un ordenador de acuerdo con los principios de una realización divulgada. En la Figura 7, se muestra un diagrama de flujo 3000. En el bloque 3004, la información de biomarcadores se puede recuperar para un individuo. La información de

- biomarcadores se puede recuperar de una base de datos informática, por ejemplo, después de realizar la prueba de la muestra biológica del individuo. La información de biomarcadores puede comprender valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos biomarcadores N seleccionados de un grupo que consiste en los biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, en la que $N = 2-66$. En el bloque 3008, se puede utilizar un ordenador
- 5 para clasificar cada uno de los valores de biomarcadores. Y, en el bloque 3012, se puede hacer una determinación en cuanto a la probabilidad de que un individuo tenga mesotelioma basado en una pluralidad de clasificaciones. La indicación puede enviarse a una pantalla u otro dispositivo indicador para que pueda ser vista por una persona. Por tanto, por ejemplo, puede mostrarse en una pantalla de un ordenador u otro dispositivo de salida.
- 10 En referencia ahora a la Figura 8, se puede ilustrar un procedimiento alternativo para utilizar una computadora de acuerdo con otra realización a través del diagrama de flujo 3200. En el bloque 3204, se puede utilizar un ordenador para recuperar información de biomarcadores para un individuo. La información de biomarcadores comprende un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador seleccionado del grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1. En el bloque 3208, se puede realizar una clasificación del valor del biomarcador con el ordenador. Y, en
- 15 el bloque 3212, se puede hacer una indicación sobre la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma basado en la clasificación. La indicación puede enviarse a una pantalla u otro dispositivo indicador para que pueda ser vista por una persona. Por tanto, por ejemplo, puede mostrarse en una pantalla de un ordenador u otro dispositivo de salida.
- 20 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 legible por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el medio para hacer que un programa de aplicación se ejecute en un ordenador con una base de datos.
- 25 Como se usa en el presente documento, un "producto de programa informático" se refiere a un conjunto organizado de instrucciones en forma de enunciados de 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 se puede usar con un ordenador u otro sistema automatizado de procesamiento de datos. Tales enunciados de lenguaje de programación, cuando son ejecutadas por una computadora o sistema de procesamiento de datos, hacen que el ordenador o el
- 30 sistema de procesamiento de datos actúen de acuerdo con el contenido particular de las enunciados. Los productos del programa informático incluyen sin limitación: programas en código fuente y objeto y / o bibliotecas de prueba o de datos integradas en un medio legible por ordenador. Adicionalmente, el producto de programa informático que permite que un sistema informático o un dispositivo de procesamiento de datos actúe de formas preseleccionadas puede proporcionarse de varias formas, incluyendo, pero sin limitación, código fuente original, código de ensamblaje,
- 35 código de objeto, lenguaje de la máquina, versiones encriptadas o comprimidas de lo anterior y todos los equivalentes.
- En un aspecto, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de mesotelioma. El producto de programa informático incluye un medio legible por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: un
- 40 código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores en la muestra biológica seleccionados entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1, en la que $n = 2-66$; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de mesotelioma del individuo en función de los
- 45 valores de biomarcadores.
- En otro aspecto más, se proporciona un producto de programa informático para indicar una probabilidad de mesotelioma. El producto de programa informático incluye un medio legible por ordenador que incorpora código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de
- 50 programa: un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden un valor de biomarcador correspondiente a un biomarcador en la muestra biológica seleccionado entre el grupo de biomarcadores proporcionado en la Tabla 1; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de mesotelioma del individuo en función del valor del biomarcador.
- 55 Aunque se han descrito varias realizaciones como procedimientos o aparatos, debe entenderse que las realizaciones pueden implementarse a través del código acoplado a un ordenador, por ejemplo, un código residente en una computadora o accesible por el ordenador. Por ejemplo, el software y las bases de datos podrían utilizarse para implementar muchos de los procedimientos mencionados anteriormente. Por tanto, además de las realizaciones realizadas por hardware, también se observa que estas realizaciones se pueden realizar mediante el
- 60 uso de un artículo de fabricación compuesto por un medio utilizable por ordenador que tiene un código de programa legible por ordenador incorporado en el mismo, lo que provoca la habilitación de las funciones divulgadas en esta descripción. Por lo tanto, se desea que las realizaciones también se consideren protegidas por esta patente en sus medios de código de programa también. Adicionalmente, las realizaciones pueden incorporarse como código almacenado en una memoria legible por ordenador de prácticamente cualquier tipo que incluye, sin limitación, RAM,
- 65 ROM, medios magnéticos, medios ópticos o medios magneto-ópticos. Incluso más generalmente, las realizaciones podrían implementarse en el software o en el hardware, o cualquier combinación de los mismos, incluyendo, pero sin

limitación, software que se ejecuta en un procesador de propósito general, microcódigo, PLA o ASIC.

5 También se prevé que las realizaciones podrían realizarse como señales de ordenador incorporadas en una onda portadora, así como señales (por ejemplo, eléctricas y ópticas) propagadas a través de un medio de transmisión. Por tanto, los diversos tipos de información discutidos anteriormente podrían formatearse en una estructura, tales como una estructura de datos y transmitirse como una señal eléctrica a través de un medio de transmisión o almacenarse en un medio legible por ordenador.

10 También se observa que muchas de las estructuras, materiales y actos enumerados en el presente documento se pueden citar como medios para realizar una función o paso para realizar una función. Por lo tanto, debe entenderse que dicho lenguaje tiene derecho a cubrir todas las estructuras, materiales o actos divulgados en esta especificación y sus equivalentes.

15 El proceso de identificación de biomarcadores, la utilización de los biomarcadores divulgados en el presente documento y los diversos procedimientos para determinar los valores de biomarcadores se describen con detalle anteriormente con respecto al mesotelioma. Sin embargo, la aplicación del proceso, el uso de biomarcadores identificados y los procedimientos para determinar los valores de biomarcadores son totalmente aplicables a otros tipos específicos de cáncer, al cáncer en general, o a cualquier otra enfermedad o afección médica o a la identificación de individuos que pueden o no ser beneficiados por un tratamiento médico auxiliar. Excepto cuando se refiere a resultados específicos relacionados con el mesotelioma, como queda claro a partir del contexto, puede entenderse que las referencias en el presente documento al mesotelioma incluyen otros tipos de cáncer, cáncer en general o cualquier otra enfermedad o afección médica.

25 Ejemplos

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

30 Ejemplo 1. Análisis de muestras con aptámeros multiplexados

35 Este ejemplo describe el ensayo de aptámeros multiplexado utilizado para analizar las muestras y los controles para la identificación de los biomarcadores establecidos en la Tabla 1 (véase la Figura 9) y la identificación de los biomarcadores de cáncer expuestos en la Tabla 19. Para los estudios de mesotelioma, cáncer de pulmón y carcinoma de células renales, el análisis multiplexado utilizó 1045 aptámeros, cada uno exclusivo para una diana específica.

40 En este procedimiento, las puntas de la pipeta se cambiaron para cada adición de solución.

45 Asimismo, salvo que se indique de otro modo, la mayoría de las transferencias de solución y adiciones de lavado usaron la cabeza de 96 pocillos de un Beckman Biomek FxP. Las etapas del procedimiento pipeteadas manualmente utilizaron un P200 Pipetteman de doce canales (Rainin Instruments, LLC, Oakland, CA), a menos que se indique otra cosa. Se preparó internamente un tampón adaptado denominado SB17, que comprende HEPES 40 mM, NaCl 100 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM, EDTA 1 mM a pH 7,5. Se preparó internamente un tampón adaptado denominado SB18, que comprende HEPES 40 mM, NaCl 100 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 5 mM a pH 7,5. Todas las etapas se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique lo contrario.

50 1. Preparación de la solución madre de aptámeros

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

55 Estas soluciones se almacenan a -20 °C hasta su uso. El día del ensayo, cada mezcla de aptámero se descongeló a 37 °C durante 10 minutos, se colocó en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos y se dejó enfriar a 25 °C durante 20 minutos con mezcla enérgica entre cada etapa de calentamiento. Después de calentar-enfriar, 55 µl de cada mezcla de 2x aptámeros, se pipeteó manualmente en una placa Hybaid de 96 pocillos y la lámina de la placa se selló. El resultado final fue tres placas Hybaid selladas con papel de aluminio de 96 pocillos con mezclas de 5 %, 0,316 % o 0,01 % de aptámero. La concentración del aptámero individual fue 2x final o 1 nM.

60 2. Preparación de la muestra de ensayo

65 Se colocaron alícuotas congeladas de suero o plasma al 100%, almacenadas a -80 °C, en un baño de agua a 25 °C durante 10 minutos. Las muestras descongeladas se colocaron en hielo, se agitaron en vórtex suavemente (en 4)

durante 8 segundos y luego se reemplazaron en hielo.

Se preparó una solución de muestra al 10 % (2x final) transfiriendo 8 µl de la muestra usando un pipeteador de 8 canales de 50 µl en placas Hybaid de 96 pocillos, cada pocillo contiene 72 µl del diluyente de muestra apropiado a 4 °C (1x SB17 para suero o 0,8x SB18 para plasma, más 0,06 % de Tween-20, Z-block_2 11,1 µM, MgCl₂ 0,44 mM, AEBSF 2,2mM, EGTA 1,1 mM, EDTA 55,6 µM). Esta placa se almacenó en hielo hasta que se iniciaron las siguientes etapas de dilución de la muestra en el robot Biomek FxP.

Para comenzar el equilibrio de la muestra y el aptámero, la placa de muestra al 10 % se centrifugó brevemente y se colocó en el Beckman FX donde se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo con la pipeta de 96 pocillos. A continuación, se preparó una placa de muestra al 0,632 % (2x final) diluyendo 6 µl de la muestra del 10 % en 89 µl de 1xSB17, Tween-20 al 0,05 % con AEBSF 2 mM. A continuación, la dilución de 6 µl de la muestra resultante al 0,632 % en 184 µl de 1xSB17, Tween-20 al 0,05 % hizo una placa de muestra de 0,02 % (2x final). Las diluciones se realizaron en Beckman Biomek FxP. Después de cada transferencia, las soluciones se mezclaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Las 3 placas de dilución de muestras se transfirieron luego a sus respectivas soluciones de aptámeros añadiendo 55 µl de la muestra a 55 µl de la mezcla apropiada de 2x aptámeros. Las soluciones de muestra y aptámeros se mezclaron en el robot pipeteando hacia arriba y hacia abajo.

3. Unión de equilibrado de la muestra

Las placas de muestra/aptámero se sellaron con papel de aluminio y se colocaron en una incubadora a 37 °C durante 3,5 horas antes de proceder a la etapa de Captura 1.

4. Preparación de la placa de perlas de captura 2

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

5. Preparación de las placas de perlas de captura 1

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

6. Carga del Cytomat

El citómetro se cargó con todas las puntas, placas, todos los reactivos en canales (excepto el reactivo NHS-biotina que se preparó nuevo justo antes de la adición a las placas), 3 placas filtrantes 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 muestra/aptámero se retiraron de la incubadora, se centrifugaron durante aproximadamente 1 minuto, se retiró la cubierta y se colocaron en la cubierta de Beckman Biomek FxP. Se inició el programa Beckman Biomek FxP. Todas las etapas posteriores en la Captura 1 fueron realizados por el robot Beckman Biomek FxP a menos que se indique lo contrario. Dentro del programa, se aplicó vacío a las placas de filtro de Captura 1 para eliminar el sobrenadante de las perlas. Se añadieron cien microlitros de cada una de las reacciones de unión de equilibrado al 5 %, 0,316 % y 0,01 % se añadieron a sus placas de filtración de Captura 1 respectivas y cada placa se mezcló usando un agitador orbital en la cubierta a 800 rpm durante 10 minutos.

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

8. Marcaje

Una alícuota de NHS-PEO4-biotina 100 mM en DMSO anhidro se descongeló a 37 °C durante 6 minutos y luego se diluyó 1:100 con tampón de marcaje (SB17 a pH 7,25, Tween-20 al 0,05 %). Cuando indicó un robot, el reactivo NHS-PEO4-biotina diluido se añadió manualmente a un recipiente en la plataforma y el programa del robot se reinició manualmente para dispensar 100 µl de NHS-PEO4-biotina en cada pocillo de cada placa de filtro de Captura 1. Esta solución se dejó incubar con perlas de Captura 1 con agitación a 800 rpm durante 5 minutos en los agitadores orbitales.

10 9. Exposición cinética y fotoescisión

La reacción de marcaje se eliminó mediante filtración al vacío y se inactivó mediante la adición de 150 µl de glicina 20 mM en 1x SB17, Tween-20 al 0,05 % en las placas de Captura 1. La solución de NHS-marcador/ glicina se eliminó por filtración al vacío. A continuación, se añadieron 1.500 µl de glicina 20 mM de (1x SB17, Tween-20 al 0,05 %) a cada placa y se incubó durante 1 minuto en agitadores orbitales a 800 rpm antes de la eliminación por filtración al vacío.

Los pocillos de las placas de Captura 1 se lavaron tres veces añadiendo 190 µl de 1x SB17, Tween-20 al 0,05 %, seguido de filtración al vacío y, después, añadiendo 190 µl 1x SB17, Tween-20 al 0,05 % con agitación durante 1 minuto a 800 rpm, seguido de filtración al vacío. Después del último lavado, las placas se colocaron en la parte superior de una placa de pocillo profundo de 1 ml y se retiraron de la plataforma. Las placas de Captura 1 se centrifugaron a 1.000 rpm durante 1 minuto para eliminar tanto volumen extraño de las perlas de agarosa antes de la elución como sea posible.

Las placas se volvieron a colocar en Beckman Biomek FxP y se añadieron 85 µl de DxSO4 10 mM en 1x SB17, Tween-20 al 0,05 % a cada pocillo de las placas de filtro.

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

Las soluciones fotoescindidas se eluyeron secuencialmente de cada placa de Captura 1 en una placa de pocillo profundo común colocando primero la placa de filtro de Captura 1 del 5 % en la parte superior de una placa de pocillo profundo de 1 ml y centrifugando a 1.000 rpm durante 1 minuto. Las placas de Captura 1 de 0,316 % y 0,01 % se centrifugaron secuencialmente en la misma placa de pocillos profundos.

10. Captura de perlas de Captura 2

El bloque de pocillo profundo de 1 ml que contiene las fracciones eluidas combinados de la Captura 1 se colocó en la plataforma de Beckman Biomek FxP para la Captura 2.

El robot transfirió toda la fracción eluida fotoescindida de la placa de pocillos profundos de 1 ml a la placa Hybaid que contenía las perlas magnéticas de Captura 2 MyOne preparadas previamente (después de la eliminación del tampón MyOne por separación magnética).

La solución se incubó en agitación a 1.350 rpm durante 5 minutos a 25 °C en un TeriShag Thermoshaker (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA).

El robot transfirió la placa a la estación de separación magnética en la plataforma. La placa se incubó en el imán durante 90 segundos antes de la eliminación y el descarte del sobrenadante.

11. Lavados con 30 % de glicerol a 37 °C

La placa DE Captura 2 se movió al agitador térmico en la plataforma y se transfirieron 75 µl de 1x SB17, Tween-20 al 0,05 % a cada pocillo. La placa se mezcló durante 1 minuto a 1.350 rpm y a 37 °C para resuspender y calentar las perlas. A cada pocillo de la placa de Captura 2, se transfirieron 75 µl de 60 % de glicerol a 37 °C y la placa continuó mezclándose durante otro minuto a 1.350 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, a continuación, el robot eliminó y descartó el sobrenadante. Estos lavados se repitieron dos veces más.

Después de eliminar el tercer lavado con glicerol al 30 % de las perlas de Captura 2, se añadieron 150 µl de 1x SB17, Tween-20 al 0,05 % a cada pocillo y se incubaron a 37 °C, agitando a 1.350 rpm durante 1 minuto, antes de eliminarlo por separación magnética en el imán a 37 °C.

Las perlas de Captura 2 se lavaron por última vez usando 150 µl 1x SB17, Tween-20 al 0,05 % con incubación

durante 1 minuto en agitación a 1.350 rpm a 25 °C antes de la separación magnética.

12. Elución de las perlas de Captura 2 y neutralización

- 5 Los aptámeros se eluyeron de las perlas de Captura 2 añadiendo 105 µl de CAPSO 100 mM con NaCl 1 M, Tween-20 al 0,05 % en cada pocillo. Las perlas se incubaron con esta solución con agitación a 1.300 rpm durante 5 minutos.

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

13. Hibridación

- 15 El Beckman Biomek FxP transfirió 20 µl de la fracción eluida de Captura 2 neutralizada a una placa Hybaid fresca y a cada pocillo se añadieron 6 µl de 10x Agilent Bloc, que contiene un pico de 10x de controles de hibridación. A continuación, manualmente se pipetearon 30 µl de tampón de hibridación 2x Agilent en cada pocillo de la placa que contenía las muestras neutralizadas y el tampón de bloqueo y la solución se mezcló pipeteando manualmente 25 µl arriba y abajo 15 veces lentamente para evitar la formación de burbujas extensas. La placa se centrifugó a 1.000 rpm durante 1 minuto.

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

- 30 Se colocó un portaobjetos de tipo junta en una cámara de hibridación Agilent y se pipetearon manualmente 40 µl de cada una de las muestras que contenían la solución de hibridación y bloqueo en cada junta. Se usó un pipeteador de expansión variable de 8 canales de una manera destinada a minimizar la formación de burbujas. Se diseñaron portaobjetos de micromatrices adaptados Agilent (Agilent Technologies, Inc., con su código de barras numérico hacia arriba, se bajaron lentamente sobre los portaobjetos de tipo junta (consulte el manual de Agilent para obtener una descripción detallada).

- 40 La parte superior de las cámaras de hibridación se colocaron en el sándwich de deslizamiento/respaldo y las abrazaderas de sujeción se deslizaron sobre todo el conjunto. Estos conjuntos se sujetaron firmemente apretando los tornillos de forma segura.

Cada sándwich de portaobjetos de deslizamiento/respaldo se inspeccionó visualmente para asegurar que la burbuja de solución se pudiera mover libremente dentro de la muestra. Si la burbuja no se movía libremente, el conjunto de la cámara de hibridación se golpeó suavemente para desacoplar las burbujas alojadas cerca de la junta.

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

14. Lavado posterior a la hibridación

- 50 Se colocaron aproximadamente 400 ml de tampón de lavado Agilent 1 en cada uno 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 gradilla de portaobjetos y una barra de agitación en el tampón.

- 55 Se preparó una placa de tinción para Agilent Wash 2 colocando una barra de agitación en una placa de tinción de vidrio vacía.

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

- 60 Se desmontó cada una de las seis cámaras de hibridación. Uno a uno, el sándwich de deslizamiento/respaldo se retiró de su cámara de hibridación y se sumergió en la placa de tinción que contenía el Lavado 1. El sándwich de deslizamiento/respaldo se separó usando un par de pinzas, mientras se seguía sumergiendo el portaobjetos de micromatrices. El portaobjetos se transfirió rápidamente a la gradilla de portaobjetos en la placa de tinción del Lavado 1 en la placa de agitación magnética.

- 65 La gradilla de portaobjetos se subió y bajó suavemente 5 veces. El agitador magnético se encendió en un ajuste bajo y los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos.

5 Cuando quedaba un minuto para el lavado 1, se añadió tampón de lavado 2 previamente calentado a 37 °C en una incubadora a la segunda placa de tinción preparada. La gradilla de portaobjetos se transfirió rápidamente al tampón de lavado 2 y se eliminó cualquier exceso de tampón en el fondo del portaobjetos raspándolo en la parte superior de la placa de tinción. La gradilla de portaobjetos se subió y bajó suavemente 5 veces. El agitador magnético se encendió en un ajuste bajo y los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos.

La gradilla de portaobjetos se sacó lentamente del lavado 2, requiriendo aproximadamente 15 segundos para retirar los portaobjetos de la solución.

10 Cuando quedaba un minuto del lavado 2, se añadió acetonitrilo (ACN) a la cuarta placa de tinción. La gradilla de portaobjetos se transfirió a la placa de tinción con acetonitrilo. La gradilla de portaobjetos se subió y bajó suavemente 5 veces. El agitador magnético se encendió en un ajuste bajo y los portaobjetos se incubaron durante 5 minutos.

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

20 15. Formación de imágenes por micromatrices

Los portaobjetos de micromatrices se colocaron en portaobjetos de escáner Agilent y se cargaron en el escáner Agilent Microarray de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

25 Se realizaron imágenes de los portaobjetos en el canal Cy3 en 5 μm resolución en el ajuste 100 % de PMT y la opción XRD habilitada en 0,05. Las imágenes tiff resultantes se procesaron con el software de extracción de características Agilent versión 10.5.

Ejemplo 2. Identificación de biomarcadores

30 La identificación de potenciales biomarcadores de mesotelioma se realizó para el diagnóstico de mesotelioma en individuos expuestos al amianto. Los criterios de inclusión para este estudio fueron edad superior a 18 años, capaz de otorgar un consentimiento informado y de proporcionar una muestra de sangre y tener un diagnóstico documentado de mesotelioma o hallazgos benignos. Para los casos, muestras de sangre recolectadas antes del tratamiento o cirugía y posteriormente diagnosticadas con mesotelioma. Los criterios de exclusión incluyeron el diagnóstico previo o el tratamiento del cáncer (excluyendo el carcinoma escamoso de la piel) en un plazo de 5 años antes de la extracción de sangre. Se recogieron muestras de suero de 4 puntos diferentes e incluyeron 158 muestras de mesotelioma y 140 muestras de grupo de control como se describe en la Tabla 17. El ensayo de afinidad de aptámeros multiplexado como se describe en el Ejemplo 1 se usó para medir y notificar el valor de RFU para 1.045 analitos en cada una de estos 298 muestras. Dado que las muestras de suero se obtuvieron de 4 estudios independientes y sitios bajo protocolos similares, se realizó un examen de las diferencias del sitio antes del análisis para el descubrimiento de biomarcadores.

45 Cada una de las poblaciones de casos y controles se compararon separadamente mediante la generación de funciones de distribución acumulativa dependientes de la clase (cdfs) para cada uno de los 1.045 analitos. La distancia KS (estadística Kolmogorov-Smirnov) entre los valores de dos conjuntos de muestras es una medida no paramétrica del grado 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, una proporción de los valores del Conjunto A será menor que T, y una 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 elección de T.

55 Este conjunto de biomarcadores potenciales se puede usar para construir clasificadores que asignan muestras a un grupo de control o de enfermedad. De hecho, muchos de tales clasificadores se produjeron a partir de estos conjuntos de biomarcadores y se determinó la frecuencia con la que se utilizó cualquier biomarcador en los buenos clasificadores de puntuación. Los biomarcadores que aparecieron con mayor frecuencia entre los clasificadores de puntuación más importantes fueron los más útiles para crear una prueba de diagnóstico. En este ejemplo, los clasificadores bayesianos se usaron para explorar el espacio de clasificación, pero se pueden emplear muchas otras técnicas de aprendizaje supervisado para este fin. La idoneidad de la puntuación de cualquier clasificador individual se midió con el área bajo la curva característica operacional del receptor (AUC 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 libre de errores. Los detalles de construir un clasificador bayesiano a partir de mediciones de poblaciones de biomarcadores se describen en el Ejemplo 3.

65 Utilizando los 66 analitos en la Tabla 1, se encontró un total de 925 clasificadores de 10 analitos con una AUC de 0,99 para diagnosticar mesotelioma del grupo de control. A partir de este conjunto de clasificadores, se encontró un total de 10 biomarcadores en el 30 % o más de los clasificadores de puntuación alta. La Tabla 13 proporciona una

lista de estos biomarcadores potenciales y la Figura 10 es una gráfica de la frecuencia para los biomarcadores identificados.

Ejemplo 3. Clasificación ingenua bayesiana para el mesotelioma

De la lista de biomarcadores identificados como útiles para discriminar entre mesotelioma y controles, se seleccionó un panel de diez biomarcadores y se construyó un clasificador ingenuo de Bayes, véanse las Tablas 16 y 18. Las funciones de densidad de probabilidad dependientes de clase (pdfs), $p(x_i|c)$ y $p(x_i|d)$, donde x_i es el log del valor medido de RFU para el biomarcador i , y c y d se refieren a las poblaciones de control y enfermedad, se modelaron como funciones de distribución normal logarítmica caracterizadas por una media μ y una varianza σ^2 . Los parámetros para los pdfs de los diez biomarcadores se enumeran en la Tabla 16 y en la Figura 5 se muestra un ejemplo de los datos brutos junto con el ajuste del modelo a un pdf normal. La suposición subyacente parece ajustar los datos bastante bien, como se pone de manifiesto en la Figura 5.

La clasificación ingenua de Bayes para dicho modelo viene dada por la siguiente ecuación, en la que $p(d)$ es la prevalencia de la enfermedad en la población,

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

apropiado para la prueba y $n = 10$. Cada uno de los términos en la suma es una razón de la verosimilitud logarítmica para un marcador individual y la razón de la verosimilitud logarítmica total de una muestra estar libre de la enfermedad de interés (es decir, en este caso, mesotelioma) frente a tener la enfermedad es simplemente la suma de estos términos individuales más un término que representa la prevalencia de la enfermedad. Para simplificar,

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

suponemos $p(d) = 0,5$ de modo que

Dada una medición de muestra desconocida en $\log(\text{RFU})$ para cada uno de los diez biomarcadores de 9,6, 8,0, 7,4, 7,0, 7,3, 8,9, 7,3, 8,3, 10,0, 7,3, el cálculo de la clasificación se detalla en la Tabla 16. Los componentes individuales que comprenden la razón de verosimilitud logarítmica para la enfermedad frente a la clase de control se tabulan y se pueden calcular a partir de los parámetros en la Tabla 16 y los valores de \tilde{x} . La suma de las razones de verosimilitud logarítmica individuales es -6,364 o la probabilidad de estar libre de la enfermedad frente a tener la enfermedad de 581, en la que la probabilidad $e^{6,364} = 581$. Los primeros valores de 1 biomarcador tienen probabilidades más consistentes con el grupo de la enfermedad (probabilidad logarítmica > 0), pero se ha hallado de forma consistente que los 9 biomarcadores restantes favorecen al grupo de control. Al multiplicar las probabilidades juntas se obtienen los mismos resultados que se muestran anteriormente; una probabilidad de 581 de que la muestra desconocida esté libre de la enfermedad. De hecho, esta muestra provino de la población de control en el conjunto de entrenamiento.

Ejemplo 4. Algoritmo ambicioso para seleccionar paneles de biomarcadores para clasificadores.

Este ejemplo describe la selección de biomarcadores de la Tabla 1 para formar paneles que pueden usarse como clasificadores en cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. Los subconjuntos de los biomarcadores en la Tabla 1 se seleccionaron para construir clasificadores con buen rendimiento. Este procedimiento también se usó para determinar qué marcadores potenciales se incluyeron como biomarcadores en el Ejemplo 2.

La medida del rendimiento del clasificador utilizado aquí es la AUC; un rendimiento de 0,5 es la expectativa de referencia para un clasificador aleatorio (lanzamiento de moneda), un clasificador peor que el azar puntuaría entre 0,0 y 0,5, un clasificador con un rendimiento mejor que el aleatorio puntuaría 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 procedimientos descritos en el Ejemplo 4 a otras medidas comunes de rendimiento, tal como la medida F, la suma de sensibilidad y especificidad, o el producto de la sensibilidad y la especificidad. Específicamente, se podría tratar la sensibilidad y la especificidad con diferente peso, para seleccionar los clasificadores que funcionan con mayor especificidad a expensas de alguna sensibilidad, o para seleccionar los clasificadores que funcionan con mayor sensibilidad a expensas de alguna especificidad. Dado que el procedimiento descrito en el presente documento solo implica una medida de "rendimiento", se puede utilizar cualquier esquema de ponderación que dé como resultado una única medida de rendimiento. Las diferentes aplicaciones tendrán diferentes beneficios para los hallazgos positivos verdaderos y negativos verdaderos, y también los diferentes costes asociados con los hallazgos falsos positivos de los hallazgos falsos negativos. Por ejemplo, la detección selectiva de individuos de alto riesgo asintomáticos y el diagnóstico diferencial de mesotelioma a partir de síntomas pleurales benignos no tendrán, en general, el mismo compromiso óptimo entre especificidad y sensibilidad. Las diferentes demandas de las dos pruebas generalmente

requerirán establecer una ponderación diferente a las clasificaciones erróneas positivas y negativas, que se reflejarán en la medida del rendimiento. El cambio de la medida de rendimiento generalmente cambiará el subconjunto exacto de marcadores seleccionados de la Tabla 1 para un conjunto de datos dado.

5 Para el enfoque Bayesiano para la discriminación de muestras de mesotelioma de muestras de control descritas en el Ejemplo 3, el clasificador se parametrizó completamente mediante la distribución de biomarcadores en las muestras de entrenamiento de enfermedad y benigno, y la lista de biomarcadores se eligió de la Tabla 1; es decir, el subconjunto de marcadores elegidos para la inclusión determinó un clasificador en una forma individual dado un conjunto de datos de entrenamiento.

10 El procedimiento ambicioso empleado en el presente documento se utilizó para buscar el subconjunto óptimo de marcadores de la Tabla 1. Para un pequeño número de marcadores o clasificadores con relativamente pocos marcadores, cada subconjunto posible de marcadores se enumeraron y evaluaron en términos del rendimiento del clasificador construido con ese conjunto particular de marcadores (véase el Ejemplo 4, parte 2). (Este enfoque es bien conocido en el campo de las estadísticas como "mejor selección de subconjuntos"; véase, por ejemplo, Hastie et al). Sin embargo, para los clasificadores descritos en el presente documento, el número de combinaciones de marcadores múltiples puede ser muy grande, y no fue posible evaluar cada conjunto posible de 10 marcadores, ya que hay 30.045.015 posibles combinaciones que se pueden generar a partir de una lista de solo 30 analitos totales. Debido a la imposibilidad de buscar a través de cada subconjunto de marcadores, es posible que no se encuentre el único subconjunto óptimo; sin embargo, al usar este enfoque, se encontraron muchos subconjuntos excelentes y, en muchos casos, cualquiera de estos subconjuntos puede representar uno óptimo.

25 En lugar de evaluar todos los posibles conjuntos de marcadores, se puede seguir un enfoque progresivo directo "ambicioso" (véase, por ejemplo, Dabney AR, Storey JD (2007) Optimality Driven Nearest Centralid Classification from Genomic Data. PLoS ONE 2(10): e1002. doi:10.1371/journal.pone.0001002). Usando este procedimiento, se inicia un clasificador con el mejor marcador individual (Según la distancia KS para los marcadores individuales) y se cultiva en cada paso probando, a su vez, cada miembro de una lista de marcadores que actualmente no es 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 logran más mejoras en el rendimiento. Lamentablemente, este enfoque puede pasar por alto valiosas combinaciones de marcadores para los cuales algunos de los marcadores individuales no son todos elegidos antes de que se detenga el proceso.

35 El procedimiento ambicioso utilizado en el presente documento fue una elaboración del enfoque paso a paso anterior, porque, para ampliar la búsqueda, en lugar de mantener solo un clasificador candidato (subconjunto de marcador) en cada etapa, se mantuvo una lista de clasificadores candidatos. La lista se sembró con cada subconjunto de marcadores (usando cada marcador en la tabla por sí mismo). La lista se amplió por etapas al derivar nuevos clasificadores (subconjuntos de marcadores) de los que están actualmente en la lista y añadirlos a la lista. Cada subconjunto de marcadores actualmente en la lista se amplió añadiendo cualquier marcador de la Tabla 1 que no formara parte de ese clasificador y que, al sumarse al subconjunto, no duplicaría un subconjunto existente (estos se denominan "marcadores permisibles"). Todos los subconjuntos de marcadores existentes se extendieron por cada marcador permitido de la lista. De manera clara, tal proceso eventualmente generaría cada subconjunto posible, y la lista se quedaría sin espacio. Por lo tanto, todos los clasificadores generados se mantuvieron solo mientras la lista era menor que algún tamaño predeterminado (con frecuencia suficiente para contener los tres subconjuntos de marcadores). Una vez que la lista alcanzó el límite de tamaño predeterminado, se volvió elitista; es decir, solo los clasificadores que mostraban un cierto nivel de rendimiento se mantuvieron en la lista, y los otros cayeron al final de la lista y se perdieron. Esto se logró manteniendo la lista ordenada en orden de rendimiento del clasificador; se insertaron nuevos clasificadores que eran por lo menos tan buenos como el peor clasificador actualmente en la lista, forzando la expulsión de clasificadores de bajo rendimiento actuales. Otro detalle de la implementación es que la lista fue completamente reemplazada en cada etapa generacional; por lo tanto, cada clasificador en la lista tenía el mismo número de marcadores, y en cada etapa, el número de marcadores por clasificador creció en uno.

55 Como este procedimiento produjo una lista de clasificadores candidatos utilizando diferentes combinaciones de marcadores, uno puede preguntarse si los clasificadores pueden combinarse para evitar errores que podrían ser cometidos por el mejor clasificador individual, o por grupos minoritarios de los mejores clasificadores. Tales procedimientos de "conjunto" y "comité de expertos" son bien conocidos en los campos del aprendizaje estadístico y automático e incluyen, por ejemplo, "Promediado", "Votación", "Apilamiento", "Empaquetado" y "Potenciación" (véase, por ejemplo, Hastie et al). Estas combinaciones de clasificadores simples proporcionan un procedimiento para reducir la varianza en las clasificaciones debido al ruido en cualquier conjunto particular de marcadores al incluir varios clasificadores diferentes y, por lo tanto, información de un conjunto más grande de los marcadores de la tabla de biomarcadores, promediando efectivamente entre los clasificadores. Un ejemplo de la utilidad de este enfoque es que puede evitar que valores atípicos en un solo marcador afecten negativamente a la clasificación de una sola muestra. El requisito de medir un mayor número de señales puede ser poco práctico en ensayos de anticuerpos convencionales de "un marcador a la vez", pero no tiene inconvenientes para un ensayo de aptámero completamente multiplexado. Técnicas como estas se benefician de una tabla más extensa de biomarcadores y utilizan las múltiples fuentes de información sobre los procesos de la enfermedad para proporcionar una clasificación

más robusta.

Los biomarcadores seleccionados en la Tabla 1 dieron lugar a clasificadores que funcionan mejor que los clasificadores construidos con "no marcadores" (es decir, proteínas que tienen señales que no cumplen los criterios para la inclusión en la Tabla 1 (como se describe en el Ejemplo 2)).

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

En la Figura 11, la AUC se usó como medida de rendimiento; un rendimiento de 0,5 es la expectativa de referencia para un clasificador aleatorio (lanzamiento de moneda). El histograma del rendimiento clasificador se comparó con el histograma de rendimiento de una enumeración exhaustiva similar de clasificadores construidos a partir de una tabla "no marcador" de 66 señales no marcadoras; las 66 señales se eligieron al azar de aptámeros que no demostraron señalización diferencial entre las poblaciones de control y de enfermedad.

La Figura 11 muestra histogramas del rendimiento de todos los posibles clasificadores de uno, dos y tres marcadores construidos a partir de los parámetros de biomarcadores en la Tabla 14 para biomarcadores que pueden discriminar entre el grupo de control y mesotelioma y compara estos clasificadores con todos los posibles clasificadores de uno, dos y tres marcadores construidos utilizando las 66 señales RFU de aptámeros "no marcador". La Figura 11A muestra los histogramas del rendimiento del clasificador de un marcador, la Figura 11B muestra el histograma del rendimiento del clasificador de dos marcadores y la Figura 11C muestra el histograma del rendimiento del clasificador de tres marcadores.

En la Figura 11, las líneas continuas representan los histogramas del rendimiento del clasificador de todos los clasificadores de uno, dos y tres marcadores utilizando los datos de biomarcadores para individuos expuestos al amianto y mesotelioma en la Tabla 14. Las líneas de puntos son los histogramas del rendimiento del clasificador de todos los clasificadores de uno, dos y tres marcadores usan los datos para los controles y el mesotelioma pero usan el conjunto de señales aleatorias sin marcador.

Los clasificadores construidos a partir de los marcadores enumerados en la Tabla 1 forman un histograma distinto, 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 la AUC de los clasificadores construidos a partir de los biomarcadores en la Tabla 1 también aumentan más rápidamente con el número de marcadores que los clasificadores construidos a partir de los no marcadores, la separación aumenta entre los clasificadores de marcador y no marcador a medida que el número de marcadores por clasificador aumenta. Todos los clasificadores construidos usando los biomarcadores enumerados en la Tabla 14 funcionan claramente mejor que los clasificadores construidos usando los "no marcadores".

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

La Figura 12 demuestra que los clasificadores construidos sin los mejores marcadores funcionan bien, lo que implica que el rendimiento de los clasificadores no se debió a un pequeño grupo central de marcadores y que los cambios en los procesos subyacentes asociados con la enfermedad se reflejan en las actividades de muchas proteínas. Muchos subconjuntos de los biomarcadores en la Tabla 1 se realizaron de forma óptima, incluso después de eliminar los 15 primeros de los 66 marcadores de la Tabla 1. Después de eliminar los 15 marcadores mejor clasificados (clasificados por distancia KS) de la Tabla 1, el rendimiento del clasificador aumentó con el número de marcadores seleccionados de la tabla para alcanzar una AUC de casi 0,97, cerca del rendimiento de la puntuación óptima del clasificador de 0,993 seleccionado de la lista completa de biomarcadores.

Finalmente, la Figura 13 muestra cómo el rendimiento 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 CDH1, BMPER, F9, CCL23 y CRK. La Figura 13A muestra el rendimiento del modelo, asumiendo independencia de estos marcadores, como en el Ejemplo 3 y la Figura 13B muestra las curvas ROC empíricas generadas a partir del conjunto de datos de estudio utilizado para definir los parámetros en la Tabla 14. Se puede ver que el rendimiento para un número dado de marcadores seleccionados fue cualitativamente acorde y el acuerdo cuantitativo fue, general bastante bueno, como lo demuestran las AUC, aunque el cálculo del modelo tiende a sobreestimar el rendimiento del clasificador. Esto es coherente con la noción de que la información aportada por un biomarcador

particular sobre los procesos de la enfermedad es redundante con la información aportada por otros biomarcadores proporcionados en la Tabla 1, mientras que el cálculo del modelo asume una independencia completa. La Figura 13 demuestra así que la Tabla 1 en combinación con los procedimientos descritos en el Ejemplo 3 permite la construcción y evaluación de una gran cantidad de clasificadores útiles para la discriminación de mesotelioma del grupo de control.

Ejemplo 5. Biomarcadores para el diagnóstico de cáncer

Se realizó la identificación de biomarcadores potenciales para el diagnóstico general de cáncer. Tanto las muestras de casos como las de controles se evaluaron a partir de 3 tipos diferentes de cáncer (mesotelioma, cáncer de pulmón y carcinoma de células renales). En todos los centros, los criterios de inclusión tenían al menos 18 años de edad con el consentimiento informado firmado. Tanto los casos como los controles se excluyeron para neoplasia maligna conocida distinta del cáncer en cuestión.

Mesotelioma. Las muestras de casos y controles se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 2.

Cáncer de pulmón. Las muestras de casos y controles se obtuvieron de tres biorepositorios académicos del centro de cáncer y un biorepositorio comercial para identificar marcadores potenciales para el diagnóstico diferencial de cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPNMC) de un grupo de control de fumadores de alto riesgo y personas con nódulos pulmonares benignos. El estudio estaba compuesto por 978 muestras recolectadas de fumadores y pacientes con nódulos benignos y 320 individuos diagnosticados con CPNMC.

Carcinoma de células renales. Las muestras de casos y controles se obtuvieron de un biorepositorio académico del centro oncológico 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 los datos de resultado (registrados en el campo de la base de datos SEER CA Estado 1) para los 38 pacientes con CCR con "Evidencia de enfermedad" (EVD) frente a 104 con "No hay evidencia de enfermedad" documentados mediante seguimiento clínico.

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. Los clasificadores Bayesianos que usaron conjuntos de biomarcadores de tamaño creciente se construyeron sucesivamente usando un algoritmo ambicioso (como se describe con mayor detalle en la Sección 5.2 de este Ejemplo). Los conjuntos (o paneles) de biomarcadores que fueron útiles para diagnosticar el cáncer en general entre los diferentes sitios y tipos de cáncer se compilaron en función del tamaño del conjunto (o panel) y se analizaron para determinar su rendimiento. Este análisis dio como resultado la lista de 22 biomarcadores de cáncer mostrados en la Tabla 19, cada uno de los cuales estaba presente en al menos uno de estos conjuntos de marcadores sucesivos, que variaban en tamaño de tres a diez marcadores. Como ejemplo ilustrativo, los inventores describieron la generación de un panel específico compuesto por diez biomarcadores de cáncer, que se muestra en la Tabla 32.

5.1 Clasificación ingenua bayesiana para el cáncer

De la lista de biomarcadores en la Tabla 1, se seleccionó un panel de diez posibles biomarcadores de cáncer usando un algoritmo ambicioso para la selección de biomarcadores, como se describe en la Sección 5.2 de este Ejemplo. Se construyó un clasificador ingenuo distintivo de Bayes para cada uno de los 3 tipos de cáncer diferentes. Las funciones de densidad de probabilidad dependientes de clase (pdfs), $p(x_i|c)$ y $p(x_i|d)$, donde x_i es el log del valor medido de RFU para el biomarcador i , y c y d se refieren a las poblaciones de control y enfermedad, se modelaron como funciones de distribución normal logarítmica caracterizadas por una media μ y una varianza σ^2 . Los parámetros para los pdfs de los 3 modelos compuestos por los diez biomarcadores potenciales se enumeran en la Tabla 31.

La clasificación ingenua de Bayes para dicho modelo viene dada por la siguiente ecuación, en la que $p(d)$ es la prevalencia de la enfermedad en la población,

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

apropiado para la prueba y $n = 10$. Cada uno de los términos en la suma es una razón de verosimilitud logarítmica para un marcador individual y la razón de verosimilitud logarítmica total de una muestra \tilde{x} de estar libre de la enfermedad de interés (es decir, en este caso, cada enfermedad particular de los 3 tipos diferentes de cáncer) frente a tener la enfermedad es simplemente la suma de estos términos individuales más un término que representa la

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

prevalencia de la enfermedad. Para simplificar, suponemos $p(d) = 0,5$ de modo que

Dada una medición de muestra desconocida en $\log(\text{RFU})$ para cada uno de los diez biomarcadores de 9,5, 7,0, 10,5, 11,7, 8,7, 9,3, 10,9, 9,6, 7,9, 10,6, el cálculo de la clasificación se detalla en la Tabla 32. Los componentes individuales que comprenden la razón de verosimilitud logarítmica para la enfermedad frente a la clase de control se tabulan y se pueden calcular a partir de los parámetros en la Tabla 31 y los valores de \bar{x} . La suma de las razones de verosimilitud logarítmica individuales es $-4,020$ o la probabilidad de estar libre de la enfermedad frente a tener la enfermedad de 56, en la que la probabilidad $e^{4,020} = 56$. Solo 2 de los valores de los biomarcadores tienen probabilidades más consistentes con el grupo de la enfermedad (probabilidad logarítmica > 0), pero los 8 biomarcadores restantes se encuentran consistentemente que favorecen al grupo de control. Al multiplicar las probabilidades juntas se obtienen los mismos resultados que se muestran anteriormente; una probabilidad de 56 de que la muestra desconocida esté libre de la enfermedad. De hecho, esta muestra provino de la población de control en el conjunto de entrenamiento de CPNMC.

5.2 Algoritmo ambicioso para seleccionar paneles de biomarcadores de cáncer para clasificadores

Parte 1

Los subconjuntos de los biomarcadores en la Tabla 1 se seleccionaron para construir clasificadores potenciales que podrían usarse para determinar cuáles de los marcadores podrían usarse como biomarcadores generales del cáncer para detectar el cáncer.

Dado un conjunto de marcadores, se entrenó un modelo distinto para cada uno de los 3 estudios de cáncer, por lo que se requirió una medida global de rendimiento para seleccionar un conjunto de biomarcadores que pudiera clasificar simultáneamente muchos tipos diferentes de cáncer. La medida del rendimiento del clasificador utilizada aquí fue la media del área bajo la curva ROC en todos los clasificadores ingenuos de Bayes. La curva ROC es un gráfico de un solo clasificador de tasas positivas verdaderas (sensibilidad) frente a las tasas de falsos positivos (1-especificidad). El área bajo la curva ROC (AUC) varía de 0 a 1,0, en la que una AUC de 1,0 corresponde a una clasificación perfecta y una AUC de 0,5 corresponde al clasificador aleatorio (lanzamiento de moneda). Se pueden aplicar otras medidas comunes de rendimiento, como la medida F o la suma o producto de la sensibilidad y la especificidad. Específicamente, uno podría querer tratar la sensibilidad y especificidad con diferente peso, para seleccionar los clasificadores que funcionan con mayor especificidad a expensas de alguna sensibilidad, o para seleccionar los clasificadores que funcionan con mayor sensibilidad a expensas de alguna especificidad. Los inventores eligieron usar la AUC porque abarca todas las combinaciones de sensibilidad y especificidad en una sola medida. Las diferentes aplicaciones tendrán diferentes beneficios para los hallazgos positivos verdaderos y negativos verdaderos, y tendrán diferentes costes asociados con los hallazgos falsos positivos de los hallazgos falsos negativos. Cambiar la medida de rendimiento puede cambiar el subconjunto exacto de marcadores seleccionados para un conjunto determinado de datos.

Para el enfoque Bayesiano para la discriminación de muestras de cáncer de muestras de control descritas en la Sección 5.1 de este Ejemplo, el clasificador se parametrizó completamente mediante 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 elegidos para la inclusión determinó un clasificador en una forma individual dado un conjunto de datos de entrenamiento.

El procedimiento ambicioso empleado en el presente documento se utilizó para buscar el subconjunto óptimo de marcadores de la Tabla 1. Para un pequeño número de marcadores o clasificadores con relativamente pocos marcadores, cada subconjunto posible de marcadores se enumeraron y evaluaron en términos del rendimiento del clasificador construido con ese conjunto particular de marcadores (véase el Ejemplo 4, parte 2). (Este enfoque es bien conocido en el campo de las estadísticas como "mejor selección de subconjuntos"; véase, por ejemplo, Hastie et al). Sin embargo, para los clasificadores descritos en el presente documento, el número de combinaciones de marcadores múltiples puede ser muy grande, y no fue posible evaluar cada conjunto posible de 10 marcadores, ya que hay 30.045.015 posibles combinaciones que se pueden generar a partir de una lista de solo 30 analitos totales. Debido a la imposibilidad de buscar a través de cada subconjunto de marcadores, es posible que no se encuentre el único subconjunto óptimo; sin embargo, al usar este enfoque, se encontraron muchos subconjuntos excelentes y, en muchos casos, cualquiera de estos subconjuntos puede representar uno óptimo.

En lugar de evaluar todos los posibles conjuntos de marcadores, se puede seguir un enfoque progresivo directo "ambicioso" (véase, por ejemplo, Dabney AR, Storey JD (2007) Optimality Driven Nearest Centralid Classification from Genomic Data.

PLoS ONE 2(10): e1002. doi:10.1371/journal.pone.0001002). Usando este procedimiento, se inicia un clasificador

con el mejor marcador individual (Según la distancia KS para los marcadores individuales) y se cultiva en cada paso probando, a su vez, cada miembro de una lista de marcadores que actualmente no es 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 logran más mejoras en el rendimiento. Lamentablemente, este enfoque puede pasar por alto valiosas combinaciones de marcadores para los cuales algunos de los marcadores individuales no son todos elegidos antes de que se detenga el proceso.

El procedimiento ambicioso utilizado en el presente documento fue una elaboración del enfoque paso a paso anterior, porque, para ampliar la búsqueda, en lugar de mantener un solo subconjunto de marcador 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 amplió en etapas al derivar nuevos subconjuntos de marcadores de los que están actualmente en la lista y añadirlos a la lista. Cada subconjunto de marcadores actualmente en la lista se amplió añadiendo cualquier marcador de la Tabla 1 que no formara parte de ese clasificador y que, al sumarse 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 por uno para cada estudio de cáncer utilizando estos marcadores, y el rendimiento global se midió a través de la AUC media en los 3 estudios. Para evitar un posible sobreajuste, el AUC para cada modelo de estudio de cáncer se calculó mediante un procedimiento de validación cruzada de diez veces. Todos los subconjuntos de marcadores existentes se extendieron por cada marcador permitido de la lista. De manera clara, tal proceso eventualmente generaría cada subconjunto posible, y la lista se quedaría sin espacio. Por lo tanto, todos los conjuntos de marcadores generados se mantuvieron solo mientras la lista era inferior a un tamaño predeterminado. Una vez que la lista alcanzó el límite de tamaño predeterminado, se volvió elitista; es decir, solo los clasificadores que mostraban un cierto nivel de rendimiento se mantuvieron en la lista, y los otros cayeron al final de la lista y se perdieron. Esto se logró manteniendo la lista clasificada en el orden del rendimiento del conjunto de clasificadores; se insertaron nuevos conjuntos de marcadores cuyos clasificadores eran, globalmente, por lo menos tan buenos como el peor conjunto de clasificadores actualmente en la lista, forzando la expulsión de los conjuntos de clasificadores de bajo rendimiento actuales. Otro detalle de la implementación es que la lista fue completamente reemplazada en cada etapa generacional; por lo tanto, cada conjunto clasificador en la lista tenía 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 útiles para construir clasificadores para diagnosticar cáncer general a partir de no cáncer se basa en el AUC medio para la combinación particular de biomarcadores usados en el esquema de clasificación. Los inventores identificaron muchas combinaciones de biomarcadores derivados de los marcadores en la Tabla 19 que fueron capaces de clasificar efectivamente diferentes muestras de cáncer de los controles. Los paneles representativos se exponen en las Tablas 22-29, en las que se expone una serie de 100 paneles diferentes de 3-10 biomarcadores, que tienen la AUC de validación cruzada media (CV) 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.

Los biomarcadores seleccionados en la Tabla 19 dieron lugar a clasificadores que funcionan mejor que los clasificadores construidos con "no marcadores". En la Figura 14, los inventores mostraron el rendimiento de sus diez clasificadores de biomarcadores en comparación con el rendimiento de otros posibles clasificadores.

La Figura 14A muestra la distribución de las AUC medias para los clasificadores construidos a partir de conjuntos aleatorios de diez "no marcadores" tomados de todo el conjunto de 22 presentes en los 3 estudios, con exclusión de los diez marcadores en la Tabla 19. El rendimiento de los diez posibles cáncer biomarcadores se muestra como una línea punteada vertical. Este gráfico muestra claramente que el rendimiento de los diez biomarcadores potenciales va mucho más allá de la distribución de otras combinaciones de marcadores.

La Figura 14B muestra una distribución similar a la de la Figura 14A, los conjuntos aleatoriamente muestreados se restringieron a los 56 biomarcadores de la Tabla 1 que no fueron seleccionados por el procedimiento de selección de biomarcadores ambiciosos para diez clasificadores de análisis. Este gráfico demuestra que los diez marcadores elegidos por el algoritmo ambicioso representan un subconjunto de biomarcadores que se generalizan a otros tipos de cáncer mucho mejor que los clasificadores construidos con los 56 biomarcadores restantes.

Finalmente, la Figura 15 muestra la curva de clasificación ROC para cada uno de los 3 clasificadores de estudios de cáncer.

Tabla 1: Biomarcadores de cáncer

Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6
N.º de Biomarcador	Designación del biomarcador Símbolo(s) en Entrez Gene	ID en Entrez Gene	ID en SwissProt	Nombre público	Dirección
1	ABL1	25	P00519	ABL1	Descendente

ES 2 688 048 T3

2	AFM	173	P43652	Afamina	Descendente
3	ALB	213	P02768	Albúmina	Descendente
4	ALPL	249	P05186	Fosfatasa alcalina, hueso	Ascendente
5	APOA1	335	P02647	Apo A-I	Descendente
6	AZU1	566	P20160	Azurocidina	Ascendente
7	BDNF	627	P23560	BDNF	Descendente
8	BMP1	649	P13497	BMP-1	Descendente
9	BMPER	168667	Q8N8U9	BMPER	Descendente
10	BMX	660	P51813	BMX	Descendente
11	BPI	671	P17213	BPI	Ascendente
12	C9	735	P02748	C9	Ascendente
13	CAMK1	8536	Q14012	CAMK1	Ascendente
14	CCDC80	151887	Q76M96	URB	Ascendente
15	CCL23	6368	P55773	MPIF-1	Ascendente
16	CCL23	6368	P55773	Ck- β -8-1	Ascendente
17	CDH1	999	P12830	Cadherina-1	Descendente
18	CDK5-CDK5R1	1020; 1775	Q00535; Q15078	CDK5/p35	Ascendente
19	CDK8-CCNC	1024; 892	P49336; P24863	CDK8/ciclina C	Ascendente
20	CFHR5	81494	Q9BXR6	factor H del complemento 5 relacionado	Ascendente
21	CFL1	1072	P23528	Cofilina-1	Ascendente
22	CFP	5199	P27918	Properdina	Descendente
23	CRK	1398	P46108	proteína adaptadora Crk	Ascendente
24	CRP	1401	P02741	CRP	Ascendente
25	CSN1S1	1446	P47710	Alfa-SI-caseína	Descendente
26	CXCL13	10563	O43927	BCA-1	Ascendente
27	DDC	1644	P20711	dopa descarboxilasa	Descendente
28	EFNA5	1946	P52803	Efrina-A5	Ascendente
29	EGFR	1956	P00533	ERBB1	Descendente
30	EIF4EBP2	1979	Q13542	proteína 2 de unión a eIF4E	Descendente
31	ESM1	11082	Q9NQ30	Endocan	Ascendente
32	F9	2158	P00740	Factor de coagulación IX	Ascendente
33	FCN2	2220	Q15485	Ficolina-2	Ascendente
34	FGA-FGB-FGG	2243; 2244; 2266	P02671; P02675; P02679	Dímero D	Ascendente
35	FLT3LG	2323	P49771	Ligando de Flt-3	Ascendente
36	FN1	2335	P02751	Fibronectina FN1.4	Descendente
37	FN1	2335	P02751	Fibronectina	Descendente
38	FRZB	2487	Q92765	FRP-3, soluble	Ascendente
39	GPC2	221914	Q8N158	glipicano 2	Descendente
40	GPI	2821	P06744	glucosa fosfato isomerasa	Ascendente
41	H2AFZ	3015	P0C0S5	Histona H2A.z	Ascendente
42	HINT1	3094	P49773	HINT1	Descendente
43	ICAM2	3384	P13598	ICAM-2, soluble	Descendente
44	IL31	386653	Q6EBC2	IL-31	Descendente

45	ITGA1-ITGB1-	3672; 3688	P56199; P05556	Integrina $\alpha 1\beta 1$	Ascendente
46	ITIH4	3700	Q14624	Cadena pesada H4 del inhibidor de inter- α -tripsina	Ascendente
47	KIT	3815	P10721	SCF sR	Descendente
48	KLK3-SERPINA3	354; 12	P07288; P01011	PSA-ACT	Ascendente
49	LCN2	3934	P80188	Lipocalina 2	Ascendente
50	LTF	4057	P02788	Lactoferrina	Ascendente
51	MDK	4192	P21741	Midkina	Ascendente
52	MMP9	4318	P14780	MMP-9	Ascendente
53	MPO	4353	P05164	Mieloperoxidasa	Ascendente
54	MSLN	10232	Q13421	Mesotelina	Descendente
55	PLA2G5	5322	P39877	Fosfolipasa A2 del grupo V	Descendente
56	PRTN3	5657	P24158	Proteinasa-3	Ascendente
57	RBP4	5950	P02753	RBP	Descendente
58	SAA1	6288	P02735	SAA	Ascendente
59	SERPINA4	5267	P29622	Kalostatina	Descendente
60	TGFB2	7042	P61812	TGF- $\beta 2$	Descendente
61	TIMP1	7076	P01033	TIMP-1	Ascendente
62	TNFRSF4	7293	P43489	TNR4	Descendente
63	TNFRSF8	943	P28908	CD30	Ascendente
64	TPT1	7178	P13693	Fortilina	Ascendente
65	VEGFA	7422	P15692	VEGF	Ascendente
66	YWHAH	7533	Q04917	Proteína 14-3-3 eta	Ascendente

Tabla 2: Paneles de 1 biomarcador

	Marcadores	CV AUC
1	CDH1	0,880
2	BMPER	0,859
3	KLK3-SERPINA3	0,856
4	C9	0,837
5	PLA2G5	0,826
6	CRK	0,814
7	BMX	0,807
8	VEGFA	0,806
9	F9	0,806
10	AFM	0,805
11	CCL23	0,803
12	SERPINA4	0,803
13	GPC2	0,802
14	ABL1	0,802
15	APOA1	0,796
16	IL31	0,795
17	CDK8-CCNC	0,795
18	KIT	0,789
19	FCN2	0,786
20	HINT1	0,786
21	CAMK1	0,782
22	TGFB2	0,780

ES 2 688 048 T3

23	SAA1	0,780
24	CSN1S1	0,779
25	CXCL13	0,777
26	CFL1	0,777
27	TPT1	0,776
28	CRP	0,775
29	MSLN	0,773
30	FLT3LG	0,773
31	FN1	0,773
32	ITGA1-ITGB1	0,772
33	CFP	0,772
34	TNFRSF4	0,770
35	GPI	0,768
36	BMP1	0,768
37	CCL23	0,764
38	ALB	0,762
39	DDC	0,759
40	EGFR	0,758
41	BDNF	0,757
42	CFHR5	0,753
43	H2AFZ	0,747
44	ITIH4	0,747
45	EIF4EBP2	0,746
46	RBP4	0,745
47	ESM1	0,744
48	FN1	0,741
49	YWHAH	0,738
50	FRZB	0,733
51	EFNA5	0,731
52	FGA-FGB-FGG	0,729
53	CCDC80	0,727
54	TIMP1	0,722
55	CDK5-CDK5R1	0,692
56	MDK	0,680
57	BPI	0,646
58	AZU1	0,637
59	TNFRSF8	0,628
60	ICAM2	0,624
61	PRTN3	0,612
62	LTF	0,605
63	MMP9	0,593
64	ALPL	0,591
65	MPO	0,589
66	LCN2	0,573

Tabla 3: Paneles de 2 Biomarcadores

Marcadores			CV AUC
1	CDH1	BMPER	0,945
2	CDH1	F9	0,932

ES 2 688 048 T3

3	BMPER	CRK	0,920
4	BMPER	TPT1	0,919
5	CDH1	CCL23	0,918
6	BMPER	TGFB2	0,916
7	CDH1	FRZB	0,914
8	CDH1	ABL1	0,912
9	KLK3-SERPINA3	CDH1	0,912
10	CCL23	CRK	0,911
11	CDH1	CCL23	0,911
12	CCL23	TPT1	0,911
13	CCL23	YWHAH	0,910
14	BMPER	YWHAH	0,910
15	CDH1	VEGFA	0,910
16	CDH1	AFM	0,908
17	PLA2G5	CDH1	0,908
18	CDH1	SERPINA4	0,908
19	CDH1	SAA1	0,907
20	CDH1	CCDC80	0,907
21	CDH1	CRP	0,907
22	CCDC80	BMPER	0,907
23	CDH1	CRK	0,907
24	CDH1	CSN1S1	0,905
25	CDH1	FCN2	0,904
26	CDH1	BMX	0,904
27	KIT	CDH1	0,904
28	CDH1	RBP4	0,904
29	BMPER	CFL1	0,904
30	CDH1	CXCL13	0,903
31	KLK3-SERPINA3	BMPER	0,903
32	CDH1	CFL1	0,902
33	CDH1	MDK	0,902
34	CDH1	C9	0,900
35	CDH1	APOA1	0,899
36	CDH1	ITIH4	0,899
37	ESM1	CRK	0,899
38	CDH1	YWHAH	0,898
39	CCL23	GPI	0,897
40	BDNF	CDH1	0,897
41	CDH1	FN1	0,897
42	CDH1	EFNA5	0,897
43	VEGFA	BMPER	0,896
44	CCL23	CFL1	0,896
45	KLK3-SERPINA3	GPC2	0,896
46	CDH1	BMP1	0,895
47	AZU1	BMPER	0,895
48	KLK3-SERPINA3	F9	0,895
49	KLK3-SERPINA3	CCL23	0,894
50	CCL23	H2AFZ	0,894
51	CDH1	TGFB2	0,894

ES 2 688 048 T3

52	C9	FCN2	0,894
53	CDH1	CFP	0,893
54	CDH1	CFHR5	0,893
55	BMPER	HINT1	0,893
56	CDH1	TPT1	0,892
57	KLK3-SERPINA3	FCN2	0,892
58	CDH1	GPI	0,892
59	CDH1	CDK8-CCNC	0,891
60	BMPER	GPI	0,891
61	KLK3-SERPINA3	PLA2G5	0,891
62	CDH1	EGFR	0,891
63	TIMP1	CDH1	0,891
64	CCL23	BMPER	0,890
65	CDH1	GPC2	0,890
66	VEGFA	FCN2	0,890
67	C9	BMPER	0,889
68	BMPER	AFM	0,889
69	CCL23	FCN2	0,889
70	VEGFA	CRK	0,889
71	CDH1	ALB	0,889
72	KLK3-SERPINA3	ESM1	0,888
73	BMPER	BPI	0,888
74	FRZB	C9	0,888
75	ESM1	TPT1	0,887
76	C9	CRK	0,887
77	CDH1	DDC	0,887
78	PLA2G5	AFM	0,886
79	CDH1	ESM1	0,885
80	CDH1	ICAM2	0,885
81	CDH1	TNFRSF4	0,885
82	CDH1	CAMK1	0,885
83	KLK3-SERPINA3	TNFRSF4	0,885
84	PRTN3	BMPER	0,885
85	ABL1	BMPER	0,885
86	KLK3-SERPINA3	EFNA5	0,885
87	F9	CRK	0,885
88	KLK3-SERPINA3	FRZB	0,884
89	CDH1	ITGA1-ITGB1	0,884
90	KLK3-SERPINA3	MDK	0,884
91	ICAM2	BMPER	0,883
92	PLA2G5	C9	0,883
93	CDH1	HINT1	0,883
94	RBP4	BMPER	0,883
95	CCL23	TGFB2	0,883
96	CDH1	FLT3LG	0,883
97	KIT	BMPER	0,883
98	PLA2G5	BMPER	0,882
99	CDH1	FN1	0,882
100	ITGA1-ITGB1	BMPER	0,882

Tabla 4: Paneles de 3 Biomarcadores

Marcadores				CV AUC
1	CDH1	F9	CRK	0,958
2	CDH1	FRZB	BMPER	0,955
3	CDH1	BMPER	CRK	0,954
4	CDH1	BMPER	TPT1	0,954
5	KLK3-SERPINA3	CDH1	F9	0,954
6	CDH1	TPT1	F9	0,951
7	CDH1	ICAM2	BMPER	0,950
8	CDH1	CCDC80	BMPER	0,950
9	CDH1	BMPER	YWHAH	0,949
10	CDH1	CFL1	F9	0,949
11	CDH1	CCL23	BMPER	0,947
12	CDH1	CCL23	CRK	0,947
13	CDH1	BMPER	F9	0,947
14	CDH1	BMPER	CFL1	0,946
15	CDH1	FRZB	CCL23	0,946
16	CDH1	ABL1	BMPER	0,946
17	CDH1	CAMK1	F9	0,946
18	CDH1	SERPINA4	F9	0,945
19	KIT	CDH1	BMPER	0,945
20	CDH1	VEGFA	BMPER	0,945
21	CDH1	BMPER	AFM	0,945
22	CDH1	AFM	F9	0,945
23	CDH1	BMPER	TGFB2	0,945
24	CDH1	AZU1	BMPER	0,944
25	CDH1	EFNA5	F9	0,944
26	BDNF	CDH1	FRZB	0,944
27	CDH1	RBP4	BMPER	0,944
28	CDH1	BMPER	BPI	0,943
29	CDH1	MMP9	BMPER	0,943
30	CDH1	CCL23	TPT1	0,943
31	CDH1	EGFR	F9	0,942
32	CDH1	PRTN3	BMPER	0,942
33	CDH1	LTF	BMPER	0,942
34	CDH1	CCDC80	F9	0,941
35	CDH1	RBP4	F9	0,941
36	CDH1	BMPER	SAA1	0,940
37	CDH1	BMPER	CRP	0,940
38	CDH1	C9	F9	0,940
39	CDH1	CCL23	F9	0,940
40	CDH1	CCL23	F9	0,940
41	CDH1	MPO	BMPER	0,940
42	CDH1	ALPL	BMPER	0,939
43	CDH1	FRZB	SAA1	0,939
44	CDH1	CFP	BMPER	0,939
45	KLK3-SERPINA3	CDH1	BMPER	0,939
46	CDH1	BMPER	ITIH4	0,939
47	CCL23	BMPER	TPT1	0,939

ES 2 688 048 T3

48	CDH1	SERPINA4	BMPER	0,939
49	CDH1	TGFB2	F9	0,939
50	CDH1	CRP	F9	0,939
51	CDH1	CCL23	YWHAH	0,939
52	CDH1	FRZB	AFM	0,939
53	CXCL13	BMPER	CRK	0,939
54	CDH1	BMP1	F9	0,939
55	CDH1	VEGFA	FRZB	0,938
56	CDH1	CFP	F9	0,938
57	CCL23	BMPER	CRK	0,938
58	CDH1	MDK	F9	0,938
59	CDH1	FRZB	CRP	0,938
60	CDH1	FN1	BMPER	0,938
61	CDH1	BMPER	CSN1S1	0,937
62	CDH1	MDK	BMPER	0,937
63	CDH1	BMPER	GPI	0,937
64	CDH1	FRZB	CCL23	0,937
65	VEGFA	BMPER	CRK	0,937
66	CDH1	CCL23	BMPER	0,937
67	CXCL13	BMPER	TPT1	0,936
68	CDH1	BMPER	TNFRSF4	0,936
69	PLA2G5	CDH1	BMPER	0,936
70	CDH1	YWHAH	F9	0,936
71	CDH1	BMP1	BMPER	0,936
72	CDH1	ABL1	F9	0,936
73	CDH1	EFNA5	BMPER	0,936
74	CDH1	C9	FCN2	0,935
75	CDH1	FRZB	CFP	0,935
76	CDH1	VEGFA	CRK	0,935
77	CDH1	LCN2	BMPER	0,935
78	PLA2G5	CDH1	F9	0,935
79	CDH1	VEGFA	F9	0,935
80	CDH1	CXCL13	BMPER	0,935
81	CDH1	FRZB	F9	0,934
82	CDH1	SAA1	F9	0,934
83	MDK	BMPER	CRK	0,934
84	CDH1	CCL23	ABL1	0,934
85	FRZB	BMPER	CRK	0,934
86	BDNF	CDH1	FCN2	0,933
87	CDH1	BMPER	EIF4EBP2	0,933
88	CDH1	VEGFA	FCN2	0,933
89	VEGFA	BMPER	TPT1	0,933
90	CDH1	BMX	BMPER	0,933
91	CDH1	CCL23	TGFB2	0,933
92	CDH1	AZU1	F9	0,932
93	KIT	CDH1	CCL23	0,932
94	KLK3-SERPINA3	CDH1	FCN2	0,932
95	CDH1	SERPINA4	CRK	0,932
96	CDH1	FRZB	C9	0,932

97	CDH1	ESM1	F9	0,932
98	CDH1	FRZB	BMP1	0,932
99	CDH1	BMPER	CFHR5	0,932
100	CCL23	BMPER	CRK	0,932

Tabla 5: Paneles de 4 Biomarcadores

Marcadores					CV AUC
1	CDH1	EGFR	F9	CRK	0,970
2	CDH1	BMPER	F9	CRK	0,968
3	CDH1	FRZB	BMPER	CRK	0,968
4	CDH1	CCL23	F9	CRK	0,968
5	KLK3-SERPINA3	CDH1	F9	CRK	0,966
6	CDH1	BMP1	F9	CRK	0,966
7	CDH1	MDK	F9	CRK	0,965
8	CDH1	EFNA5	F9	CRK	0,965
9	CDH1	EGFR	TPT1	F9	0,965
10	CDH1	CCL23	F9	CRK	0,965
11	CDH1	SERPINA4	F9	CRK	0,964
12	CDH1	FRZB	BMPER	TPT1	0,964
13	CDH1	CDK5-CDK5R1	F9	CRK	0,963
14	BDNF	CDH1	FRZB	BMPER	0,963
15	CDH1	AFM	F9	CRK	0,963
16	CDH1	BMPER	TPT1	F9	0,963
17	CDH1	CCL23	TPT1	F9	0,962
18	CDH1	FRZB	CCL23	CRK	0,962
19	CDH1	CFP	F9	CRK	0,962
20	BDNF	CDH1	F9	CRK	0,962
21	CDH1	CCDC80	F9	CRK	0,962
22	CDH1	VEGFA	F9	CRK	0,961
23	CDH1	BMP1	TPT1	F9	0,961
24	CDH1	FRZB	CCL23	BMPER	0,961
25	CDH1	C9	F9	CRK	0,961
26	KLK3-SERPINA3	CDH1	EGFR	F9	0,961
27	CDH1	ESM1	F9	CRK	0,961
28	CDH1	FRZB	BMPER	SAA1	0,961
29	BDNF	KIT	CDH1	FRZB	0,961
30	CDH1	FRZB	CFP	BMPER	0,960
31	CDH1	TGFB2	F9	CRK	0,960
32	KLK3-SERPINA3	CDH1	BMPER	F9	0,960
33	KLK3-SERPINA3	CDH1	TPT1	F9	0,960
34	CDH1	CCL23	BMPER	CRK	0,960
35	CDH1	VEGFA	BMPER	CRK	0,960
36	KLK3-SERPINA3	CDH1	MDK	F9	0,960
37	CDH1	SAA1	F9	CRK	0,960
38	CDH1	FRZB	CCDC80	BMPER	0,960
39	CDH1	CDK8-CCNC	F9	CRK	0,959
40	CDH1	FRZB	F9	CRK	0,959
41	CDH1	MMP9	F9	CRK	0,959
42	KLK3-SERPINA3	CDH1	EFNA5	F9	0,959

ES 2 688 048 T3

43	CDH1	FN1	BMPER	CRK	0,959
44	CDH1	CAMK1	F9	CRK	0,959
45	CDH1	FRZB	BMPER	AFM	0,959
46	CDH1	ICAM2	BMPER	CRK	0,959
47	KLK3-SERPINA3	CDH1	TGFB2	F9	0,959
48	CDH1	ICAM2	F9	CRK	0,959
49	CDH1	TNFRSF4	F9	CRK	0,959
50	CDH1	RBP4	F9	CRK	0,959
51	CDH1	FRZB	CCL23	TPT1	0,959
52	CDH1	MDK	TPT1	F9	0,959
53	CDH1	SERPINA4	TPT1	F9	0,958
54	BDNF	CDH1	FRZB	CRK	0,958
55	CDH1	TPT1	AFM	F9	0,958
56	CDH1	EFNA5	CFL1	F9	0,958
57	BDNF	CDH1	BMPER	CRK	0,958
58	CDH1	EFNA5	TPT1	F9	0,958
59	CDH1	ICAM2	BMPER	TPT1	0,958
60	CDH1	CCL23	BMPER	CRK	0,958
61	CDH1	FRZB	BMPER	TGFB2	0,958
62	CDH1	BMPER	CFL1	F9	0,958
63	CDH1	EGFR	TGFB2	F9	0,958
64	CDH1	FRZB	CCL23	BMPER	0,958
65	BDNF	CDH1	FRZB	ABL1	0,958
66	CDH1	CCL23	TPT1	F9	0,958
67	CDH1	CFL1	F9	CRK	0,958
68	CDH1	CFHR5	F9	CRK	0,958
69	CDH1	CCL23	BMPER	TPT1	0,957
70	CDH1	MDK	BMPER	CRK	0,957
71	CDH1	FRZB	ICAM2	BMPER	0,957
72	CDH1	FRZB	BMP1	BMPER	0,957
73	KLK3-SERPINA3	CDH1	CCL23	F9	0,957
74	KIT	CDH1	BMPER	CRK	0,957
75	KIT	CDH1	FRZB	BMPER	0,957
76	CDH1	CRP	F9	CRK	0,957
77	CDH1	CCDC80	TPT1	F9	0,957
78	CDH1	FRZB	ABL1	BMPER	0,957
79	CDH1	CFP	BMPER	CRK	0,957
80	CDH1	CCL23	CFL1	F9	0,957
81	CDH1	ABL1	F9	CRK	0,957
82	CDH1	BMPER	AFM	CRK	0,957
83	CDH1	FRZB	BMPER	CRP	0,957
84	KLK3-SERPINA3	CDH1	CFP	F9	0,957
85	CDH1	FN1	F9	CRK	0,957
86	BDNF	CDH1	FRZB	TPT1	0,957
87	KIT	CDH1	F9	CRK	0,957
88	KLK3-SERPINA3	CDH1	BMP1	F9	0,957
89	CDH1	EGFR	CFL1	F9	0,957
90	CDH1	BPI	F9	CRK	0,957
91	CDH1	TNFRSF8	F9	CRK	0,956

92	PLA2G5	CDH1	F9	CRK	0,956
93	CDH1	BMPER	SAA1	CRK	0,956
94	CDH1	BMP1	BMPER	CRK	0,956
95	CDH1	VEGFA	FRZB	BMPER	0,956
96	CDH1	CCL23	BMPER	TPT1	0,956
97	CDH1	FN1	F9	CRK	0,956
98	CDH1	CCDC80	BMPER	CRK	0,956
99	CDH1	CFP	TPT1	F9	0,956
100	CDH1	BMP1	BMPER	TPT1	0,956

Tabla 6: Paneles de 5 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC
1	BDNF	CDH1	FRZB	BMPER	CRK	0,980
2	BDNF	CDH1	FRZB	BMPER	TPT1	0,977
3	CDH1	CCL23	BMP1	F9	CRK	0,977
4	CDH1	EGFR	MDK	F9	CRK	0,976
5	KLK3-SERPINA3	CDH1	MDK	F9	CRK	0,976
6	CDH1	CCL23	BMPER	F9	CRK	0,976
7	CDH1	EGFR	FRZB	F9	CRK	0,975
8	CDH1	EGFR	CCL23	F9	CRK	0,974
9	KLK3-SERPINA3	CDH1	EGFR	F9	CRK	0,974
10	CDH1	FRZB	CCL23	BMPER	CRK	0,974
11	CDH1	EGFR	SERPINA4	F9	CRK	0,974
12	CDH1	BMP1	BMPER	F9	CRK	0,974
13	KLK3-SERPINA3	CDH1	CCL23	F9	CRK	0,973
14	CDH1	MDK	BMP1	F9	CRK	0,973
15	CDH1	FRZB	FN1	BMPER	CRK	0,973
16	CDH1	MDK	BMPER	F9	CRK	0,973
17	CDH1	EGFR	TGFB2	F9	CRK	0,973
18	CDH1	EFNA5	BMPER	F9	CRK	0,973
19	CDH1	EGFR	CCL23	F9	CRK	0,973
20	CDH1	CCL23	FN1	F9	CRK	0,973
21	KLK3-SERPINA3	CDH1	BMPER	F9	CRK	0,973
22	CDH1	EGFR	BMPER	F9	CRK	0,973
23	CDH1	EFNA5	EGFR	F9	CRK	0,973
24	CDH1	EGFR	CCDC80	F9	CRK	0,973
25	CDH1	EGFR	TNFRSF4	F9	CRK	0,972
26	CDH1	FRZB	BMP1	BMPER	CRK	0,972
27	CDH1	CCL23	TNFRSF4	F9	CRK	0,972
28	CDH1	ICAM2	CCL23	F9	CRK	0,972
29	CDH1	EGFR	AFM	F9	CRK	0,972
30	CDH1	FRZB	CFP	BMPER	CRK	0,972
31	CDH1	FRZB	CCL23	F9	CRK	0,972
32	CDH1	FRZB	BMPER	F9	CRK	0,972
33	CDH1	CCL23	CCL23	F9	CRK	0,972
34	CDH1	MDK	CCL23	F9	CRK	0,972
35	CDH1	CCDC80	BMPER	F9	CRK	0,971
36	CDH1	CCL23	CCDC80	F9	CRK	0,971
37	CDH1	BMPER	AFM	F9	CRK	0,971

ES 2 688 048 T3

38	CDH1	CCL23	RBP4	F9	CRK	0,971
39	CDH1	EGFR	ICAM2	F9	CRK	0,971
40	CDH1	EGFR	RBP4	F9	CRK	0,971
41	CDH1	CCL23	FN1	F9	CRK	0,971
42	CDH1	FRZB	BMP1	BMPER	TPT1	0,971
43	CDH1	EGFR	FRZB	BMPER	CRK	0,971
44	CDH1	CCL23	AFM	F9	CRK	0,971
45	CDH1	EGFR	TPT1	TGFB2	F9	0,971
46	CDH1	ICAM2	BMPER	F9	CRK	0,971
47	CDH1	CCL23	BMP1	TPT1	F9	0,971
48	CDH1	CCL23	C9	F9	CRK	0,971
49	CDH1	SERPINA4	BMPER	F9	CRK	0,971
50	CDH1	CCL23	BMPER	F9	CRK	0,971
51	CDH1	EGFR	BMP1	F9	CRK	0,971
52	CDH1	MDK	SERPINA4	F9	CRK	0,971
53	BDNF	CDH1	FRZB	BMPER	TGFB2	0,970
54	CDH1	MMP9	EGFR	F9	CRK	0,970
55	CDH1	EGFR	ABL1	F9	CRK	0,970
56	CDH1	BMP1	SERPINA4	F9	CRK	0,970
57	CDH1	RBP4	BMPER	F9	CRK	0,970
58	CDH1	BMP1	BMPER	TPT1	F9	0,970
59	CDH1	EGFR	CFP	F9	CRK	0,970
60	CDH1	FRZB	CCL23	BMPER	TPT1	0,970
61	BDNF	CDH1	EGFR	F9	CRK	0,970
62	CDH1	CCL23	TPT1	F9	CRK	0,970
63	CDH1	FRZB	BMP1	F9	CRK	0,970
64	CDH1	EFNA5	MDK	F9	CRK	0,970
65	CDH1	FRZB	BMPER	SAA1	CRK	0,970
66	CDH1	EGFR	TPT1	F9	CRK	0,970
67	CDH1	CCL23	SAA1	F9	CRK	0,970
68	CDH1	VEGFA	FRZB	BMPER	CRK	0,970
69	BDNF	KIT	CDH1	FRZB	BMPER	0,970
70	CDH1	VEGFA	EGFR	F9	CRK	0,970
71	CDH1	CCL23	TGFB2	F9	CRK	0,970
72	CDH1	EFNA5	CCL23	F9	CRK	0,970
73	CDH1	BMPER	TGFB2	F9	CRK	0,970
74	CDH1	VEGFA	BMPER	F9	CRK	0,970
75	CDH1	CDK5-CDK5R1	FRZB	F9	CRK	0,970
76	CDH1	CFP	BMPER	F9	CRK	0,970
77	CDH1	EGFR	SAA1	F9	CRK	0,970
78	BDNF	CDH1	BMPER	F9	CRK	0,970
79	BDNF	CDH1	VEGFA	FRZB	CRK	0,970
80	KLK3-SERPINA3	CDH1	FN1	F9	CRK	0,970
81	CDH1	BMP1	RBP4	F9	CRK	0,970
82	KLK3-SERPINA3	CDH1	EGFR	TPT1	F9	0,970
83	CDH1	EFNA5	BMP1	F9	CRK	0,970
84	CDH1	CCL23	CFL1	F9	CRK	0,970
85	CDH1	FRZB	BMPER	AFM	CRK	0,970
86	KLK3-SERPINA3	CDH1	CFP	F9	CRK	0,969

ES 2 688 048 T3

87	CDH1	ICAM2	BMP1	F9	CRK	0,969
88	CDH1	EGFR	BPI	F9	CRK	0,969
89	CDH1	C9	BMPER	F9	CRK	0,969
90	CDH1	MDK	C9	F9	CRK	0,969
91	BDNF	CDH1	MDK	F9	CRK	0,969
92	CDH1	BMP1	AFM	F9	CRK	0,969
93	BDNF	CDH1	FRZB	F9	CRK	0,969
94	BDNF	CDH1	AZU1	FRZB	BMPER	0,969
95	KLK3-SERPINA3	CDH1	BMPER	TPT1	F9	0,969
96	CDH1	CCL23	ESM1	F9	CRK	0,969
97	KLK3-SERPINA3	BDNF	CDH1	F9	CRK	0,969
98	KLK3-SERPINA3	CDH1	BMP1	F9	CRK	0,969
99	CDH1	CCDC80	BMP1	F9	CRK	0,969
100	CDH1	MDK	AFM	F9	CRK	0,969

Tabla 7: Paneles de 6 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC
1	KLK3-SERPINA A3 CRK	CDH1	EGFR	MDK	F9	0,982
2	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	CCL23	F9	0,981
3	CDH1 CRK	FRZB	CCL23	BMP1	F9	0,981
4	CDH1 CRK	EGFR	MDK	SERPINA4	F9	0,981
5	CDH1 CRK	MDK	CCL23	BMP1	F9	0,981
6	CDH1 CRK	FRZB	CCL23	BMPER	F9	0,980
7	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	MDK	F9	0,980
8	BDNF CRK	KIT	CDH1	FRZB	BMPER	0,980
9	CDH1 CRK	CCL23	BMP1	BMPER	F9	0,980
10	BDNF CRK	CDH1	VEGFA	FRZB	BMPER	0,980
11	BDNF CRK	CDH1	FRZB	ICAM2	BMPER	0,980
12	KLK3-SERPINA A3 CRK	CDH1	MDK	BMPER	F9	0,980
13	KLK3-SERPINA A3 CRK	CDH1	MDK	FN1	F9	0,980
14	BDNF TPT1	CDH1	FRZB	CFP	BMPER	0,980
15	CDH1 CRK	EGFR	MDK	CCL23	F9	0,979
16	CDH1 CRK	MDK	BMP1	SERPINA4	F9	0,979
17	CDH1 CRK	ICAM2	CCL23	BMPER	F9	0,979
18	BDNF CRK	CDH1	MMP9	FRZB	BMPER	0,979
19	KLK3-SERPINA A3	CDH1	MDK	CCL23	F9	0,979

ES 2 688 048 T3

	CRK					
20	CDH1 CRK	ICAM2	CCL23	BMP1	F9	0,979
21	KLK3-SERPINA A3 CRK	BDNF	CDH1	MDK	F9	0,979
22	CDH1 CRK	MDK	CCL23	BMPER	F9	0,979
23	BDNF TPT1	CDH1	FRZB	ICAM2	BMPER	0,979
24	BDNF TPT1	CDH1	VEGFA	FRZB	BMPER	0,979
25	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	SERPINA4	F9	0,979
26	CDH1 CRK	EGFR	MDK	CCDC80	F9	0,979
27	BDNF CRK	CDH1	FRZB	CFP	BMPER	0,979
28	CDH1 CRK	EGFR	MDK	BMPER	F9	0,979
29	KLK3-SERPINA A3 CRK	CDH1	MDK	BMP1	F9	0,979
30	CDH1 CRK	EGFR	MDK	AFM	F9	0,978
31	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	BMPER	F9	0,978
32	CDH1 CRK	EFNA5	EGFR	MDK	F9	0,978
33	CDH1 CRK	EGFR	MDK	TPT1	F9	0,978
34	BDNF CRK	CDH1	FRZB	MDK	BMPER	0,978
35	CDH1 CRK	MDK	CCL23	FN1	F9	0,978
36	CDH1 CRK	CCL23	BMP1	TPT1	F9	0,978
37	CDH1 CRK	CCL23	FN1	BMPER	F9	0,978
38	CDH1 CRK	EGFR	MDK	CCL23	F9	0,978
39	BDNF CRK	CDH1	FRZB	BMPER	AFM	0,978
40	CDH1 CRK	MDK	BMP1	BMPER	F9	0,978
41	BDNF CRK	CDH1	EGFR	FRZB	F9	0,978
42	CDH1 CRK	CCL23	BMP1	TNFRSF4	F9	0,978
43	BDNF CRK	CDH1	FRZB	BMPER	BPI	0,978
44	CDH1 CRK	VEGFA	FRZB	FN1	BMPER	0,978
45	KLK3-SERPINA A3 CRK	CDH1	EGFR	FRZB	F9	0,978
46	CDH1 CRK	EGFR	MDK	TGFB2	F9	0,978
47	CDH1	EFNA5	MDK	BMPER	F9	0,978

ES 2 688 048 T3

	CRK					
48	BDNF TPT1	KIT	CDH1	FRZB	BMPER	0,978
49	BDNF CRK	CDH1	FRZB	BMPER	SAA1	0,978
50	CDH1 CRK	EGFR	CCL23	FN1	F9	0,978
51	CDH1 CRK	CCL23	BMPER	TNFRSF 4	F9	0,978
52	CDH1 CRK	CCL23	CCDC80	BMPER	F9	0,978
53	CDH1 CRK	MDK	SERPINA A4	BMPER	F9	0,978
54	CDH1 CRK	EGFR	CCL23	TNFRSF4	F9	0,977
55	CDH1 CRK	FRZB	BMP1	BMPER	F9	0,977
56	CDH1 CRK	MDK	BMP1	AFM	F9	0,977
57	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	AFM	F9	0,977
58	BDNF CRK	CDH1	FRZB	FN1	BMPER	0,977
59	CDH1 CRK	EGFR	CCL23	CCDC80	F9	0,977
60	KIT CRK	CDH1	CCL23	BMP1	F9	0,977
61	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	RBP4	F9	0,977
62	CDH1 CRK	EGFR	MDK	BMP1	F9	0,977
63	BDNF CRK	CDH1	FRZB	BMPER	TNFRSF4	0,977
64	CDH1 CRK	MDK	CCL23	CCDC80	F9	0,977
65	CDH1 CRK	CCDC80	BMP1	BMPER	F9	0,977
66	BDNF CRK	CDH1	FRZB	CCL23	F9	0,977
67	CDH1 CRK	EGFR	MDK	TNFRSF4	F9	0,977
68	CDH1 CRK	EGFR	MDK	RBP4	F9	0,977
69	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	BMP1	F9	0,977
70	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	CCDC80	F9	0,977
71	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	CCL23	F9	0,977
72	CDH1 CRK	CCL23	CCL23	BMPER	F9	0,977
73	CDH1 CRK	ICAM2	BMP1	BMPER	F9	0,977
74	CDH1 CRK	EGFR	MDK	FN1	F9	0,977
75	BDNF	CDH1	LTF	FRZB	BMPER	0,977

ES 2 688 048 T3

	CRK					
76	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1	EGFR	MDK	TPT1	0,977
77	CDH1 CRK	EGFR	CCL23	BMPER	F9	0,977
78	CDH1 CRK	EGFR	CCDC80	BMPER	F9	0,977
79	CDH1 CRK	MDK	CCL23	C9	F9	0,977
80	CDH1 CRK	CCL23	RBP4	BMPER	F9	0,977
81	CDH1 CRK	EGFR	ICAM2	MDK	F9	0,977
82	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	TNFRSF4	F9	0,977
83	CDH1 CRK	CCL23	BMP1	RBP4	F9	0,977
84	CDH1 CRK	FRZB	CCL23	FN1	F9	0,977
85	BDNF TPT1	CDH1	FRZB	MDK	BMPER	0,977
86	BDNF CRK	CDH1	FRZB	BMPER	F9	0,977
87	CDH1 CRK	CCL23	CCDC80	BMP1	F9	0,977
88	CDH1 CRK	EGFR	MDK	CFL1	F9	0,977
89	KLK3-SERPINA A3 CRK	CDH1	MDK	GPC2	F9	0,977
90	BDNF TPT1	CDH1	MMP9	FRZB	BMPER	0,977
91	CDH1 CRK	MDK	BMPER	AFM	F9	0,977
92	BDNF CRK	CDH1	EGFR	MDK	F9	0,977
93	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	CFP	F9	0,977
94	KLK3-SERPINA A3 CRK	CDH1	MDK	TGFB2	F9	0,977
95	BDNF CRK	CDH1	FRZB	ABL1	BMPER	0,977
96	CDH1 CRK	EGFR	SERPINA4	TGFB2	F9	0,977
97	CDH1 CRK	EGFR	CCL23	TGFB2	F9	0,976
98	CDH1 CRK	EGFR	ICAM2	CCL23	F9	0,976
99	BDNF CRK	CDH1	FRZB	SERPINA4	BMPER	0,976
100	CDH1 CRK	FRZB	CFP	FN1	BMPER	0,976

Tabla 8: Paneles de 7 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC
1	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	SERPINA4	0,985

ES 2 688 048 T3

2	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	MDK	0,985
3	CDH1 F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	BMP1	0,985
4	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	CCL23	0,985
5	CDH1 F9	FRZB CRK	CCL23	BMP1	BMPER	0,985
6	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	BMPER	0,984
7	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	BMPER	0,984
8	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	TNFRSF4	0,984
9	BDNF BMPER	CDH1 TPT1	FRZB	ICAM2	CFP	0,984
10	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	TPT1	0,983
11	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	FN1	BMPER	0,983
12	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	CCDC80	0,983
13	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	BMPER	0,983
14	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	TNFRSF4	0,983
15	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	TNFRSF4	0,983
16	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCDC80	FN1	0,983
17	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	FN1	0,983
18	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	SERPINA4	TPT1	0,983
19	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	FN1	0,983
20	CDH1 F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	BMPER	0,983
21	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	ICAM2	MDK	0,983
22	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	TGFB2	0,983
23	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	BMP1	SERPINA A4	0,983
24	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCDC80	BMPER	0,983
25	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	FCN2	0,983
26	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	FN1	0,983

ES 2 688 048 T3

27	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	TGFB2	0,983
28	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	SERPINA4	TGFB2	0,983
29	KLK3-SERPINA A3 F9	BDNF CRK	CDH1	EGFR	MDK	0,983
30	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	TPT1	0,983
31	CDH1 F9	ICAM2 CRK	CCL23	BMP1	BMPER	0,983
32	CDH1 F9	EFNA5 CRK	EGFR	MDK	SERPINA4	0,983
33	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	FN1	0,983
34	CDH1 F9	EGFR CRK	ICAM2	MDK	SERPINA A4	0,983
35	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	CCDC80	0,983
36	CDH1 F9	FRZB CRK	ICAM2	CCL23	BMP1	0,983
37	CDH1 F9	MDK CRK	BMP1	SERPINA4	BMPER	0,982
38	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	GPC2	0,982
39	BDNF BMPER	CDH1 CRK	VEGFA	FRZB	ICAM2	0,982
40	CDH1 F9	FRZB CRK	CCL23	BMP1	TPT1	0,982
41	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCDC80	BMPER	0,982
42	BDNF F9	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	MDK	0,982
43	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	CCDC80	0,982
44	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	SERPINA A4	BMPER	0,982
45	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	AFM	0,982
46	CDH1 F9	MDK CRK	CCDC80	BMP1	BMPER	0,982
47	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	RBP4	BMPER	0,982
48	CDH1 F9	FRZB CRK	CCL23	BMP1	TNFRSF4	0,982
49	CDH1 F9	FRZB CRK	ICAM2	CCL23	BMPER	0,982
50	BDNF BMPER	CDH1 CRK	FRZB	ICAM2	CFP	0,982
51	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	TPT1	0,982
52	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	AFM	0,982
53	KLK3-SERPINA	CDH1	MMP9	EGFR	MDK	0,982

ES 2 688 048 T3

	A3 F9	CRK				
54	CDH1 F9	ICAM2 CRK	CCL23	CCDC80	BMPER	0,982
55	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	ABL1	0,982
56	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	BMPER	AFM	0,982
57	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	AFM	0,982
58	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	BMPER	0,982
59	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCDC80	SERPINA4	0,982
60	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	BMPER	0,982
61	CDH1 F9	CCL23 CRK	BMP1	BMPER	TPT1	0,982
62	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	CFL1	0,982
63	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	CCL23	0,982
64	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	MDK	CCL23	BMPER	0,982
65	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	TPT1	0,982
66	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	FN1	SERPINA4	0,982
67	CDH1 F9	ICAM2 CRK	MDK	CCL23	BMP1	0,982
68	BDNF BMPER	KIT CRK	CDH1	FRZB	ICAM2	0,982
69	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	MDK	BMP1	BMPER	0,982
70	CDH1 F9	MDK CRK	BMP1	BMPER	AFM	0,982
71	BDNF BMPER	CDH1 CRK	VEGFA	FRZB	FN1	0,982
72	KIT F9	CDH1 CRK	MDK	CCL23	BMP1	0,982
73	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	TNFRSF4	0,982
74	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	CCL23	0,982
75	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCDC80	AFM	0,982
76	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	RBP4	0,982
77	BDNF F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	SERPINA4	0,982
78	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	FN1	0,982

ES 2 688 048 T3

79	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	FN1	AFM	0,982
80	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	FN1	TPT1	0,982
81	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	MDK	CCL23	FN1	0,982
82	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	SERPINA A4	TNFRSF4	0,982
83	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	AFM	0,982
84	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	BMP1	0,982
85	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	SERPINA A4	0,982
86	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CFP	CCL23	0,982
87	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	FN1	RBP4	0,982
88	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	ICAM2	MDK	BMPER	0,982
89	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	CCL23	RBP4	0,982
90	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	ICAM2	MDK	CCL23	0,982
91	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	MDK	FN1	BMPER	0,982
92	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	CCL23	0,982
93	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	CCDC80	BMPER	0,982
94	CDH1 F9	ICAM2 CRK	MDK	BMP1	SERPINA A4	0,982
95	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCDC80	TNFRSF4	0,982
96	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	FN1	0,982
97	KIT F9	CDH1 CRK	FRZB	CCL23	BMP1	0,982
98	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCDC80	RBP4	0,982
99	CDH1 F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	FN1	0,982
100	KLK3-SERPINA A3 F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	CCL23	0,981

Tabla 9: Paneles de 8 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC
1	CDH1 BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,988
2	CDH1 BMPER	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,988
3	CDH1	EGFR	FRZB	MDK	CCDC80	0,988

ES 2 688 048 T3

	FN1	F9	CRK			
4	CDH1 FN1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,987
5	BDNF SERPINA4	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,987
6	CDH1 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	BMPER	0,987
7	CDH1 CCDC80	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,987
8	KLK3-SERPINA A3 FCN2	BDNF F9	CDH1 CRK	EGFR	MDK	0,987
9	KLK3-SERPINA A3 BMPER	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,987
10	KLK3-SERPINA A3 FN1	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,987
11	CDH1 FN1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
12	CDH1 AFM	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	FN1	0,986
13	CDH1 FCN2	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	CCDC80	0,986
14	CDH1 BMPER	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCDC80	0,986
15	CDH1 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
16	CDH1 TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,986
17	CDH1 AFM	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
18	CDH1 TNFRSF4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
19	KLK3-SERPINA A3 TNFRSF4	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,986
20	KLK3-SERPINA A3 MDK	BDNF F9	CDH1 CRK	EGFR	FRZB	0,986
21	CDH1 TPT1	FRZB F9	CCL23 CRK	BMP1	BMPER	0,986
22	KLK3-SERPINA A3 CCL23	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,986
23	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	SERPINA A4	0,986
24	CDH1 RBP4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	FN1	0,986
25	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
26	CDH1 BMX	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
27	CDH1 SERPINA A4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	BMP1	0,986
28	CDH1 BMPER	FRZB F9	ICAM2 CRK	CCL23	BMP1	0,986
29	CDH1 SERPINA A4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	FN1	0,986
30	CDH1 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	SERPINA A4	0,986
31	CDH1	EGFR	FRZB	MDK	SERPINA A4	0,986

ES 2 688 048 T3

	BMPER	F9	CRK			
32	CDH1 BMPER	EGFR F9	MDK CRK	CCDC80	FN1	0,986
33	CDH1 AFM	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	BMPER	0,986
34	CDH1 RBP4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
35	CDH1 TPT1	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	FN1	0,986
36	CDH1 TNFRSF4	EGFR F9	MDK CRK	CCDC80	FN1	0,986
37	CDH1 BMP1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
38	CDH1 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	FN1	0,986
39	CDH1 SAA1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
40	KLK3-SERPINA A3 FCN2	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	0,986
41	CDH1 TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,986
42	CDH1 CCL23	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,986
43	CDH1 BMPER	ICAM2 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,986
44	CDH1 SERPINA A4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCDC80	0,986
45	BDNF CCDC80	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,986
46	CDH1 TNFRSF4	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,986
47	CDH1 TPT1	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	CCDC80	0,986
48	CDH1 BMP1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCDC80	0,986
49	KIT BMPER	CDH1 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,985
50	CDH1 BMPER	ICAM2 F9	MDK CRK	BMP1	SERPINA A4	0,985
51	CDH1 TNFRSF4	ICAM2 F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,985
52	CDH1 TNFRSF4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	SERPINA A4	0,985
53	CDH1 BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	FN1	0,985
54	BDNF RBP4	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,985
55	CDH1 BMPER	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	RBP4	0,985
56	CDH1 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	FN1	BMPER	0,985
57	CDH1 TPT1	EGFR F9	MDK CRK	CCDC80	FN1	0,985
58	CDH1 RBP4	EFNA5 F9	EGFR CRK	MDK	FCN2	0,985
59	CDH1	ICAM2	MDK	CCL23	FN1	0,985

ES 2 688 048 T3

	BMPER	F9	CRK			
60	CDH1 SERPINA4	EGFR F9	FRZB CRK	ICAM2	MDK	0,985
61	KLK3-SERPINA A3 TPT1	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	BMPER	0,985
62	CDH1 TPT1	EGFR F9	MDK CRK	BMP1	SERPINA A4	0,985
63	BDNF BMPER	CDH1 F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,985
64	CDH1 RBP4	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	FCN2	0,985
65	CDH1 BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	FN1	0,985
66	CDH1 FCN2	EFNA5 F9	EGFR CRK	MDK	CCL23	0,985
67	CDH1 TNFRSF4	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	FN1	0,985
68	CDH1 CCL23	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CFP	0,985
69	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	CCL23	BMPER	0,985
70	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	CCL23	FN1	0,985
71	KLK3-SERPINA A3 TGFB2	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	BMPER	0,985
72	CDH1 BMPER	ICAM2 F9	MDK CRK	CCDC80	BMP1	0,985
73	BDNF CCL23	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,985
74	BDNF TPT1	CDH1 F9	EGFR CRK	MDK	SERPINA A4	0,985
75	CDH1 BMP1	FRZB F9	ICAM2 CRK	MDK	CCL23	0,985
76	CDH1 TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	BMPER	0,985
77	KLK3-SERPINA A3 BMPER	CDH1 F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,985
78	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	CCL23	FN1	0,985
79	CDH1 FN1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,985
80	CDH1 RBP4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	BMP1	0,985
81	CDH1 TPT1	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	BMPER	0,985
82	CDH1 TNFRSF4	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	BMPER	0,985
83	CDH1 CFL1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCL23	0,985
84	CDH1 BMPER	FRZB F9	MDK CRK	BMP1	SERPINA A4	0,985
85	CDH1 TGFB2	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	FN1	0,985
86	CDH1 AFM	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	CCDC80	0,985
87	CDH1	EGFR	MDK	C9	CCDC80	0,985

ES 2 688 048 T3

	FCN2	F9	CRK			
88	CDH1 FN1	EGFR F9	ICAM2 CRK	MDK	CCDC80	0,985
89	CDH1 AFM	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	FCN2	0,985
90	CDH1 AFM	EFNA5 F9	EGFR CRK	MDK	FCN2	0,985
91	CDH1 SAA1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	BMP1	0,985
92	CDH1 AFM	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	TNFRSF4	0,985
93	CDH1 SERPINA A4	MMP9 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,985
94	KLK3-SERPINA A3 TPT1	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	MDK	0,985
95	CDH1 CCL23	EGFR F9	FRZB CRK	ICAM2	MDK	0,985
96	KLK3-SERPINA A3 FCN2	CDH1 F9	EFNA5 CRK	EGFR	MDK	0,985
97	CDH1 TPT1	EGFR F9	ICAM2 CRK	MDK	SERPINA A4	0,985
98	CDH1 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	CCL23	FN1	0,985
99	CDH1 AFM	EGFR F9	MDK CRK	FN1	TNFRSF4	0,985
100	CDH1 BMPER	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	CCDC80	0,985

Tabla 10: Paneles de 9 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC
1	CDH1 BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,990
2	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,990
3	CDH1 BMPER	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,989
4	CDH1 FN1	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,989
5	CDH1 BMPER	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,989
6	BDNF SERPINA4	CDH1 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,989
7	CDH1 BMP1	FRZB BMPER	ICAM2 F9	MDK CRK	CCL23	0,989
8	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,989
9	BDNF BMPER	CDH1 TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,989
10	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCDC80	0,989
11	CDH1 BMP1	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,989
12	CDH1 FN1	EGFR BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCDC80	0,989
13	CDH1 CCL23	EFNA5 BMX	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,989

ES 2 688 048 T3

14	CDH1 FCN2	EGFR TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	CCDC80	0,989
15	CDH1 BMX	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,989
16	KLK3-SERPINA3 MDK	BDNF FCN2	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	0,989
17	CDH1 BMPER	FRZB TNFRSF4	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,989
18	CDH1 BMX	EGFR BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,989
19	CDH1 TPT1	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	FN1	0,989
20	CDH1 FN1	EGFR TNFRSF4	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
21	CDH1 FCN2	EFNA5 TPT1	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	0,988
22	CDH1 CCDC80	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
23	CDH1 CCDC80	EGFR BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
24	CDH1 FCN2	EFNA5 BMX	EGFR F9	MDK CRK	CCL23	0,988
25	CDH1 CCDC80	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
26	CDH1 SERPINA4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	FN1	0,988
27	CDH1 BMPER	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	SERPINA4	0,988
28	CDH1 TGFB2	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
29	BDNF CCDC80	CDH1 FN1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
30	CDH1 BMP1	AZU1 BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
31	CDH1 PRTN3	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,988
32	CDH1 TPT1	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
33	CDH1 BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	FN1	0,988
34	CDH1 RBP4	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	FN1	0,988
35	KLK3-SERPINA3 MDK	BDNF TPT1	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	0,988
36	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
37	KIT BMP1	CDH1 BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
38	CDH1 BMPER	FRZB BPI	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,988
39	CDH1 SERPINA4	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	FN1	0,988
40	CDH1 FN1	EGFR TNFRSF4	FRZB F9	MDK CRK	CCDC80	0,988
41	BDNF BMP1	CDH1 TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988

ES 2 688 048 T3

42	CDH1 BMP1	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
43	CDH1 TNFRSF4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
44	CDH1 BMP1	EGFR BMX	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
45	CDH1 TGFB2	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	FN1	0,988
46	BDNF CCL23	CDH1 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
47	CDH1 CCL23	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
48	CDH1 RBP4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	FN1	0,988
49	CDH1 TGFB2	EGFR SAA1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
50	CDH1 FN1	EGFR BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
51	CDH1 FN1	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,988
52	CDH1 BMP1	LTF BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
53	CDH1 FN1	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,988
54	CDH1 CCDC80	EGFR BMX	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
55	CDH1 BMP1	ALPL BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
56	CDH1 BMP1	VEGFA BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
57	CDH1 SERPINA4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	BMP1	0,988
58	CDH1 CCL23	EGFR FN1	FRZB F9	ICAM2 CRK	MDK	0,988
59	CDH1 CCDC80	EGFR FCN2	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
60	CDH1 BMP1	MMP9 BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
61	CDH1 TPT1	EGFR SAA1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
62	BDNF SERPINA4	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
63	CDH1 BMPER	MDK TPT1	CCL23 F9	BMP1 CRK	FN1	0,988
64	CDH1 BMP1	EGFR BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCDC80	0,988
65	CDH1 FN1	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	CCDC80	0,988
66	CDH1 FN1	EGFR CFL1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
67	CDH1 CCL23	EGFR BMPER	FRZB F9	ICAM2 CRK	MDK	0,988
68	BDNF FN1	CDH1 RBP4	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
69	CDH1 CCL23	EGFR CCDC80	FRZB F9	ICAM2 CRK	MDK	0,988

ES 2 688 048 T3

70	CDH1 TPT1	FRZB SAA1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,988
71	CDH1 SERPINA4	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	BMP1	0,988
72	CDH1 RBP4	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
73	BDNF FN1	CDH1 AFM	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
74	BDNF CCL23	CDH1 FN1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
75	BDNF MDK	CDH1 FCN2	EFNA5 F9	EGFR CRK	FRZB	0,988
76	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	SERPINA4	0,988
77	CDH1 TNFRSF4	MDK TPT1	CCL23 F9	BMP1 CRK	BMPER	0,988
78	CDH1 BMPER	FRZB SAA1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,988
79	CDH1 CCDC80	EGFR TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	CCL23	0,988
80	KLK3-SERPINA3 MDK	BDNF TGFB2	CDH1 F9	EGFR CRK	FRZB	0,988
81	CDH1 BMP1	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	CCDC80	0,988
82	CDH1 BMP1	LCN2 BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
83	CDH1 TNFRSF4	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	FN1	0,988
84	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCDC80	0,988
85	CDH1 RBP4	EGFR BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
86	CDH1 FN1	EGFR CFL1	FRZB F9	MDK CRK	CCDC80	0,988
87	CDH1 BMX	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
88	CDH1 FN1	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	BMP1	0,988
89	CDH1 FCN2	EGFR BMP1	MDK F9	CCL23 CRK	CCDC80	0,988
90	CDH1 CCDC80	EGFR FCN2	ICAM2 F9	MDK CRK	CCL23	0,988
91	CDH1 CCL23	EGFR FN1	FRZB F9	MDK CRK	CFP	0,988
92	BDNF CCL23	CDH1 FN1	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
93	BDNF CCL23	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
94	CDH1 BMP1	MPO BMPER	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
95	CDH1 RBP4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988
96	BDNF TPT1	CDH1 AFM	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
97	CDH1 ABL1	EGFR FN1	FRZB F9	MDK CRK	CCL23	0,988

ES 2 688 048 T3

98	CDH1 BMP1	FRZB TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	CCL23	0,988
99	KLK3-SERPINA3 FN1	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988
100	BDNF RBP4	CDH1 BMPER	EGFR F9	FRZB CRK	MDK	0,988

Tabla 11: Paneles de 10 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC
1	CDH1 BMP1	FRZB BMPER	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,992
2	CDH1 FN1	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCDC80 CRK	0,991
3	CDH1 FN1	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,991
4	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB TGFB2	MDK F9	CCL23 CRK	0,991
5	CDH1 FN1	EGFR BMPER	FRZB TGFB2	MDK F9	CCL23 CRK	0,991
6	CDH1 BMP1	VEGFA BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,991
7	CDH1 CCL23	EGFR BMPER	FRZB TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	0,991
8	BDNF BMP1	CDH1 BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,991
9	CDH1 CCL23	EGFR FN1	FRZB TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	0,991
10	CDH1 BMPER	ICAM2 TNFRSF4	MDK TPT1	CCL23 F9	BMP1 CRK	0,991
11	CDH1 BMP1	EGFR BMX	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
12	CDH1 BMPER	FRZB TNFRSF4	MDK TPT1	CCL23 F9	BMP1 CRK	0,990
13	CDH1 FN1	EGFR TNFRSF4	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
14	BDNF CCL23	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
15	BDNF CCL23	CDH1 BMPER	FRZB TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	0,990
16	CDH1 BMP1	MMP9 BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
17	CDH1 CCDC80	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
18	CDH1 BMX	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
19	CDH1 BMP1	EGFR BMX	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
20	BDNF SERPINA4	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
21	CDH1 BMP1	ICAM2 BMPER	MDK TPT1	CCL23 F9	CCDC80 CRK	0,990
22	CDH1 FN1	EGFR TNFRSF4	FRZB TGFB2	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
23	CDH1 BMP1	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
24	CDH1	FRZB	MDK	CCL23	BMP1	0,990

ES 2 688 048 T3

	FN1	BMPER	TPT1	F9	CRK	
25	BDNF CCDC80	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
26	CDH1 CCL23	EGFR BMP1	FRZB TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	0,990
27	KLK3-SERPINA3 MDK	BDNF FCN2	CDH1 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	0,990
28	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB TGFB2	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
29	BDNF FN1	CDH1 TPT1	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	0,990
30	BDNF CCL23	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
31	CDH1 FN1	EGFR BMPER	FRZB TGFB2	MDK F9	CCDC80 CRK	0,990
32	BDNF CCL23	CDH1 CCDC80	EGFR FCN2	FRZB F9	MDK CRK	0,990
33	BDNF CCL23	CDH1 TNFRSF4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
34	CDH1 BMP1	EGFR TPT1	FRZB TGFB2	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
35	BDNF BMPER	CDH1 TPT1	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	0,990
36	BDNF FN1	CDH1 RBP4	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	0,990
37	BDNF MDK	CDH1 SERPINA4	EGFR TPT1	FRZB F9	ICAM2 CRK	0,990
38	CDH1 CCDC80	EGFR FCN2	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
39	BDNF FN1	CDH1 RBP4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
40	BDNF SERPINA4	CDH1 TPT1	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	0,990
41	BDNF FN1	CDH1 BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
42	CDH1 BMPER	FRZB TPT1	MDK SAA1	CCL23 F9	BMP1 CRK	0,990
43	BDNF CCL23	CDH1 FN1	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	0,990
44	CDH1 BMP1	EGFR FN1	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
45	BDNF FN1	CDH1 SERPINA4	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
46	CDH1 FCN2	EGFR BMP1	MDK TPT1	CCL23 F9	CCDC80 CRK	0,990
47	CDH1 CCDC80	EGFR BMPER	FRZB TGFB2	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
48	CDH1 BMP1	EGFR TNFRSF4	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
49	KLK3-SERPINA3 MDK	BDNF BMPER	CDH1 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	0,990
50	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB AFM	MDK F9	FN1 CRK	0,990
51	CDH1 CCL23	EGFR FN1	FRZB TPT1	MDK F9	CFP CRK	0,990
52	CDH1	MMP9	EGFR	FRZB	MDK	0,990

ES 2 688 048 T3

	CCL23	FN1	TPT1	F9	CRK	
53	CDH1 BMPER	EGFR TGFB2	FRZB AFM	MDK F9	FN1 CRK	0,990
54	CDH1 CCDC80	EGFR FCN2	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
55	BDNF CCDC80	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
56	CDH1 CCDC80	EGFR FN1	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
57	CDH1 CCDC80	EGFR BMX	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
58	CDH1 BMP1	FRZB FN1	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
59	CDH1 BMPER	EGFR TNFRSF4	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
60	BDNF RBP4	CDH1 BMPER	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
61	BDNF FN1	CDH1 TGFB2	EGFR AFM	FRZB F9	MDK CRK	0,990
62	CDH1 FCN2	EGFR BMP1	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
63	BDNF CCDC80	CDH1 FN1	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	0,990
64	BDNF CCL23	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
65	CDH1 BMP1	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCDC80 CRK	0,990
66	CDH1 FN1	FRZB BMPER	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
67	KIT CCL23	CDH1 FN1	EGFR TGFB2	FRZB F9	MDK CRK	0,990
68	BDNF MDK	CDH1 FCN2	EFNA5 RBP4	EGFR F9	FRZB CRK	0,990
69	BDNF CCDC80	CDH1 FCN2	EGFR RBP4	FRZB F9	MDK CRK	0,990
70	KLK3-SERPINA3 MDK	BDNF FCN2	CDH1 TGFB2	EGFR F9	FRZB CRK	0,990
71	CDH1 CCL23	AZU1 BMP1	FRZB BMPER	ICAM2 F9	MDK CRK	0,990
72	CDH1 CCL23	EGFR FN1	FRZB TGFB2	ICAM2 F9	MDK CRK	0,990
73	CDH1 CCDC80	EGFR FCN2	FRZB BMP1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
74	BDNF MDK	CDH1 FCN2	EFNA5 TPT1	EGFR F9	FRZB CRK	0,990
75	CDH1 CCL23	EFNA5 BMX	EGFR BMPER	FRZB F9	MDK CRK	0,990
76	BDNF CCDC80	CDH1 FCN2	EGFR BMP1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
77	BDNF BMP1	CDH1 BMX	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
78	CDH1 FN1	ICAM2 BMPER	MDK TPT1	CCL23 F9	BMP1 CRK	0,990
79	CDH1 CCDC80	EGFR FN1	FRZB BMPER	ICAM2 F9	MDK CRK	0,990
80	BDNF	CDH1	EGFR	MDK	CCL23	0,990

ES 2 688 048 T3

	CCDC80	FCN2	TPT1	F9	CRK	
81	CDH1 FN1	EGFR TNFRSF4	FRZB TPT1	MDK F9	CCDC80 CRK	0,990
82	CDH1 CCL23	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
83	KLK3-SERPINA3 ICAM2	BDNF MDK	CDH1 FCN2	EGFR F9	FRZB CRK	0,990
84	CDH1 BMP1	MMP9 BMPER	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
85	CDH1 BMP1	EFNA5 BMX	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
86	BDNF CCDC80	CDH1 FN1	EGFR TNFRSF4	FRZB F9	MDK CRK	0,990
87	CDH1 RBP4	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	FN1 CRK	0,990
88	CDH1 FN1	EGFR TPT1	FRZB AFM	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
89	BDNF BMX	CDH1 BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
90	KLK3-SERPINA3 MDK	BDNF CCL23	CDH1 FCN2	EGFR F9	FRZB CRK	0,990
91	CDH1 BMP1	VEGFA FN1	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,990
92	CDH1 CCL23	EGFR CCDC80	FRZB TPT1	ICAM2 F9	MDK CRK	0,990
93	CDH1 CCL23	EFNA5 BMX	EGFR TPT1	FRZB F9	MDK CRK	0,990
94	BDNF CCL23	CDH1 CCDC80	EGFR FCN2	FRZB F9	MDK CRK	0,990
95	CDH1 BMX	FRZB BMPER	MDK TPT1	CCL23 F9	BMP1 CRK	0,989
96	CDH1 FN1	EGFR BMPER	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,989
97	CDH1 BMP1	VEGFA BMPER	ICAM2 TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,989
98	KIT BMP1	CDH1 FN1	FRZB BMPER	MDK F9	CCL23 CRK	0,989
99	CDH1 FN1	EGFR PRTN3	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,989
100	BDNF BMPER	CDH1 TNFRSF4	FRZB TPT1	MDK F9	CCL23 CRK	0,989

Tabla 12: Recuentos de marcadores en paneles de biomarcadores

Biomarcador	Tamaño del panel							
	3	4	5	6	7	8	9	10
ABL1	47	48	32	27	25	24	15	16
AFM	52	65	55	69	83	94	111	111
ALB	3	1	0	0	0	0	0	0
ALPL	5	11	10	10	8	7	10	11
APOA1	9	0	0	0	0	0	0	0
AZU1	5	23	14	15	16	18	27	30
BDNF	43	73	134	131	139	103	181	321
BMP1	35	44	86	158	223	261	255	290
BMPER	228	341	255	351	321	324	336	396

ES 2 688 048 T3

BMX	25	16	12	11	10	22	51	107
BPI	7	19	18	16	19	15	23	26
C9	48	37	32	27	22	22	19	12
CAMK1	3	31	13	5	1	1	0	0
CCDC80	54	63	56	78	88	136	188	202
CCL23	44	43	55	60	65	77	70	58
CCL23	125	116	137	301	407	453	502	605
CDH1	653	971	996	1000	1000	1000	1000	1000
CDK5-CDK5R1	15	9	27	15	5	0	0	0
CDK8-CCNC	7	6	17	9	4	5	2	0
CFHR5	11	13	14	10	8	4	4	6
CFL1	55	66	53	29	33	31	38	32
CFP	29	37	58	43	29	24	24	33
CRK	149	205	643	888	963	994	999	1000
CRP	35	30	19	14	9	11	6	4
CSN1S1	30	15	9	9	6	5	4	2
CXCL13	35	10	7	1	0	0	0	0
DDC	4	4	2	0	0	0	0	0
EFNA5	39	52	74	69	55	55	67	67
EGFR	30	64	137	337	468	662	778	789
EIF4EBP2	15	12	10	9	7	8	6	4
ESM1	55	14	29	13	0	0	0	0
F9	82	486	768	862	936	987	1000	1000
FCN2	86	40	14	18	39	79	152	191
FGA-FGB-FGG	1	1	0	0	0	0	0	0
FLT3LG	3	4	1	0	0	0	0	0
FN1	48	52	55	76	136	229	290	340
FN1	11	10	25	39	30	17	8	2
FRZB	91	201	224	261	357	450	669	830
GPC2	18	3	3	5	13	12	7	3
GPI	25	16	9	10	14	16	19	12
H2AFZ	8	0	0	0	0	0	0	0
HINT1	6	6	1	0	0	0	0	0
ICAM2	26	49	52	76	128	143	178	222
ITGA1-ITGB1	3	1	0	0	0	0	0	0
ITIH4	13	3	0	0	0	0	0	0
KIT	35	46	35	27	33	23	30	47
KLK3-SERPINA3	96	72	125	131	169	171	128	76
LCN2	2	7	10	8	7	7	8	7
LTF	5	14	11	13	10	9	16	18
MDK	49	47	94	244	559	838	975	998
MMP9	11	20	21	29	34	36	36	58
MPO	3	10	11	7	11	6	7	9
MSLN	2	2	0	0	0	0	0	0
PLA2G5	46	30	23	15	11	9	3	0
PRTN3	5	16	12	10	13	11	22	27
RBP4	27	43	37	59	62	76	79	86
SAA1	43	42	43	36	32	29	27	26
SERPINA4	43	53	52	64	95	117	116	80

TGFB2	60	50	53	61	62	82	107	182
TIMP1	10	6	9	4	0	0	0	0
TNFRSF4	27	24	31	56	78	119	123	142
TNFRSF8	2	4	6	1	0	0	0	0
TPT1	82	104	197	132	109	153	259	479
VEGFA	74	57	62	50	47	25	25	43
YWHAH	62	42	12	1	1	0	0	0

Tabla 13: Analitos en clasificadores de diez marcadores

CDH1	CRK
F9	MDK
FRZB	EGFR
CCL23	TPT1
BMPER	FN1

Tabla 14: Parámetros derivados del conjunto de entrenamiento para el clasificador ingenuo de Bayes.

Biomarcador	μ_c	μ_d	σ_c	σ_d
CSN1S1	8,744	8,621	0,087	0,132
BMPER	7,309	7,061	0,206	0,247
CFHR5	8,943	9,232	0,239	0,344
CCL23	8,276	8,608	0,235	0,461
CDH1	9,132	8,827	0,161	0,267
CCDC80	8,588	8,846	0,218	0,365
TGFB2	6,882	6,833	0,044	0,049
FCN2	7,792	8,187	0,175	0,283
SERPINA4	10,713	10,398	0,130	0,433
MPO	9,440	9,975	0,808	0,968
CRP	7,836	9,788	1,059	1,962
FRZB	8,136	8,466	0,315	0,297
BDNF	6,828	6,709	0,103	0,094
FGA-FGB-FGG	9,639	10,247	0,514	0,620
H2AFZ	6,664	6,894	0,119	0,311
AFM	10,236	9,850	0,199	0,465
CRK	7,196	7,686	0,252	0,414
CFL1	7,949	8,169	0,143	0,288
BMX	7,153	7,066	0,083	0,061
RBP4	8,856	8,603	0,171	0,333
C9	11,525	11,955	0,199	0,291
MDK	7,033	7,244	0,179	0,470
ESM1	7,562	7,751	0,139	0,332
TNFRSF8	7,184	7,219	0,053	0,081
CFP	9,650	9,449	0,160	0,214
FLT3LG	6,636	6,797	0,125	0,133
ITIH4	10,180	10,461	0,318	0,337
MMP9	10,371	10,311	0,598	0,632
LTF	11,096	11,579	0,686	0,881
KIT	9,389	9,181	0,156	0,196
CDK5-CDK5R1	6,745	6,870	0,105	0,153
VEGFA	7,521	7,711	0,098	0,249

CDK8-CCNC	6,724	6,854	0,097	0,107
MSLN	8,101	8,001	0,062	0,102
ABL1	8,093	7,967	0,096	0,119
LCN2	9,887	10,049	0,384	0,546
GPC2	6,357	6,292	0,045	0,042
TIMP1	8,763	8,927	0,118	0,310
FN1	10,929	10,599	0,333	0,422
ICAM2	7,392	7,369	0,041	0,063
ALB	9,491	9,281	0,124	0,299
CAMK1	8,318	8,527	0,157	0,208
PRTN3	8,779	9,243	0,860	0,894
YWHAH	7,820	8,309	0,310	0,645
HINT1	6,639	6,583	0,051	0,045
EGFR	10,463	10,264	0,111	0,209
EFNA5	6,697	6,833	0,113	0,253
IL31	6,478	6,407	0,045	0,046
BPI	10,379	11,043	1,014	1,250
BMP1	8,616	8,303	0,271	0,350
CCL23	7,224	7,528	0,152	0,259
GPI	7,834	8,422	0,454	0,701
EIF4EBP2	6,532	6,470	0,048	0,053
PLA2G5	7,021	6,926	0,063	0,068
ITGA1-ITGB1	7,345	7,977	0,377	0,671
TPT1	9,224	10,393	0,805	1,202
DDC	6,553	6,499	0,043	0,049
TNFRSF4	7,171	7,094	0,064	0,078
ALPL	7,799	8,245	0,662	0,937
SAA1	6,891	8,598	1,076	2,033
APOA1	8,557	8,281	0,164	0,258
CXCL13	6,890	7,020	0,084	0,145
KLK3-SERPINA3	7,997	8,511	0,161	0,530
FN1	8,923	8,533	0,362	0,378
AZU1	7,053	7,556	0,720	0,764
F9	8,870	9,498	0,627	0,345

Tabla 15: AUC para combinaciones de ejemplo de biomarcadores

N.º											ABC
1	CDH1										0,884
2	CDH1	BMPER									0,947
3	CDH1	BMPER	F9								0,951
4	CDH1	BMPER	F9	CCL23							0,954
5	CDH1	BMPER	F9	CCL23	CRK						0,980
6	CDH1	BMPER	F9	CCL23	CRK	BMP1					0,983
7	CDH1	BMPER	F9	CCL23	CRK	BMP1	TPT1				0,983
8	CDH1	BMPER	F9	CCL23	CRK	BMP1	TPT1	FRZB			0,987
9	CDH1	BMPER	F9	CCL23	CRK	BMP1	TPT1	FRZB	MDK		0,992
10	CDH1	BMPER	F9	CCL23	CRK	BMP1	TPT1	FRZB	MDK	ICAM2	0,993

Tabla 16: Cálculos derivados del conjunto de entrenamiento para el clasificador ingenuo de Bayes.

Biomarcador	μ_c	μ_d	σ_c	σ_d	\bar{x}	$p(c \bar{x})$	$p(d \bar{x})$	$\ln(p(d \bar{x})/p(c \bar{x}))$
BMPER	7,309	7,061	0,206	0,247	7,290	1,933	1,049	-0,611
CRK	7,196	7,686	0,252	0,414	7,323	1,396	0,656	-0,756
BMP1	8,616	8,303	0,271	0,350	8,878	0,921	0,295	-1,138
CCL23	7,224	7,528	0,152	0,259	7,283	2,434	0,986	-0,904
CDH1	9,132	8,827	0,161	0,267	9,594	0,040	0,024	-0,524
TPT1	9,224	10,393	0,805	1,202	8,304	0,258	0,073	-1,257
MDK	7,033	7,244	0,179	0,470	7,047	2,220	0,777	-1,050
ICAM2	7,392	7,369	0,041	0,063	7,447	3,931	2,928	-0,294
FRZB	8,136	8,466	0,315	0,297	8,025	1,190	0,448	-0,978
F9	8,870	9,498	0,627	0,345	10,009	0,122	0,385	1,147

Tabla 17 Características clínicas del conjunto de entrenamiento

Datos Meta	Niveles	Control	Meso	valor p
Muestras		140	158	
SEXO	F	41	28	2.61e-02
	M	99	130	
EDAD	Media	61,4	64,6	6.80e-03
	SD	10,6	9,8	

Tabla 18: Diez proteínas de los clasificadores de biomarcadores

Biomarcador	ID UniProt	Dirección*	Proceso biológico (GO)
CDH1	P12830	Descendente	regulación de la muerte celular
FRZB	Q92765	Ascendente	regulación de la vía de señalización
ICAM2	P13598	Descendente	
MDK	P21741	Ascendente	respuesta al estrés proceso de señalización
CCL23	P55773	Ascendente	proceso del sistema inmune respuesta al estrés comunicación celular proceso de señalización señalización
BMP1	P13497	Descendente	proteolisis
BMPER	Q8N8U9	Descendente	regulación de la vía de señalización
TPT1	P13693	Ascendente	regulación de la muerte celular
F9	P00740	Ascendente	proteolisis
CRK	P46108	Ascendente	proceso de señalización señalización regulación de la vía de señalización

Tabla 19: Biomarcadores de cáncer general

KIT	KLK3-SERPINA A3
C9	BMPER
AFM	VEGFA
CCL23	CDK8-CCNC
SERPINA4	DDC
CRP	APOA1
BMP1	ALB
EGFR	FGA-FGB-FGG

BDNF	FN1
ITIH4	CFHR5
CDK5-CDK5R1	EFNA5

Tabla 20: Paneles de 1 biomarcador

Marcadores		CV AUC media
1	C9	0,792
2	KLK3-SERPINA A3	0,782
3	CRP	0,763
4	SERPINA A4	0,762
5	AFM	0,750
6	BMPER	0,745
7	ALB	0,737
8	APOA1	0,733
9	BMP1	0,732
10	KIT	0,729
11	EGFR	0,726
12	ITIH4	0,721
13	VEGFA	0,720
14	BDNF	0,720
15	FGA-FGB-FGG	0,712
16	EFNA5	0,697
17	DDC	0,696
18	FN1	0,694
19	CDK8-CCNC	0,692
20	CCL23	0,692
21	CFHR5	0,674
22	CDK5-CDK5R1	0,666

Tabla 21: Paneles de 2 Biomarcadores

Marcadores			CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3	EGFR	0,826
2	KLK3-SERPINA A3	BDNF	0,823
3	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	0,820
4	KIT	C9	0,819
5	BDNF	C9	0,818
6	KLK3-SERPINA A3	BMP1	0,816
7	KLK3-SERPINA A3	BMPER	0,816
8	KLK3-SERPINA A3	KIT	0,815
9	C9	BMPER	0,814
10	EFNA5	C9	0,812
11	KLK3-SERPINA A3	C9	0,811
12	KLK3-SERPINA A3	CRP	0,811

ES 2 688 048 T3

13	EGFR	C9	0,811
14	BMPER	CRP	0,810
15	BDNF	CRP	0,810
16	C9	DDC	0,809
17	KLK3-SERPINA A3	DDC	0,807
18	KLK3-SERPINA A3	ALB	0,806
19	BDNF	SERPINA A4	0,805
20	BMP1	CRP	0,805
21	C9	CRP	0,802
22	C9	ALB	0,802
23	KLK3-SERPINA A3	CCL23	0,802
24	KLK3-SERPINA A3	FN1	0,801
25	BDNF	KIT	0,801
26	EGFR	SERPINA A4	0,801
27	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	0,800
28	EFNA5	CRP	0,799
29	EGFR	ITIH4	0,799
30	BMPER	AFM	0,798
31	C9	BMP1	0,798
32	KIT	CRP	0,798
33	C9	SERPINA A4	0,798
34	C9	ITIH4	0,797
35	SERPINA A4	BMPER	0,796
36	EFNA5	SERPINA A4	0,796
37	KLK3-SERPINA A3	APOA1	0,795
38	EGFR	CRP	0,795
39	KIT	SERPINA A4	0,795
40	EGFR	AFM	0,795
41	VEGFA	C9	0,795
42	C9	FN1	0,794
43	C9	AFM	0,793
44	KLK3-SERPINA A3	AFM	0,793
45	KLK3-SERPINA A3	SERPINA A4	0,792
46	BMP1	SERPINA A4	0,792
47	KIT	BMP1	0,791
48	BDNF	AFM	0,791
49	CCL23	C9	0,791
50	KIT	BMPER	0,790
51	KLK3-SERPINA A3	ITIH4	0,790
52	DDC	CRP	0,789
53	CCL23	CRP	0,789
54	C9	CDK5-CDK5R1	0,788

ES 2 688 048 T3

55	BDNF	VEGFA	0,788
56	EGFR	ALB	0,788
57	KIT	AFM	0,787
58	BMPER	ITIH4	0,786
59	BDNF	ALB	0,785
60	KLK3-SERPINA A3	CDK8-CCNC	0,785
61	FN1	CRP	0,784
62	BDNF	BMPER	0,784
63	APOA1	C9	0,784
64	C9	CDK8-CCNC	0,784
65	EGFR	BMPER	0,783
66	EFN A5	AFM	0,783
67	VEGFA	CRP	0,783
68	SERPINA A4	DDC	0,783
69	CRP	AFM	0,783
70	BMP1	BMPER	0,783
71	DDC	ITIH4	0,783
72	KLK3-SERPINA A3	VEGFA	0,782
73	CRP	CDK5-CDK5R1	0,782
74	DDC	AFM	0,782
75	BMP1	AFM	0,782
76	EFNA5	BMPER	0,781
77	CRP	ITIH4	0,781
78	FN1	SERPINA A4	0,780
79	BDNF	ITIH4	0,780
80	ALB	CRP	0,779
81	VEGFA	EGFR	0,779
82	EFNA5	BMP1	0,778
83	C9	CFHR5	0,777
84	BDNF	EGFR	0,776
85	SERPINA4	CRP	0,776
86	BDNF	DDC	0,776
87	SERPINA4	AFM	0,775
88	KIT	EGFR	0,775
89	EFNA5	ALB	0,775
90	KLK3-SERPINA A3	FGA-FGB-FGG	0,775
91	APOA1	CRP	0,774
92	CDK8-CCNC	CRP	0,774
93	BMP1	ALB	0,774
94	BMP1	DDC	0,774
95	DDC	BMPER	0,774
96	BMP1	ITIH4	0,774
97	EFNA5	EGFR	0,773
98	KIT	ITIH4	0,773
99	EFNA5	APOA1	0,772
100	FN1	AFM	0,772

Tabla 22: Paneles de 3 Biomarcadores

Marcadores				CV AUC media
1	BDNF	KIT	C9	0,846
2	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	0,842
3	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	0,838
4	BDNF	KIT	CRP	0,837
5	KLK3-SERPINA3	EFN A5	EGFR	0,836
6	KLK3-SERPINA A3	BDNF	C9	0,836
7	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	C9	0,835
8	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	BMP1	0,835
9	KLK3-SERPINA A3	BDNF	CRP	0,834
10	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	CRP	0,833
11	KLK3-SERPINA A3	KIT	BMP1	0,833
12	BDNF	KIT	SERPINA A4	0,833
13	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EGFR	0,833
14	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	0,833
15	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	0,833
16	KLK3-SERPINA A3	EGFR	ITIH4	0,832
17	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	BMPER	0,831
18	KLK3-SERPINA A3	EGFR	C9	0,831
19	KLK3-SERPINA A3	EGFR	BMPER	0,830
20	BDNF	C9	CRP	0,830
21	KIT	C9	BMPER	0,830
22	KIT	EFN A5	C9	0,830
23	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	ALB	0,829
24	KLK3-SERPINA A3	KIT	BMPER	0,829
25	KLK3-SERPINA A3	BDNF	DDC	0,829
26	BDNF	EGFR	C9	0,829
27	KLK3-SERPINA A3	EGFR	ALB	0,829
28	KLK3-SERPINA A3	KIT	C9	0,828
29	KLK3-SERPINA A3	BDNF	SERPINA A4	0,828
30	KIT	C9	DDC	0,828
31	BDNF	C9	SERPINA A4	0,828
32	KLK3-SERPINA A3	EGFR	CRP	0,828
33	KLK3-SERPINA A3	EGFR	BMP1	0,827
34	BDNF	C9	DDC	0,827
35	KIT	EGFR	C9	0,827
36	KLK3-SERPINA A3	BMP1	CRP	0,826
37	KLK3-SERPINA A3	C9	BMPER	0,826
38	KLK3-SERPINA A3	C9	DDC	0,825
39	KLK3-SERPINA A3	BDNF	ALB	0,825
40	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	SERPINA A4	0,825
41	KLK3-SERPINA A3	EGFR	DDC	0,825
42	EGFR	C9	ITIH4	0,825
43	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	APOA1	0,825
44	KLK3-SERPINA A3	EGFR	FN1	0,825
45	KIT	C9	BMP1	0,825
46	KLK3-SERPINA A3	BMPER	CRP	0,825
47	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	FN1	0,824

ES 2 688 048 T3

48	KLK3-SERPINA A3	BDNF	BMPER	0,824
49	EGFR	C9	BMPER	0,824
50	KLK3-SERPINA A3	EGFR	SERPINA A4	0,824
51	BDNF	EFN A5	C9	0,824
52	KLK3-SERPINA A3	BDNF	BMP1	0,824
53	KLK3-SERPINA A3	BDNF	VEGFA	0,824
54	BDNF	VEGFA	C9	0,824
55	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	CDK8-CCNC	0,824
56	BDNF	C9	BMPER	0,824
57	KIT	BMP1	CRP	0,824
58	BDNF	C9	ALB	0,824
59	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	ITIH4	0,823
60	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	KIT	0,823
61	KLK3-SERPINA A3	VEGFA	EGFR	0,823
62	KLK3-SERPINA A3	BDNF	FN1	0,823
63	EGFR	C9	ALB	0,823
64	KLK3-SERPINA A3	KIT	CRP	0,823
65	C9	DDC	BMPER	0,823
66	KLK3-SERPINA A3	EGFR	AFM	0,823
67	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	EFN A5	0,823
68	EFNA5	EGFR	C9	0,823
69	KLK3-SERPINA A3	DDC	BMPER	0,823
70	EFNA5	C9	BMPER	0,822
71	KLK3-SERPINA A3	BMP1	DDC	0,822
72	EFNA5	BMP1	CRP	0,822
73	BDNF	C9	AFM	0,822
74	C9	BMPER	CRP	0,822
75	KLK3-SERPINA A3	BDNF	ITIH4	0,822
76	KLK3-SERPINA A3	KIT	FN1	0,822
77	BDNF	EGFR	CRP	0,821
78	KIT	C9	CRP	0,821
79	EGFR	C9	SERPINA A4	0,821
80	BDNF	EGFR	SERPINA A4	0,821
81	KLK3-SERPINA A3	BMP1	BMPER	0,821
82	KIT	EFN A5	SERPINA A4	0,821
83	EFNA5	C9	CRP	0,821
84	BDNF	BMPER	CRP	0,821
85	KLK3-SERPINA A3	KIT	CCL23	0,821
86	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	EGFR	0,821
87	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	DDC	0,821
88	C9	BMPER	ITIH4	0,821
89	KIT	BMPER	CRP	0,821
90	EGFR	C9	AFM	0,820
91	KLK3-SERPINA A3	BDNF	AFM	0,820
92	BDNF	BMP1	CRP	0,820
93	KLK3-SERPINA A3	EGFR	CCL23	0,820
94	KIT	C9	SERPINA A4	0,820
95	BDNF	EFN A5	CRP	0,820
96	EFNA5	C9	ALB	0,820

97	KLK3-SERPINA A3	BMPER	ITIH4	0,819
98	KLK3-SERPINA A3	CCL23	CRP	0,819
99	EGFR	C9	DDC	0,819
100	KIT	EFN A5	CRP	0,819

Tabla 23: Paneles de 4 Biomarcadores

Marcadores					CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	0,849
2	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	0,848
3	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	CRP	0,848
4	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	0,847
5	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	0,846
6	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	0,846
7	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	CRP	0,845
8	BDNF	KIT	C9	DDC	0,845
9	BDNF	KIT	C9	CRP	0,844
10	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,844
11	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	0,844
12	BDNF	KIT	C9	SERPINA A4	0,844
13	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	DDC	0,844
14	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	ITIH4	0,843
15	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,843
16	BDNF	KIT	C9	BMPER	0,843
17	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	BMP1	CRP	0,843
18	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	C9	0,843
19	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMPER	0,843
20	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	CRP	0,843
21	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	SERPINA A4	0,842
22	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EGFR	C9	0,842
23	BDNF	KIT	C9	CDK8-CCNC	0,842
24	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	0,842
25	BDNF	KIT	BMP1	CRP	0,842
26	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	CRP	0,841
27	BDNF	KIT	VEGFA	C9	0,841
28	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	BMP1	0,841
29	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	ITIH4	0,841
30	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	0,841
31	BDNF	KIT	C9	ALB	0,841
32	KLK3-SERPINA A3	KIT	C9	BMPER	0,841
33	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	BMPER	0,841
34	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EGFR	CRP	0,840
35	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	BMPER	0,840
36	KLK3-SERPINA A3	BDNF	C9	CRP	0,840
37	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	ITIH4	0,840
38	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	ALB	0,840
39	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	BMP1	0,840
40	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	FN1	0,840
41	BDNF	KIT	C9	AFM	0,840
42	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	C9	BMPER	0,840

ES 2 688 048 T3

43	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	VEGFA	0,840
44	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	ALB	0,839
45	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	BMP1	0,839
46	BDNF	KIT	EFN A5	CRP	0,839
47	BDNF	KIT	C9	FN1	0,839
48	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	SERPINA A4	0,839
49	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	ALB	0,839
50	BDNF	KIT	C9	BMP1	0,839
51	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	C9	0,839
52	KLK3-SERPINA A3	BDNF	C9	DDC	0,839
53	KLK3-SERPINA A3	EGFR	BMPER	ITIH4	0,839
54	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	BMPER	CRP	0,838
55	KLK3-SERPINA A3	EGFR	DDC	ITIH4	0,838
56	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	C9	CRP	0,838
57	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	FN1	0,838
58	BDNF	KIT	SERPINA A4	BMPER	0,838
59	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	C9	ALB	0,838
60	KLK3-SERPINA A3	BDNF	BMP1	CRP	0,838
61	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	BMPER	0,838
62	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	SERPINA A4	0,837
63	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	AFM	0,837
64	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	EGFR	0,837
65	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	ALB	0,837
66	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	FN1	CRP	0,837
67	KLK3-SERPINA A3	KIT	C9	DDC	0,837
68	BDNF	KIT	EFN A5	SERPINA A4	0,837
69	KLK3-SERPINA A3	KIT	BMP1	BMPER	0,837
70	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	ITIH4	0,837
71	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	C9	DDC	0,837
72	KIT	EFN A5	C9	BMPER	0,837
73	BDNF	KIT	EGFR	SERPINA A4	0,837
74	BDNF	KIT	SERPINA A4	DDC	0,837
75	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EGFR	ITIH4	0,837
76	KLK3-SERPINA A3	EGFR	C9	BMPER	0,837
77	BDNF	KIT	EGFR	CRP	0,837
78	KLK3-SERPINA A3	EGFR	CRP	ITIH4	0,837
79	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	FN1	0,836
80	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	SERPINA A4	0,836
81	KLK3-SERPINA A3	BDNF	C9	SERPINA A4	0,836
82	KLK3-SERPINA A3	KIT	BMP1	ALB	0,836
83	BDNF	EGFR	C9	CRP	0,836
84	KLK3-SERPINA A3	BDNF	C9	ALB	0,836
85	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	CRP	ITIH4	0,836
86	KLK3-SERPINA A3	EGFR	C9	DDC	0,836
87	KLK3-SERPINA A3	BDNF	DDC	CRP	0,836
88	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EGFR	SERPINA A4	0,836
89	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	CCL23	0,836

90	KLK3-SERPINA3	BDNF	C9	FN1	0,836
91	KIT	EFN A5	C9	SERPINA A4	0,836
92	BDNF	KIT	VEGFA	CRP	0,836
93	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	BMP1	BMPER	0,836
94	BDNF	KIT	BMPER	CRP	0,836
95	KLK3-SERPINA A3	KIT	BMP1	CRP	0,836
96	KIT	EFN A5	BMP1	CRP	0,836
97	KLK3-SERPINA A3	EGFR	FN1	ITIH4	0,836
98	KLK3-SERPINA A3	KIT	BMPER	CRP	0,835
99	KLK3-SERPINA A3	KIT	BMP1	DDC	0,835
100	KLK3-SERPINA A3	EGFR	C9	ALB	0,835

Tabla 24: Paneles de 5 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,854
2	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	CRP	0,853
3	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	CRP	0,852
4	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,851
5	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	BMPER	0,851
6	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,850
7	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	ITIH4	0,849
8	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	CRP	ITIH4	0,849
9	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	BMPER	0,849
10	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	ALB	0,849
11	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	C9	0,849
12	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	ALB	0,849
13	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	CRP	0,849
14	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	DDC	0,849
15	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	CRP	0,849
16	BDNF	KIT	EFN A5	C9	CRP	0,849
17	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	BMP1	CRP	0,848
18	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	BMP1	0,848
19	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	BMPER	0,848
20	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	CRP	0,848
21	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	C9	CRP	0,848
22	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	ITIH4	0,848
23	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	SERPINA A4	0,848
24	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,848
25	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	FN1	0,848
26	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	DDC	0,848
27	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	CRP	0,848
28	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	BMP1	0,848
29	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	C9	BMPER	0,847
30	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMPER	CRP	0,847
31	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	ALB	0,847
32	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	FN1	CRP	0,847
33	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	SERPINA A4	0,847
34	BDNF	KIT	EGFR	C9	CRP	0,847
35	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	FN1	0,846

ES 2 688 048 T3

36	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	FN1	0,846
37	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	BMP1	0,846
38	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	ITIH4	0,846
39	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	BDNF	KIT	C9	0,846
40	BDNF	KIT	EGFR	C9	SERPINA A4	0,846
41	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	SERPINA A4	BMPER	0,846
42	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	CRP	0,846
43	BDNF	KIT	C9	SERPINA A4	BMPER	0,846
44	BDNF	KIT	EFN A5	C9	SERPINA A4	0,846
45	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	SERPINA A4	0,846
46	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	FN1	ITIH4	0,846
47	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	ITIH4	0,846
48	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	ITIH4	0,846
49	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	FN1	CRP	0,846
50	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	SERPINA A4	0,846
51	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	ALB	0,846
52	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	FN1	0,846
53	BDNF	KIT	EGFR	C9	AFM	0,846
54	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	CRP	ITIH4	0,846
55	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	BMPER	0,845
56	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	ALB	0,845
57	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	BMP1	CRP	0,845
58	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	SERPINA A4	0,845
59	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	ALB	0,845
60	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	CCL23	C9	0,845
61	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	SERPINA A4	BMPER	0,845
62	KLK3-SERPINA A3	CDK5-CDK5R1	BDNF	KIT	CRP	0,845
63	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EFN A5	EGFR	C9	0,845
64	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	ITIH4	0,845
65	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	DDC	ITIH4	0,845
66	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	CRP	0,845
67	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	ALB	0,845
68	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	BMP1	0,845
69	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	ITIH4	0,845
70	BDNF	KIT	C9	BMPER	CRP	0,845
71	KLK3-SERPINA A3	BDNF	EGFR	C9	CRP	0,845
72	BDNF	KIT	EGFR	C9	ALB	0,845
73	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	VEGFA	EGFR	0,845
74	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	C9	ALB	0,845
75	KLK3-SERPINA A3	KIT	EGFR	DDC	ITIH4	0,845
76	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	SERPINA4	0,845
77	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	C9	CDK8-CCNC	0,844
78	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EGFR	BMP1	0,844
79	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	FN1	SERPINA4	0,844
80	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	DDC	0,844
81	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	SERPINA A4	DDC	0,844

82	BDNF	KIT	EGFR	C9	ITIH4	0,844
83	BDNF	KIT	EGFR	C9	FN1	0,844
84	BDNF	KIT	C9	BMP1	CRP	0,844
85	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	BMP1	AFM	0,844
86	BDNF	KIT	C9	SERPINA A4	DDC	0,844
87	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	FN1	0,844
88	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	ITIH4	0,844
89	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	VEGFA	CRP	0,844
90	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	BMPER	0,844
91	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	FN1	0,844
92	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	AFM	0,844
93	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	BMP1	CRP	0,844
94	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	BMP1	0,844
95	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	BMPER	0,844
96	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	VEGFA	C9	0,844
97	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	C9	CDK8-CCNC	0,844
98	KIT	EFN A5	EGFR	C9	SERPINA A4	0,844
99	BDNF	KIT	C9	FN1	SERPINA A4	0,844
100	KLK3-SERPINA A3	EFN A5	EGFR	C9	DDC	0,844

Tabla 25: Paneles de 6 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,856
2	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	CRP	0,855
3	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	BMP1	0,854
4	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,854
5	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	BDNF	KIT	EFN A5	CRP	0,853
6	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,853
7	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,853
8	KLK3-SERPINA A3 CDK8-CCNC	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,852
9	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,852
10	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,852
11	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,852
12	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF	KIT	EFN A5	CRP	0,852
13	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	BMP1	BMPER	0,852
14	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	BMP1	FN1	0,852
15	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,852

ES 2 688 048 T3

16	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,852
17	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,852
18	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT	EFN A5	C9	DDC	0,852
19	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,851
20	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,851
21	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	FN1	0,851
22	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	EGFR	BMP1	0,851
23	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,851
24	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	BMP1	CRP	0,851
25	KLK3-SERPINA A3 DDC	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,851
26	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,851
27	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT	EFN A5	C9	FN1	0,851
28	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	BMP1	0,851
29	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,851
30	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,851
31	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,851
32	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,851
33	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT	EFN A5	EGFR	BMP1	0,851
34	KLK3-SERPINA A3 BMPER	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,850
35	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	CRP	ITIH4	0,850
36	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,850
37	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	C9	ITIH4	0,850
38	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,850
39	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,850
40	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	ALB	0,850
41	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	DDC	0,850
42	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	SERPINA4	0,850
43	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	C9	BMP1	0,850

ES 2 688 048 T3

44	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	FN1	0,850
45	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	C9	CRP	0,850
46	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT	EFN A5	C9	BMP1	0,850
47	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,850
48	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	CDK8-CCNC	0,850
49	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT	EFN A5	C9	SERPINA A4	0,850
50	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	BDNF	KIT	EGFR	CRP	0,850
51	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	EGFR	BMPER	0,850
52	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,850
53	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,850
54	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT	EFN A5	C9	FN1	0,850
55	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	BMP1	ALB	0,850
56	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,850
57	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	C9	BMPER	0,850
58	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	BMP1	FN1	0,850
59	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	BMPER	0,850
60	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	EFN A5	EGFR	C9	0,850
61	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	C9	DDC	0,850
62	KLK3-SERPINA A3 BMPER	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,850
63	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	C9	BMPER	0,850
64	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF	KIT	VEGFA	EFN A5	0,849
65	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	DDC	0,849
66	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	EGFR	FN1	0,849
67	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT	EFN A5	BMP1	SERPINA A4	0,849
68	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT	EFN A5	C9	FN1	0,849
69	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	DDC	ITIH4	0,849
70	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EFN A5	BMPER	0,849
71	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT	EFN A5	C9	BMP1	0,849

ES 2 688 048 T3

72	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT	EFN A5	BMP1	FN1	0,849
73	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	FN1	CRP	0,849
74	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	EGFR	ITIH4	0,849
75	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF	KIT	EGFR	FN1	0,849
76	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	KIT	EFN A5	FN1	CRP	0,849
77	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	EFN A5	EGFR	FN1	CRP	0,849
78	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF	KIT	EFN A5	FN1	0,849
79	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	C9	BMPER	0,849
80	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,849
81	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	VEGFA	EFN A5	0,849
82	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT	EFN A5	EGFR	BMP1	0,849
83	KLK3-SERPINA A3 AFM	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,849
84	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	C9	FN1	0,849
85	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT	EFN A5	EGFR	BMP1	0,849
86	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT	EFN A5	C9	BMP1	0,849
87	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT	EFN A5	C9	BMPER	0,849
88	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT	EFN A5	EGFR	FN1	0,849
89	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT	EFN A5	BMP1	DDC	0,849
90	BDNF SERPINA4	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,849
91	KLK3-SERPINA A3 ITIH4	EFN A5	EGFR	BMP1	CRP	0,849
92	KLK3-SERPINA A3 DDC	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,849
93	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	EGFR	BMP1	0,849
94	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF	KIT	C9	CRP	0,849
95	KLK3-SERPINA A3 AFM	BDNF	KIT	EFN A5	C9	0,848
96	KLK3-SERPINA A3 CDK8-CCNC	BDNF	KIT	EGFR	C9	0,848
97	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF	KIT	C9	BMP1	0,848
98	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT	EFN A5	BMP1	CRP	0,848
99	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT	EFN A5	C9	BMP1	0,848

100	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF	KIT	EFN A5	SERPINA A4	0,848
-----	------------------------	------	-----	--------	------------	-------

Tabla 26: Paneles de 7 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	FN1	0,855
2	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,855
3	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	C9	0,855
4	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5	EGFR	C9	0,855
5	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CRP	KIT	EFN A5	EGFR	0,855
6	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,854
7	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,854
8	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	C9	0,854
9	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	0,854
10	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	BMP1	0,854
11	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	0,854
12	KLK3-SERPINA A3 CDK8-CCNC	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,854
13	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	C9	0,854
14	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT ALB	EFN A5	EGFR	C9	0,854
15	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	C9	0,854
16	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,854
17	KLK3-SERPINA A3 BMPER	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,854
18	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	C9	0,854
19	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	C9	0,853
20	KLK3-SERPINA A3 DDC	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,853
21	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	C9	0,853
22	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT	EFN A5	EGFR	0,853
23	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	FN1	0,853
24	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF CRP	KIT	EFN A5	BMP1	0,853
25	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT	EFN A5	EGFR	0,853
26	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,853

ES 2 688 048 T3

	FN1	BMPER				
27	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT ITIH4	EFN A5	C9	DDC	0,853
28	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF CRP	KIT	EFN A5	C9	0,853
29	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	DDC	0,853
30	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	BMPER	0,853
31	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT ITIH4	EFN A5	C9	DDC	0,853
32	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	CRP	0,853
33	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5	EGFR	C9	0,853
34	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	FN1	0,853
35	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	CRP	0,853
36	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT ALB	EFN A5	EGFR	C9	0,853
37	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT CRP	EFN A5	EGFR	C9	0,853
38	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	BMP1	DDC	0,853
39	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5	EGFR	C9	0,852
40	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT ITIH4	EFN A5	DDC	CRP	0,852
41	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	BMP1	FN1	0,852
42	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	BMP1	0,852
43	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CRP	KIT	VEGF A	EFN A5	0,852
44	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5	EGFR	C9	0,852
45	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF ALB	KIT	EFN A5	C9	0,852
46	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF ALB	KIT	EFN A5	EGFR	0,852
47	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT CRP	EFN A5	EGFR	C9	0,852
48	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	BMP1	0,852
49	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT ALB	EFN A5	EGFR	BMP1	0,852
50	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT BMPER	EFN A5	C9	FN1	0,852
51	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	0,852
52	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT CRP	EFN A5	EGFR	BMP1	0,852
53	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT	EFN A5	C9	0,852
54	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	ALB	0,852

ES 2 688 048 T3

	CRP	ITIH4				
55	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT CRP	EFN A5	EGFR	FN1	0,852
56	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT	EFN A5	EGFR	0,852
57	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5	EGFR	BMP1	0,852
58	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT BMPER	EFN A5	EGFR	C9	0,852
59	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF ALB	KIT	EFN A5	C9	0,852
60	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT CRP	EFN A5	EGFR	BMP1	0,852
61	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT CRP	EFN A5	EGFR	C9	0,852
62	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	0,852
63	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5	EGFR	C9	0,852
64	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5	EGFR	C9	0,852
65	KLK3-SERPINA A3 DDC	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	C9	0,852
66	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	DDC	0,852
67	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	SERPINA A4	0,852
68	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF CRP	KIT	EFN A5	BMP1	0,852
69	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	C9	0,852
70	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	BMP1	0,852
71	KLK3-SERPINA A3 DDC	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	EGFR	0,851
72	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT AFM	EFN A5	EGFR	C9	0,851
73	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5	C9	FN1	0,851
74	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	BDNF BMPER	KIT	EFN A5	C9	0,851
75	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF CRP	KIT	VEGF A	EFN A5	0,851
76	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT ITIH4	EFN A5	C9	FN1	0,851
77	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT	EFN A5	EGFR	0,851
78	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5	EGFR	BMP1	0,851
79	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF AFM	KIT	EFN A5	C9	0,851
80	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF CRP	KIT	EFN A5	EGFR	0,851
81	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF ALB	KIT	EGFR	C9	0,851
82	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,851

	C9	BMPER				
83	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	FN1	0,851
84	KLK3-SERPINA A3 CRP	BDNF AFM	KIT	EFN A5	C9	0,851
85	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5	BMP1	FN1	0,851
86	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5	C9	FN1	0,851
87	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF CRP	KIT	EFN A5	BMP1	0,851
88	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT CRP	EFN A5	BMP1	FN1	0,851
89	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF ITIH4	KIT	EFN A5	C9	0,851
90	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CDK8-CCNC	KIT	EFN A5	EGFR	0,851
91	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5	EGFR	BMP1	0,851
92	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	VEGF A	EFN A5	EGFR	0,851
93	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT CRP	EFN A5	EGFR	BMP1	0,851
94	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	BMP1	BMPER	0,851
95	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF CRP	KIT	EFN A5	EGFR	0,851
96	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	BMP1	0,851
97	KLK3-SERPINA A3 SERPINA4	KIT ALB	EFN A5	EGFR	FN1	0,851
98	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5	EGFR	C9	0,851
99	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF ITIH4	KIT	EGFR	C9	0,851
100	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT ITIH4	EFN A5	C9	DDC	0,851

Tabla 27: Paneles de 8 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,856
2	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,856
3	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5	EGFR	0,855
4	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMP1	0,855
5	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMP1	0,855
6	KLK3-SERPINA A3	KIT SERPINA	EFN A5 ALB	EGFR	C9	0,855

ES 2 688 048 T3

	FN1	A4				
7	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,855
8	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR	BMP1	0,855
9	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,855
10	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,855
11	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,855
12	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT DDC	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,855
13	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,855
14	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,855
15	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR	C9	0,855
16	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR	C9	0,854
17	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT ALB	EFN A5	EGFR	0,854
18	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT CRP	EFN A5	EGFR	0,854
19	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,854
20	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5	EGFR	0,854
21	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMP1	0,854
22	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,854
23	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,854
24	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF DDC	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,854
25	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,854
26	KLK3-SERPINA	KIT	EFN A5	EGFR	C9	0,854

ES 2 688 048 T3

	A3 FN1	SERPINA A4	ITIH4			
27	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMP1	0,854
28	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR	BMP1	0,854
29	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	C9	0,854
30	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF ALB	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,854
31	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT CRP	VEGFA ITIH4	EFN A5	EGFR	0,854
32	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF ALB	KIT CRP	EFN A5	C9	0,854
33	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMP1	0,854
34	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 CRP	EGFR	BMP1	0,854
35	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5	C9	0,854
36	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR	C9	0,854
37	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF ALB	KIT CRP	EFN A5	EGFR	0,854
38	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,854
39	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT CRP	EFN A5	C9	0,854
40	KLK3-SERPINA A3 DDC	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,854
41	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,854
42	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR	C9	0,854
43	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR	C9	0,854
44	KLK3-SERPINA A3 BMPER	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	C9	0,854
45	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5	EGFR	0,854

ES 2 688 048 T3

46	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,853
47	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,853
48	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT CRP	EFN A5	EGFR	0,853
49	KLK3-SERPINA A3 ALB	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
50	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMP1	0,853
51	KLK3-SERPINA A3 C9	KIT FN1	VEGFA ITIH4	EFN A5	EGFR	0,853
52	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR	C9	0,853
53	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,853
54	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5	C9	0,853
55	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	DDC	0,853
56	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
57	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	C9	FN1	0,853
58	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,853
59	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	C9	0,853
60	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
61	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
62	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT BMPER	EFN A5	EGFR	0,853
63	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR	C9	0,853
64	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,853
65	KLK3-SERPINA A3	BDNF C9	KIT CRP	VEGFA	EFN A5	0,853

ES 2 688 048 T3

	EGFR					
66	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
67	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF SERPINA A4	KIT CRP	EFN A5	C9	0,853
68	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5	EGFR	0,853
69	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF BMPER	KIT CRP	EFN A5	C9	0,853
70	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF DDC	KIT CRP	EFN A5	C9	0,853
71	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT FN1	EFN A5	EGFR	0,853
72	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
73	KLK3-SERPINA A3 DDC	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	C9	0,853
74	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT DDC	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
75	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 ALB	EGFR	C9	0,853
76	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF ALB	KIT CRP	EFN A5	C9	0,853
77	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5	EGFR	0,853
78	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR	C9	0,853
79	KLK3-SERPINA A3 EGFR	BDNF C9	KIT FN1	VEGFA	EFN A5	0,853
80	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR	C9	0,853
81	KLK3-SERPINA A3 CDK8-CCNC	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5	C9	0,853
82	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
83	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,853
84	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	C9	DDC	0,853
85	KLK3-SERPINA	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,853

	A3 C9	ALB	AFM			
86	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 ALB	EGFR	C9	0,853
87	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 AFM	EGFR	C9	0,853
88	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,853
89	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CRP	KIT ITIH4	VEGFA	EFN A5	0,853
90	KLK3-SERPINA A3 CRP	KIT AFM	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMPER	0,853
91	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	BMP1	DDC	0,853
92	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	BMP1	0,853
93	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5	C9	0,853
94	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	C9	0,853
95	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR	C9	0,853
96	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	EGFR	FN1	0,853
97	KLK3-SERPINA A3 ALB	BDNF CRP	KIT ITIH4	EFN A5	EGFR	0,852
98	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	C9	FN1	0,852
99	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF C9	KIT CRP	EFN A5	EGFR	0,852
100	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR	BMP1	0,852

Tabla 28: Paneles de 9 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,856
2	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,856
3	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,856
4	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,855

ES 2 688 048 T3

5	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ITIH4	C9	0,855
6	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF ALB	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,855
7	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	BMP1	0,855
8	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	BMP1	0,855
9	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR	0,855
10	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,855
11	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,855
12	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR ALB	C9	0,855
13	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,855
14	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,855
15	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,855
16	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,855
17	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,855
18	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT SERPINA A4	EFN A5 CRP	EGFR	0,855
19	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	BMP1	0,855
20	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 CRP	EGFR	0,854
21	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
22	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	BMP1	0,854
23	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,854
24	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
25	KLK3-SERPINA A3 C9	KIT FN1	VEGFA ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
26	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR ITIH4	C9	0,854
27	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR ITIH4	C9	0,854
28	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,854
29	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT ALB	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	C9	0,854
30	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR	0,854
31	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	C9	0,854
32	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF ALB	KIT AFM	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854

ES 2 688 048 T3

33	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR	0,854
34	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT AFM	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
35	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR	0,854
36	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR	0,854
37	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR CRP	C9	0,854
38	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ITIH4	BMP1	0,854
39	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF ALB	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
40	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR	0,854
41	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMPER	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
42	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
43	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF C9	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
44	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	C9	0,854
45	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	FN1	0,854
46	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,854
47	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF C9	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR	0,854
48	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	FN1	0,854
49	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF DDC	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
50	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	FN1	0,854
51	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT DDC	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
52	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT DDC	EFN A5 BMPER	C9 ITIH4	FN1	0,854
53	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR ITIH4	C9	0,854
54	KLK3-SERPINA A3 C9	KIT FN1	VEGFA CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
55	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF CRP	KIT AFM	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
56	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
57	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	BMP1	0,854
58	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	C9	0,854
59	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR	0,854
60	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT ALB	EFN A5 AFM	EGFR	0,854

ES 2 688 048 T3

61	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	VEGFA CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
62	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
63	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT DDC	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
64	KLK3-SERPINA A3 EGFR	BDNF C9	KIT CRP	VEGFA ITIH4	EFN A5	0,854
65	KLK3-SERPINA A3 BMPER	KIT CRP	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	FN1	0,854
66	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF C9	KIT FN1	VEGFA CRP	EFN A5	0,854
67	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	BMP1	0,854
68	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR CRP	C9	0,854
69	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	FN1	0,854
70	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 CRP	C9 ITIH4	FN1	0,854
71	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR	0,854
72	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT CRP	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	FN1	0,854
73	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CDK8-CCNC	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,854
74	KLK3-SERPINA A3 EGFR	BDNF C9	KIT FN1	VEGFA CRP	EFN A5	0,854
75	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,854
76	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR ITIH4	C9	0,853
77	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR	0,853
78	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CRP	KIT AFM	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,853
79	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR ITIH4	C9	0,853
80	KLK3-SERPINA A3 EGFR	BDNF C9	KIT FN1	VEGFA SERPINA A4	EFN A5	0,853
81	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	C9	0,853
82	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 DDC	EGFR ITIH4	C9	0,853
83	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	BMP1	0,853
84	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF DDC	KIT ALB	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,853
85	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	BMP1	0,853
86	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,853
87	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	C9	0,853
88	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR ITIH4	C9	0,853

89	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR	0,853
90	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,853
91	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT BMPER	EFN A5 AFM	EGFR	0,853
92	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR CRP	BMP1	0,853
93	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR BMPER	C9	0,853
94	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR ALB	C9	0,853
95	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	FN1	0,853
96	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 ITIH4	EGFR	0,853
97	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	C9	0,853
98	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT DDC	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,853
99	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	C9	0,853
100	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF DDC	KIT CRP	EFN A5 ITIH4	C9	0,853

Tabla 29: Paneles de 10 Biomarcadores

Marcadores						CV AUC media
1	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,856
2	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,856
3	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	0,856
4	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 DDC	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,856
5	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,856
6	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,856
7	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR CRP	0,855
8	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT ALB	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,855
9	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,855
10	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR CRP	BMP1 ITIH4	0,855
11	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR ALB	0,855
12	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,855
13	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,855
14	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR CRP	0,855
15	KLK3-SERPINA A3	KIT	EFN A5	EGFR	BMP1	0,855

ES 2 688 048 T3

	FN1	DDC	BMPER	CRP	ITIH4	
16	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,855
17	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,855
18	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,855
19	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,855
20	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR BMPER	C9 ITIH4	0,855
21	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT C9	VEGFA FN1	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,855
22	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR AFM	0,855
23	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,855
24	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,855
25	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,855
26	KLK3-SERPINA A3 C9	KIT FN1	VEGFA ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
27	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR CRP	0,854
28	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,854
29	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR ITIH4	0,854
30	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
31	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,854
32	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR CRP	BMP1 ITIH4	0,854
33	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF C9	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
34	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR AFM	0,854
35	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR CRP	0,854
36	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,854
37	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ITIH4	0,854
38	KLK3-SERPINA A3 EGFR	BDNF C9	KIT FN1	VEGFA CRP	EFN A5 ITIH4	0,854
39	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR AFM	BMP1 ITIH4	0,854
40	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,854
41	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 ALB	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,854
42	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
43	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,854

ES 2 688 048 T3

	FN1	BMPER	CRP	AFM	ITIH4	
44	KLK3-SERPINA A3 C9	KIT FN1	VEGFA SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	0,854
45	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR BMPER	C9 ITIH4	0,854
46	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
47	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
48	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 ALB	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,854
49	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
50	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
51	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF CDK8-CCNC	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
52	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR AFM	FN1 ITIH4	0,854
53	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	0,854
54	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 ALB	EGFR AFM	FN1 ITIH4	0,854
55	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,854
56	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,854
57	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,854
58	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,854
59	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
60	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	BMP1 ITIH4	0,854
61	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	0,854
62	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 DDC	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,854
63	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
64	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	0,854
65	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT BMPER	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
66	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	0,854
67	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR AFM	BMP1 ITIH4	0,854
68	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 CRP	EGFR AFM	BMP1 ITIH4	0,854
69	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT BMPER	EFN A5 ALB	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,854
70	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	BMP1 ITIH4	0,854
71	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	VEGFA	EFN A5	0,854

ES 2 688 048 T3

	EGFR	C9	FN1	SERPINA A4	ALB	
72	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
73	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 ALB	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,854
74	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF ALB	KIT CRP	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
75	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 ALB	EGFR AFM	BMP1 ITIH4	0,854
76	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR AFM	BMP1 ITIH4	0,854
77	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,854
78	KLK3-SERPINA A3 BMP1	BDNF FN1	KIT CRP	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
79	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
80	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	VEGFA ALB	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,854
81	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF DDC	KIT BMPER	EFN A5 AFM	EGFR ITIH4	0,854
82	KLK3-SERPINA A3 SERPINA A4	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR AFM	FN1 ITIH4	0,854
83	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 DDC	EGFR BMPER	C9 ITIH4	0,854
84	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR BMPER	C9 ITIH4	0,854
85	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR BMPER	C9 ALB	0,854
86	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 DDC	EGFR BMPER	BMP1 ITIH4	0,853
87	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF C9	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR CRP	0,853
88	KLK3-SERPINA A3 FN1	BDNF SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,853
89	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF FN1	KIT DDC	EFN A5 ALB	EGFR ITIH4	0,853
90	KLK3-SERPINA A3 DDC	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR AFM	BMP1 ITIH4	0,853
91	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	BDNF C9	KIT FN1	VEGFA CRP	EFN A5 ITIH4	0,853
92	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,853
93	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 SERPINA A4	EGFR BMPER	C9 ITIH4	0,853
94	KLK3-SERPINA A3 FN1	KIT SERPINA A4	EFN A5 BMPER	EGFR ALB	C9 CRP	0,853
95	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 CRP	EGFR AFM	C9 ITIH4	0,853
96	KLK3-SERPINA A3 BMP1	KIT FN1	EFN A5 DDC	EGFR BMPER	C9 ITIH4	0,853
97	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT DDC	EFN A5 BMPER	EGFR CRP	C9 ITIH4	0,853
98	KLK3-SERPINA A3 C9	BDNF SERPINA A4	KIT BMPER	EFN A5 CRP	EGFR ITIH4	0,853
99	KLK3-SERPINA A3	BDNF	KIT	EFN A5	EGFR	0,853

	C9	BMP1	ALB	CRP	AFM	
100	KLK3-SERPINA A3 CDK5-CDK5R1	KIT FN1	EFN A5 DDC	EGFR ALB	C9 ITIH4	0,853

Tabla 30: Recuentos de marcadores en paneles de biomarcadores

Biomarcador	Tamaño del panel							
	3	4	5	6	7	8	9	10
AFM	149	146	123	138	142	197	262	354
ALB	129	120	129	148	194	258	332	405
APO A1	99	28	12	4	1	1	1	2
BDNF	169	326	447	480	476	478	491	513
BMP1	149	177	205	241	287	318	359	404
BMPER	160	227	236	260	280	311	357	409
C9	199	365	421	475	539	586	648	705
CCL23	98	65	39	33	21	23	14	19
CDK5-CDK5R1	72	58	73	84	129	153	182	223
CDK8-CCNC	98	52	52	61	71	68	87	98
CFHR5	69	6	1	1	0	0	0	0
CRP	181	254	292	342	403	478	549	599
DDC	142	189	192	217	231	274	323	374
EFN A5	157	277	416	566	727	859	931	958
EGFR	171	324	413	496	582	651	744	824
FGA-FGB-FGG	40	0	0	0	0	0	0	0
FN1	130	161	220	289	383	520	619	722
ITIH4	144	155	203	267	369	469	571	691
KIT	166	315	575	769	895	948	985	993
KLK3-SERPINA A3	201	490	681	821	897	951	970	980
SERPINA A4	162	179	201	226	278	325	407	498
VEGF A	115	86	69	82	95	132	168	229

Tabla 31: Parámetros derivados de conjuntos de datos de cáncer establecidos para los clasificadores ingenuos de Bayes

5

		Mesotelioma		CPNMC		Carc. de células renales	
		Control	Cáncer	Control	Cáncer	Control	Cáncer
ALB	Media	9,49	9,28	9,76	9,64	9,60	9,37
	SD	0,12	0,30	0,13	0,17	0,13	0,31
BMP1	Media	8,62	8,30	8,77	8,55	8,72	8,51
	SD	0,27	0,35	0,21	0,23	0,25	0,34
C9	Media	11,52	11,96	11,72	11,94	11,78	12,10
	SD	0,20	0,29	0,19	0,22	0,23	0,28
EFN A5	Media	6,70	6,83	6,91	6,99	6,88	7,01
	SD	0,11	0,25	0,11	0,15	0,14	0,20
EGFR	Media	10,46	10,26	10,58	10,43	10,52	10,38
	SD	0,11	0,21	0,12	0,13	0,14	0,12
FN1	Media	8,92	8,53	9,29	9,06	9,10	8,94
	SD	0,36	0,38	0,24	0,32	0,19	0,32
ITIH4	Media	10,18	10,46	10,60	10,74	10,56	10,82
	SD	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
	SD	0,16	0,20	0,14	0,14	0,16	0,19

KLK3-SERPINA A3	Media	8,00	8,51	8,10	8,33	8,09	8,68
	SD	0,16	0,53	0,19	0,33	0,23	0,48
SERPINA A4	Media	10,71	10,40	10,88	10,75	10,78	10,38
	SD	0,13	0,43	0,14	0,22	0,18	0,47

Tabla 32: Cálculos derivados del conjunto de entrenamiento para el clasificador ingenuo de Bayes.

Biomarcador	μ_c	μ_d	σ_c	σ_d	\bar{x}	$p(c \bar{x})$	$p(d \bar{x})$	$\ln(p(d \bar{x})/p(c \bar{x}))$
EFN A5	6,907	6,994	0,107	0,148	6,974	3,059	2,663	-0,139
KIT	9,603	9,503	0,139	0,141	9,534	2,546	2,767	0,083
FN1	9,286	9,058	0,239	0,325	9,266	1,665	1,000	-0,510
EGFR	10,578	10,428	0,119	0,135	10,547	3,236	2,003	-0,480
C9	11,715	11,936	0,189	0,223	11,715	2,114	1,096	-0,657
ALB	9,763	9,640	0,130	0,166	9,617	1,636	2,381	0,375
SERPINA A4	10,881	10,745	0,144	0,223	10,905	2,728	1,384	-0,679
KLK3-SERPINA A3	8,102	8,327	0,194	0,330	7,909	1,253	0,542	-0,838
BMP1	8,766	8,548	0,213	0,234	8,725	1,837	1,282	-0,360
ITIH4	10,596	10,738	0,121	0,227	10,600	3,301	1,460	-0,816

5 Los siguientes párrafos numerados contienen enunciados de las amplias combinaciones de las características técnicas de la invención divulgadas en el presente documento:

1. Un procedimiento para diagnosticar que un individuo tiene o no mesotelioma, comprendiendo el procedimiento:
 10 detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, en el que dicho individuo se clasifica como que tiene o no mesotelioma o se determina la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma, según dichos valores de biomarcadores y en el que N = 2-66.
- 15 2. El procedimiento del párrafo 1, en el que el diagnóstico comprende el diagnóstico diferencial de mesotelioma de afecciones benignas encontradas en individuos expuestos al amianto.
3. El procedimiento del párrafo 1 en el que el individuo tiene una anomalía pleural.
- 20 4. El procedimiento del párrafo 1, en el que la detección de los valores de los biomarcadores comprende realizar un ensayo *in vitro*.
- 25 5. El procedimiento del párrafo 4, en el que dicho ensayo *in vitro* comprende 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, anticuerpos y una sonda de ácido nucleico.
6. El procedimiento del párrafo 5, en el que dicho al menos un reactivo de captura es un aptámero.
7. El procedimiento del párrafo 1, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero y fluido pleural.
- 30 8. El procedimiento del párrafo 4, en el que el ensayo *in vitro* se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo histológico o citológico y un ensayo de nivel de expresión de ARNm.
- 35 9. El procedimiento del párrafo 8, en el que la muestra biológica es suero.
10. El procedimiento del párrafo 1, en el que la muestra biológica es tejido de mesotelio pleural o peritoneal y en el que los valores de biomarcador se obtienen un análisis histológico o citológico de dicho tejido de mesotelio.
- 40 11. El procedimiento del párrafo 1, en el que el individuo es un ser humano.
12. El procedimiento del párrafo 1, en el que N = 3-10.

13. El procedimiento del párrafo 1, en el que N = 3-15.
14. El procedimiento del párrafo 1, en el que N = 2-10.
- 5 15. El procedimiento del párrafo 1, en el que N = 4-10.
16. El procedimiento del párrafo 1, en el que N = 5-10.
- 10 17. El procedimiento del párrafo 1, en el que el individuo tiene un alto riesgo de mesotelioma debido a la exposición al amianto o a una fibra relacionada.
18. El procedimiento del párrafo 1, en el que los biomarcadores se seleccionan de la Tabla 18.
- 15 19. Un procedimiento implementado por ordenador para indicar una probabilidad de mesotelioma, comprendiendo el procedimiento:
- recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 1;
- 20 realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de dichos valores de biomarcadores; e indicar una probabilidad de que dicho individuo tenga mesotelioma basado en una pluralidad de clasificaciones, y en el que N = 2-66.
- 25 20. El procedimiento del párrafo 19, en el que indicar la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma comprende mostrar la probabilidad en una pantalla de ordenador.
21. Un producto de programa informático para indicar una probabilidad de mesotelioma, el producto de programa informático que comprende:
- 30 un medio legible por ordenador que incorpora un código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa:
- un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, en el que dichos biomarcadores se detectaron en la muestra biológica; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de mesotelioma del individuo en función del valor del biomarcador; y en el que N = 2-66.
- 35 22. El producto de programa informático del párrafo 21, en el que dicho procedimiento de clasificación usa una función de densidad de probabilidad.
- 40 23. El producto de programa informático del párrafo 22, en el que dicho procedimiento de clasificación usa dos o más clases.
24. Un procedimiento para seleccionar a un individuo asintomático de alto riesgo para mesotelioma, comprendiendo el procedimiento:
- 45 detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, en el que dicho individuo se clasifica como que tiene o no mesotelioma o se determina la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma, según dichos valores de biomarcadores y en el que N = 2-66.
- 50 25. El procedimiento del párrafo 24, en el que la detección de los valores de los biomarcadores comprende la realización de un ensayo *in vitro*.
26. El procedimiento del párrafo 25, en el que dicho ensayo *in vitro* comprende 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, anticuerpos y una sonda de ácido nucleico.
- 55 27. El procedimiento del párrafo 26, en el que dicho al menos un reactivo de captura es un aptámero.
- 60 28. El procedimiento del párrafo 27, en el que el ensayo *in vitro* se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo histológico o citológico y un ensayo de nivel de expresión de ARNm.
- 65 29. El procedimiento del párrafo 24, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma, suero y fluido pleural.

30. El procedimiento del párrafo 29, en el que la muestra biológica es suero.
31. El procedimiento del párrafo 24, en el que la muestra biológica es tejido de mesotelio y en el que los valores de biomarcador se obtiene de un análisis histológico o citológico de dicho tejido de mesotelio.
- 5 32. El procedimiento del párrafo 24, en el que el individuo es un ser humano.
33. El procedimiento del párrafo 24, en el que N = 3-10.
- 10 34. El procedimiento del párrafo 24, en el que N = 3-15.
35. El procedimiento del párrafo 24, en el que N = 2-10.
- 15 36. El procedimiento del párrafo 24, en el que N = 4-10.
37. El procedimiento del párrafo 24, en el que N = 5-10.
38. El procedimiento del párrafo 24, en el que el individuo tiene un alto riesgo de mesotelioma debido a la exposición al amianto u otras fibras relacionadas.
- 20 39. El procedimiento del párrafo 24, en el que los biomarcadores se seleccionan de la Tabla 18.
40. Un procedimiento implementado por ordenador para indicar una probabilidad de cáncer mesotelioma, comprendiendo el procedimiento:
- 25 recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 1;
- 30 realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de dichos valores de biomarcadores; e
- indicar una probabilidad de que dicho individuo tenga cáncer de mesotelioma basado en una pluralidad de clasificaciones, y en el que N = 2-66.
41. El procedimiento del párrafo 40, en el que indicar la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma comprende mostrar la probabilidad en una pantalla de ordenador.
- 35 42. Un producto de programa informático para indicar una probabilidad de mesotelioma, el producto de programa informático que comprende:
- un medio legible por ordenador que incorpora un código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa:
- 40 un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 1, en el que dichos biomarcadores se detectaron en la muestra biológica; e
- 45 el código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de mesotelioma del individuo en función de dichos valores de biomarcadores; y en el que N = 2-66.
43. El producto de programa informático del párrafo 42, en el que dicho procedimiento de clasificación usa una función de densidad de probabilidad.
- 50 44. El producto de programa informático del párrafo 43, en el que dicho procedimiento de clasificación usa dos o más clases.
45. Un procedimiento para diagnosticar que un individuo tiene o no cáncer, comprendiendo el procedimiento:
- 55 detectar, en una muestra biológica de un individuo, valores de biomarcadores que corresponden a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 19, en el que dicho individuo se clasifica como que tiene o no cáncer o se determina la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma, según dichos valores de biomarcador y en el que N = 2-22.
- 60 46. El procedimiento del párrafo 45 en el que dicho cáncer diagnosticado comprende uno o más de cáncer de pulmón, carcinoma de células renales o mesotelioma.
47. El procedimiento del párrafo 45, en el que la detección de los valores de los biomarcadores comprende realizar un ensayo *in vitro*.
- 65 48. El procedimiento del párrafo 47, en el que dicho ensayo *in vitro* comprende 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, anticuerpos y una sonda de ácido nucleico.

49. El procedimiento del párrafo 48, en el que dicho al menos un reactivo de captura es un aptámero.

5 50. El procedimiento del párrafo 47, en el que el ensayo in vitro se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros, un ensayo histológico o citológico y un ensayo de nivel de expresión de ARNm.

10 51. El procedimiento del párrafo 45, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma y suero.

52. El procedimiento del párrafo 51, en el que la muestra biológica es suero.

15 53. El procedimiento del párrafo 45, en el que el individuo es un ser humano.

54. El procedimiento del párrafo 45, en el que $N = 2-10$.

55. El procedimiento del párrafo 45, en el que $N = 2-15$.

20 56. El procedimiento del párrafo 45, en el que $N = 3-10$.

57. El procedimiento del párrafo 45, en el que $N = 3-15$.

25 58. El procedimiento del párrafo 45, en el que $N = 4-10$.

59. Un procedimiento implementado por ordenador para indicar una probabilidad de cáncer, comprendiendo el procedimiento:

30 recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en el que la información de biomarcadores comprende valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 19;
realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de dichos valores de biomarcadores; e
indicar una probabilidad de que dicho individuo tenga cáncer basado en una pluralidad de clasificaciones, y
35 en el que $N = 2-22$.

60. El procedimiento del párrafo 59, en el que indicar la probabilidad de que el individuo tenga cáncer comprende mostrar la probabilidad en una pantalla de ordenador.

40 61. Un producto de programa informático para indicar una probabilidad de cáncer, el producto de programa informático que comprende:
un medio legible por ordenador que incorpora un código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o sistema informático, comprendiendo el código de programa: un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en el que los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden cada uno a uno de al menos N biomarcadores seleccionados de la Tabla 19, en el que dichos
45 biomarcadores se detectaron en la muestra biológica; y un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de cáncer del individuo en función de dichos valores de biomarcadores; y en el que $N = 2-22$.

50 62. El producto de programa informático del párrafo 61, en el que dicho procedimiento de clasificación usa una función de densidad de probabilidad.

63. El producto de programa informático del párrafo 62, en el que dicho procedimiento de clasificación usa dos o más clases.

55 64. El procedimiento de acuerdo con los párrafos 1 o 25, en el que dicho individuo se clasifica como que tiene o no mesotelioma o se determina la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma, basándose en dichos valores de biomarcadores y al menos un elemento de información biomédica adicional correspondiente a dicho individuo.

60 65. El procedimiento de acuerdo con el párrafo 45, en el que dicho individuo se clasifica como que tiene o no cáncer o se determina la probabilidad de que el individuo tenga cáncer, basándose en dichos valores de biomarcadores y al menos un elemento de información biomédica adicional correspondiente a dicho individuo.

65 66. El procedimiento del párrafo 64 o 65, en el que dicho al menos un elemento de información biomédica adicional se selecciona independientemente del grupo que consiste en

- 5 (a) información correspondiente a la presencia o ausencia de un derrame pleural o masa u otra masa pleural,
(b) información correspondiente a los descriptores físicos de dicho individuo,
(c) información correspondiente a un cambio en el peso de dicho individuo,
(d) información correspondiente a la etnia de dicho individuo,
(e) información correspondiente al sexo de dicho individuo,
(f) información correspondiente al historial de tabaquismo de dicho individuo,
(g) información correspondiente al historial de exposición al amianto de dicho individuo,
(h) información correspondiente al historial ocupacional de dicho individuo,
10 (i) información correspondiente a los antecedentes familiares de mesotelioma u otro cáncer de dicho individuo,
(j) información correspondiente a la presencia o ausencia en dicho individuo de al menos un marcador genético que se correlaciona con un mayor riesgo de mesotelioma o cáncer de dicha persona o un miembro de la familia de dicho individuo,
(k) información correspondiente a los síntomas clínicos de dicho individuo,
15 (l) información correspondiente a otras pruebas de laboratorio,
(m) información correspondiente a los valores de expresión génica de dicho individuo, y
(n) información correspondiente a la exposición de dicho individuo a carcinógenos conocidos.
- 20 67. Un clasificador que comprende los biomarcadores de la Tabla 18.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar mesotelioma en un individuo, comprendiendo el procedimiento:
detectar proteínas biomarcadores en una muestra biológica del individuo para dar valores de biomarcadores que corresponden al biomarcador F9 (Factor de coagulación IX) y al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la Tabla 1, en el que el mesotelioma se diagnostica basándose en dichos valores de biomarcadores y en el que N es 1.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los al menos N biomarcadores adicionales se seleccionan de la Tabla 18.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el biomarcador adicional es CHD1, CRK o MDK.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que N es igual a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el diagnóstico comprende el diagnóstico diferencial de mesotelioma de afecciones benignas halladas en individuos expuestos al amianto.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el individuo tiene una anomalía pleural.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la detección de los valores de biomarcadores comprende realizar un ensayo *in vitro*.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que dicho ensayo *in vitro* comprende al menos un reactivo de captura correspondiente a cada uno de dichos biomarcadores, en el que el reactivo de captura se selecciona del grupo que consiste en aptámeros y anticuerpos.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra biológica se selecciona del grupo que consiste en suero, sangre completa, plasma y fluido pleural.
10. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el ensayo *in vitro* se selecciona del grupo que consiste en un inmunoensayo, un ensayo basado en aptámeros o un ensayo histológico o citológico.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la muestra biológica es tejido de mesotelio pleural o peritoneal y en el que los valores de biomarcadores se obtienen de un análisis histológico o citológico de dicho tejido de mesotelio.
12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que N = 3-10, 3-15, 2-10, 2-15, 4-10 o 5-10.
13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el individuo tiene un alto riesgo de mesotelioma debido a la exposición al amianto o a una fibra relacionada.
14. Un procedimiento implementado por ordenador para indicar una probabilidad de mesotelioma, comprendiendo el procedimiento:
recuperar en un ordenador información de biomarcadores para un individuo, en donde la información del biomarcador comprende valores de biomarcadores que corresponden al biomarcador F9 y al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la Tabla 1;
realizar con el ordenador una clasificación de cada uno de dichos valores de biomarcadores; e indicar una probabilidad de que dicho individuo tenga mesotelioma basándose en una pluralidad de clasificaciones, y en donde N = 1-65.
15. Un producto de programa informático para indicar una probabilidad de mesotelioma, comprendiendo el producto de programa informático:
un medio legible por ordenador que incorpora un código de programa ejecutable por un procesador de un dispositivo o un sistema informáticos, comprendiendo el código de programa:
un código que recupera datos atribuidos a una muestra biológica de un individuo, en donde los datos comprenden valores de biomarcadores que corresponden al biomarcador F9 y al menos N biomarcadores adicionales seleccionados de la Tabla 1, en donde dichos biomarcadores se detectaron en la muestra biológica; y
un código que ejecuta un procedimiento de clasificación que indica un estado de mesotelioma del individuo en función de dichos valores de biomarcadores; y

en donde $N = 1-65$.

- 5 16. El producto de programa informático de la reivindicación 15, en el que dicho procedimiento de clasificación usa una función de densidad de probabilidad o usa dos o más clases.
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho individuo se clasifica como que tiene o no mesotelioma o se determina la probabilidad de que el individuo tenga mesotelioma, basándose dichos valores de biomarcadores y al menos un elemento de información biomédica adicional correspondiente a dicho individuo.
- 10 18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicho al menos un elemento de información biomédica adicional se selecciona independientemente del grupo que consiste en:
- (a) información correspondiente a la presencia o ausencia de un derrame pleural o masa u otra masa pleural,
 - (b) información correspondiente a los descriptores físicos de dicho individuo,
 - 15 (c) información correspondiente a un cambio en el peso de dicho individuo,
 - (d) información correspondiente a la etnia de dicho individuo,
 - (e) información correspondiente al sexo de dicho individuo,
 - (f) información correspondiente al historial de tabaquismo de dicho individuo,
 - (g) información correspondiente al historial de exposición al amianto de dicho individuo,
 - 20 (h) información correspondiente al historial ocupacional de dicho individuo,
 - (i) información correspondiente a los antecedentes familiares de mesotelioma u otro cáncer de dicho individuo,
 - (j) información correspondiente a la presencia o ausencia en dicho individuo de al menos un marcador genético que se correlaciona con un mayor riesgo de mesotelioma o cáncer en dicho individuo o un miembro de la familia de dicho individuo,
 - 25 (k) información correspondiente a los síntomas clínicos de dicho individuo,
 - (l) información correspondiente a otras pruebas de laboratorio,
 - (m) información correspondiente a los valores de expresión génica de dicho individuo, y
 - (n) información correspondiente a la exposición de dicho individuo a carcinógenos conocidos.

30

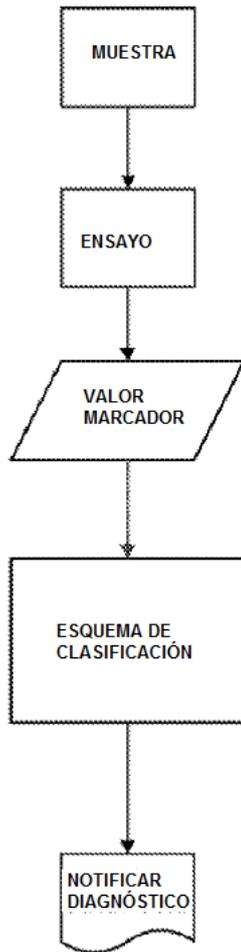


FIG. 1A

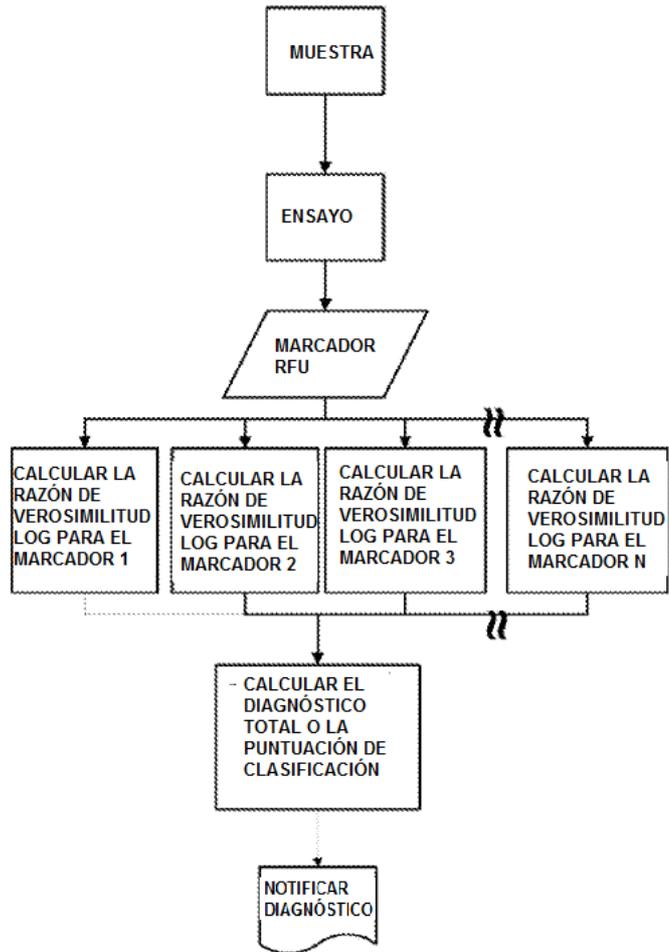


FIG. 1B

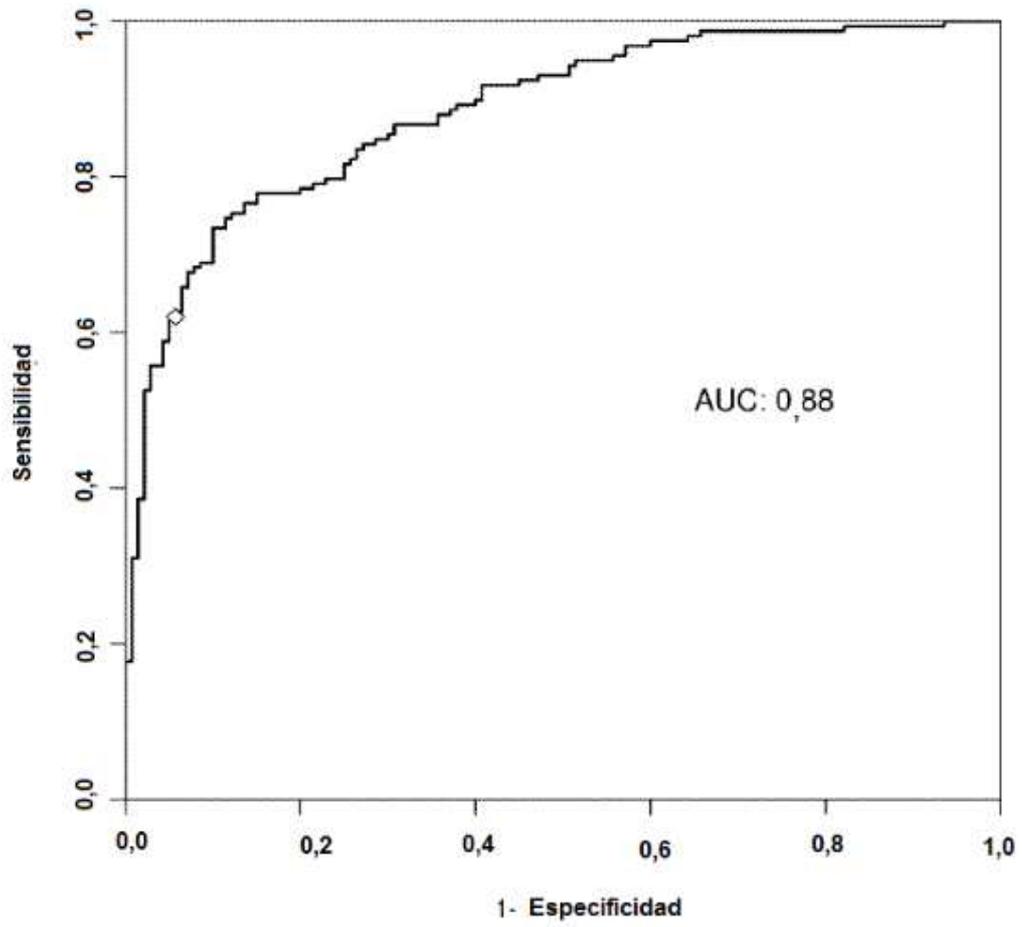


FIG. 2

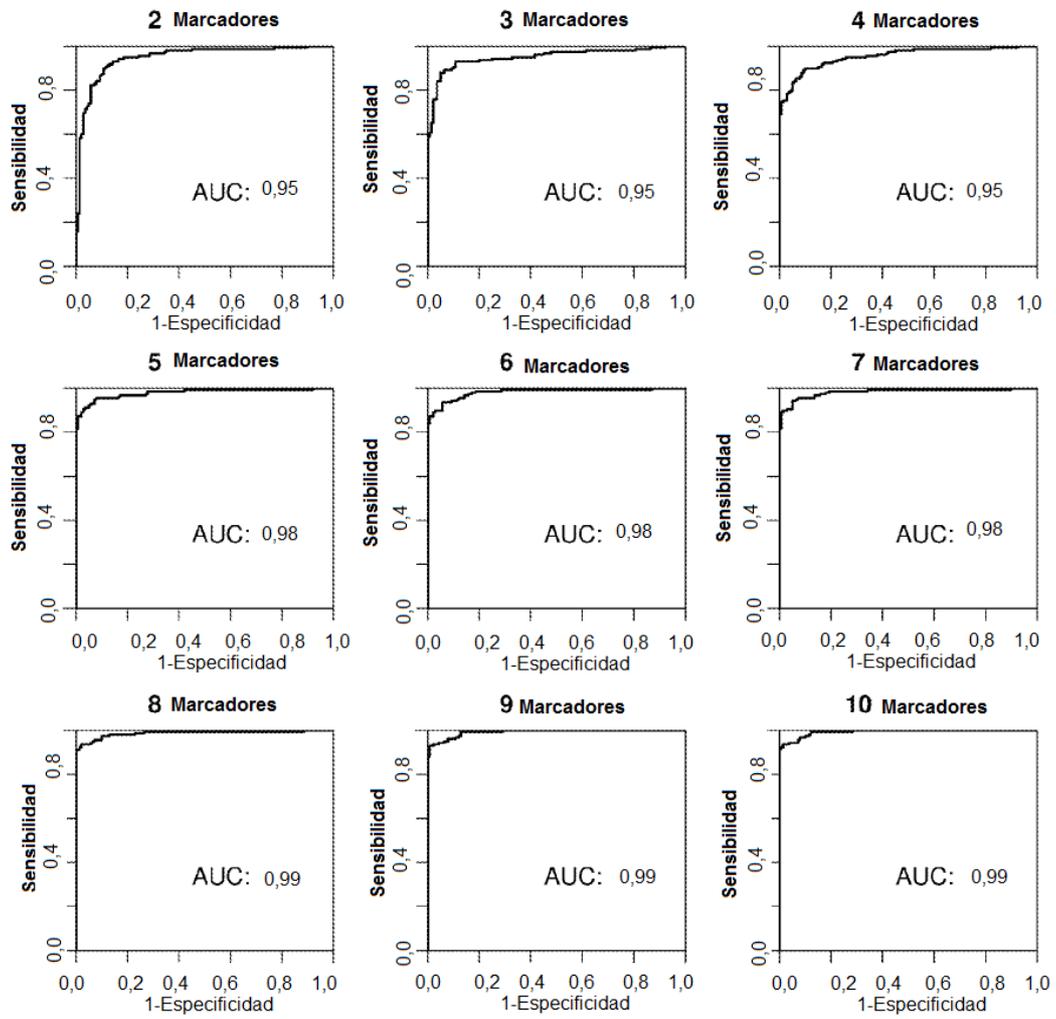


FIG. 3

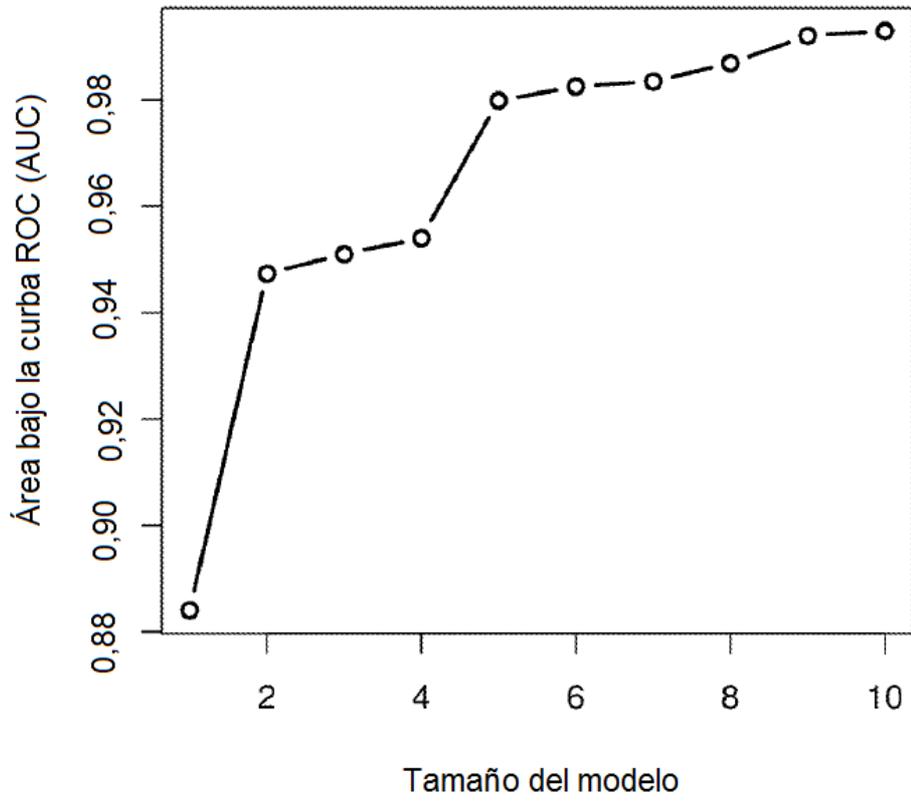


FIG. 4

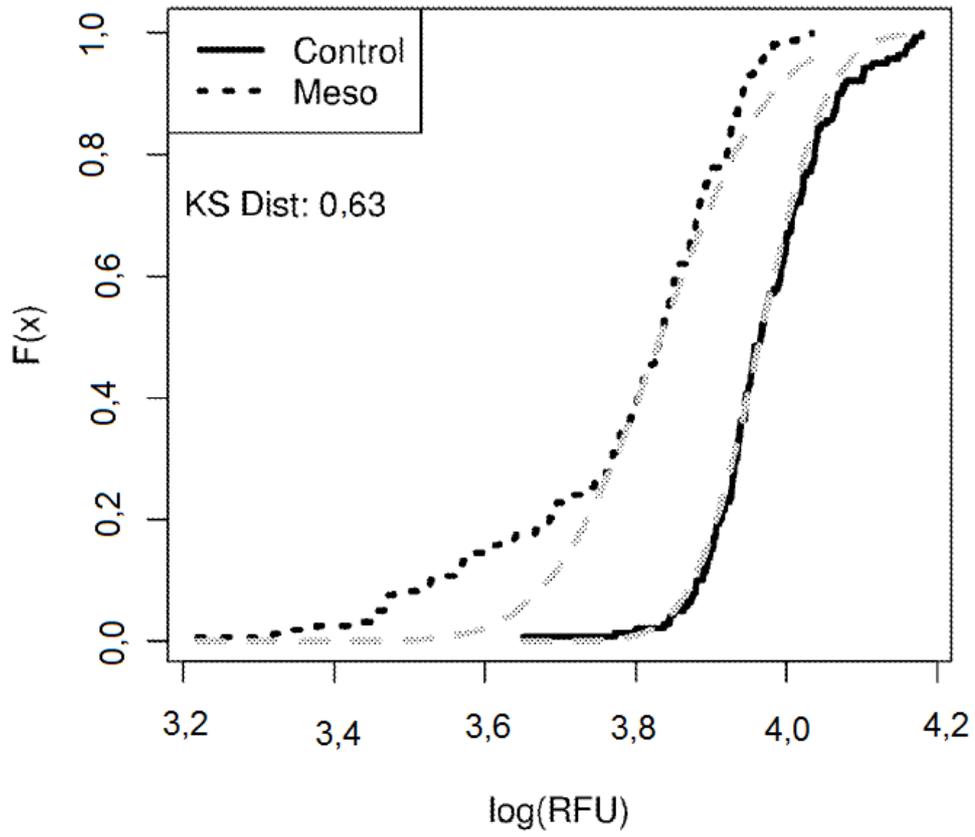


FIG. 5

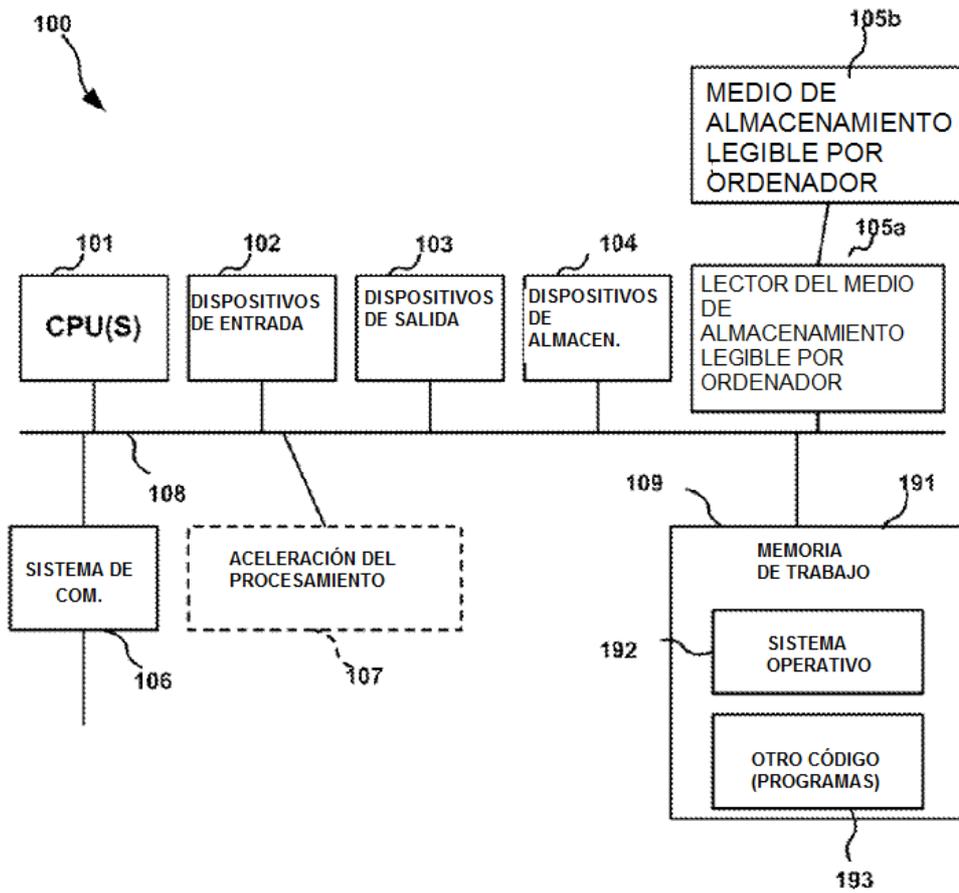


FIG. 6

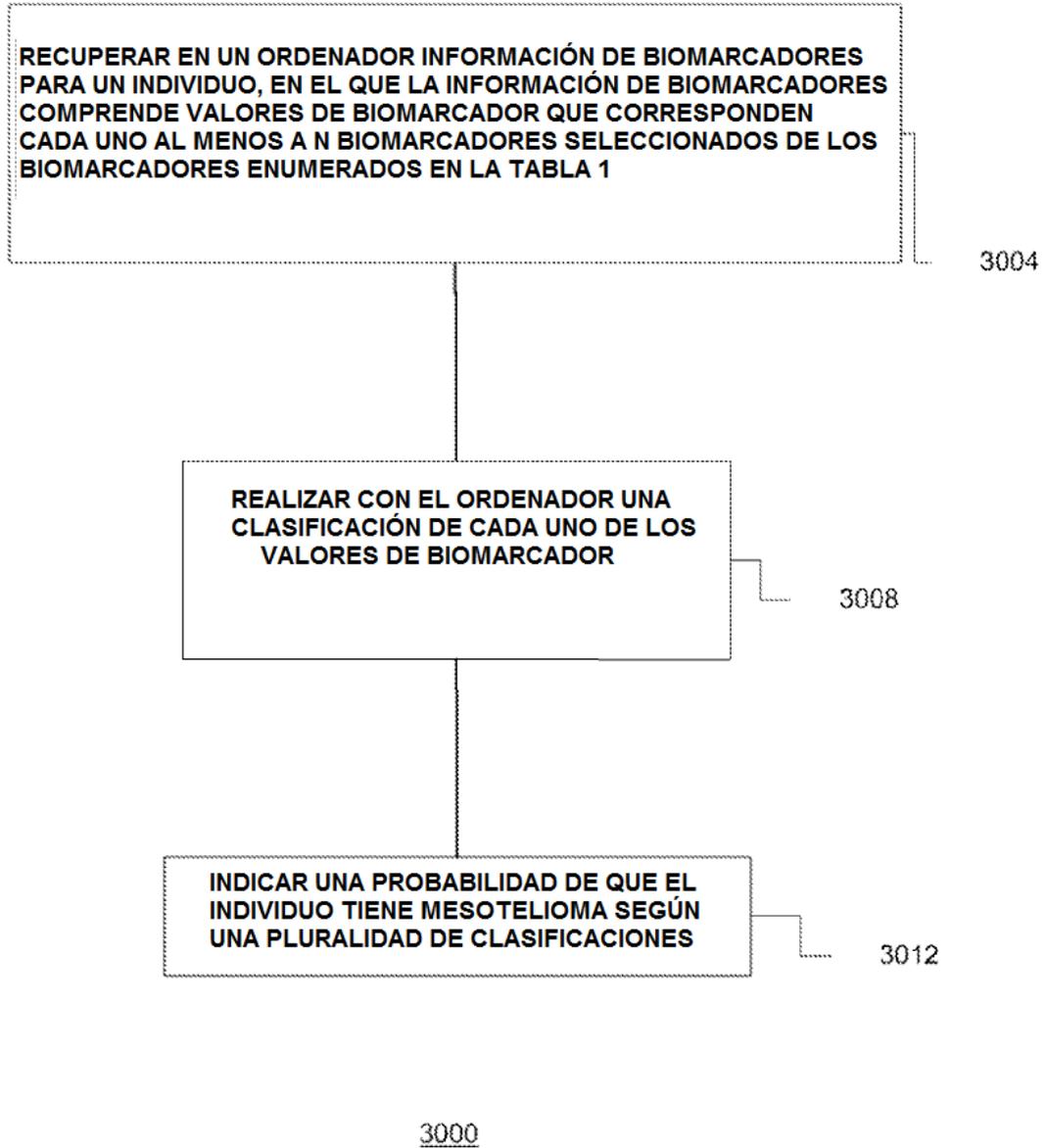


FIG. 7

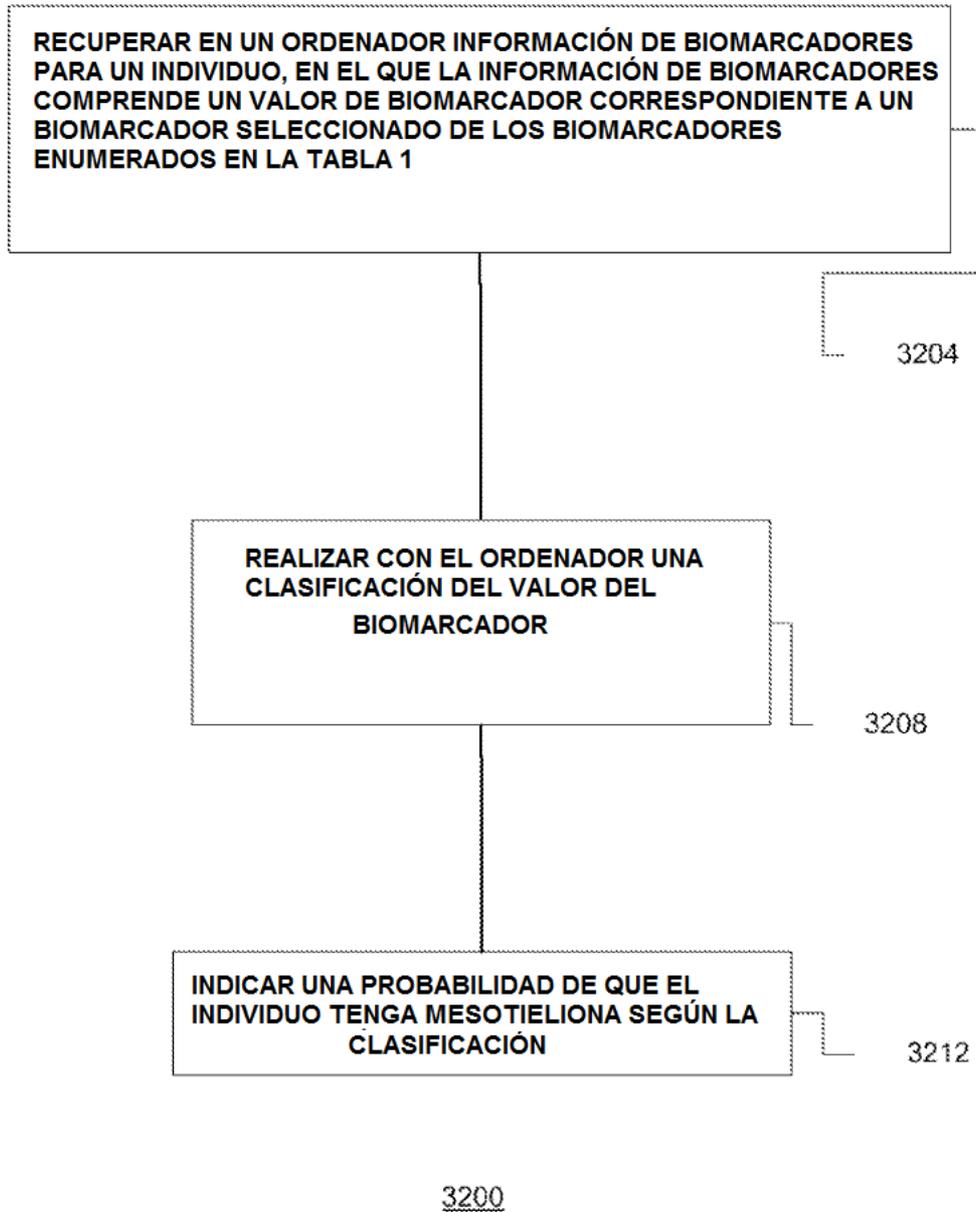


FIG. 8

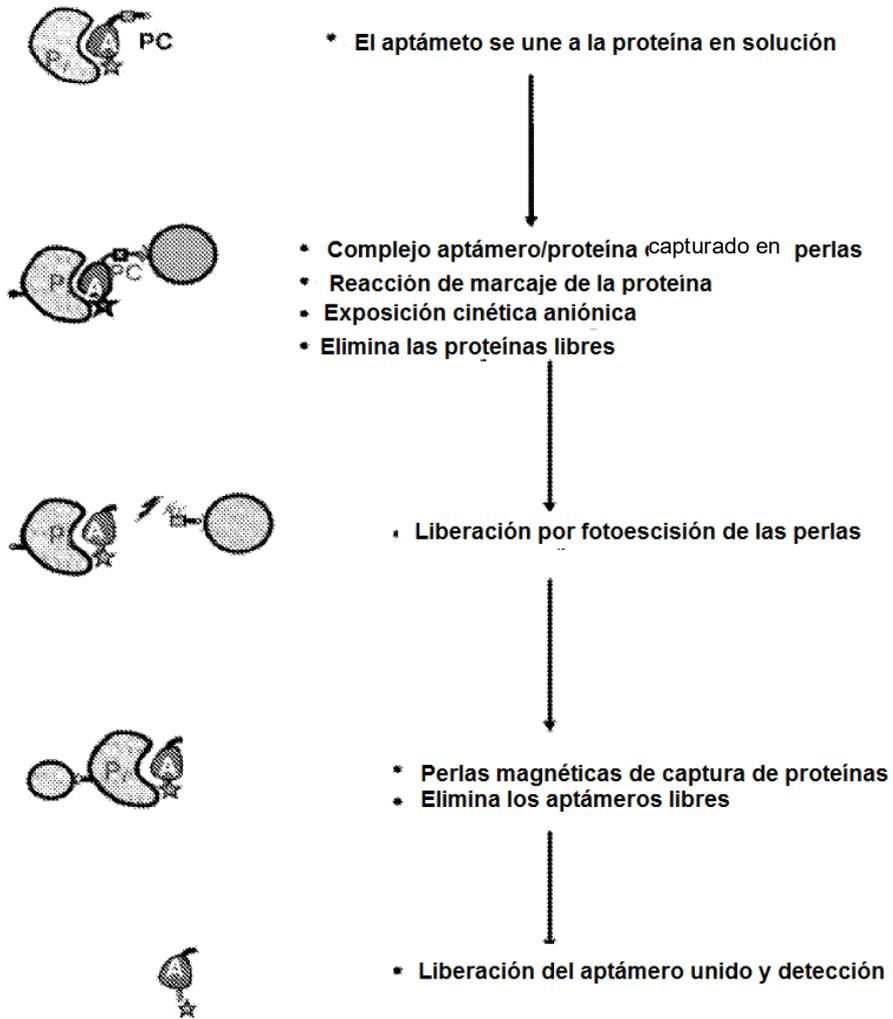


FIG. 9

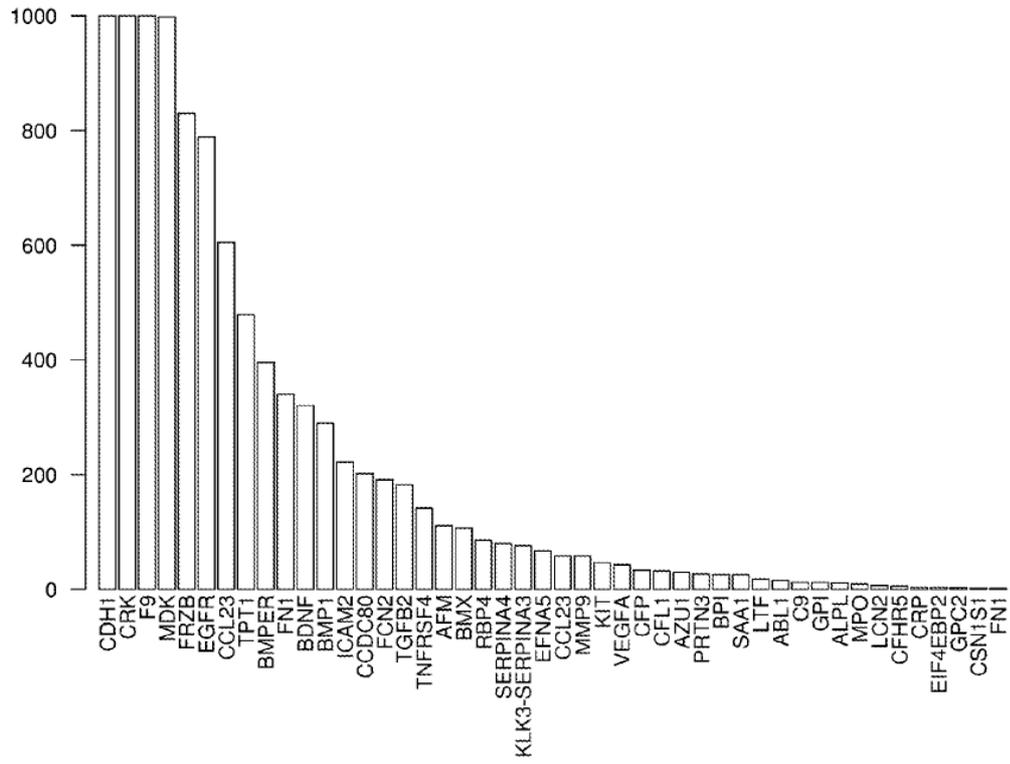


FIG. 10

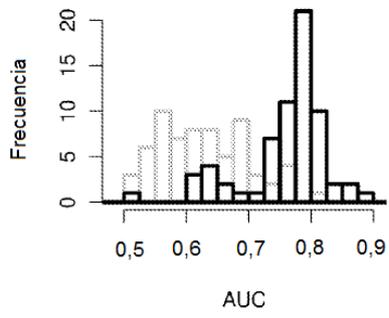


FIG. 11A

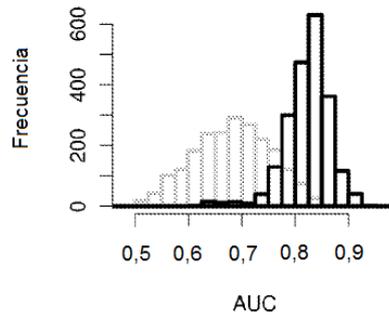


FIG. 11B

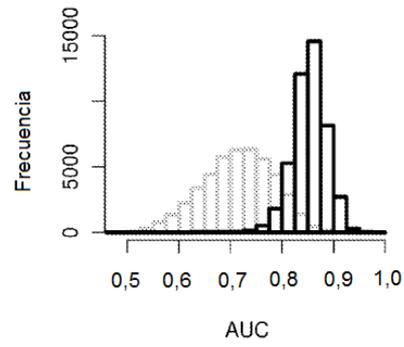


FIG. 11C

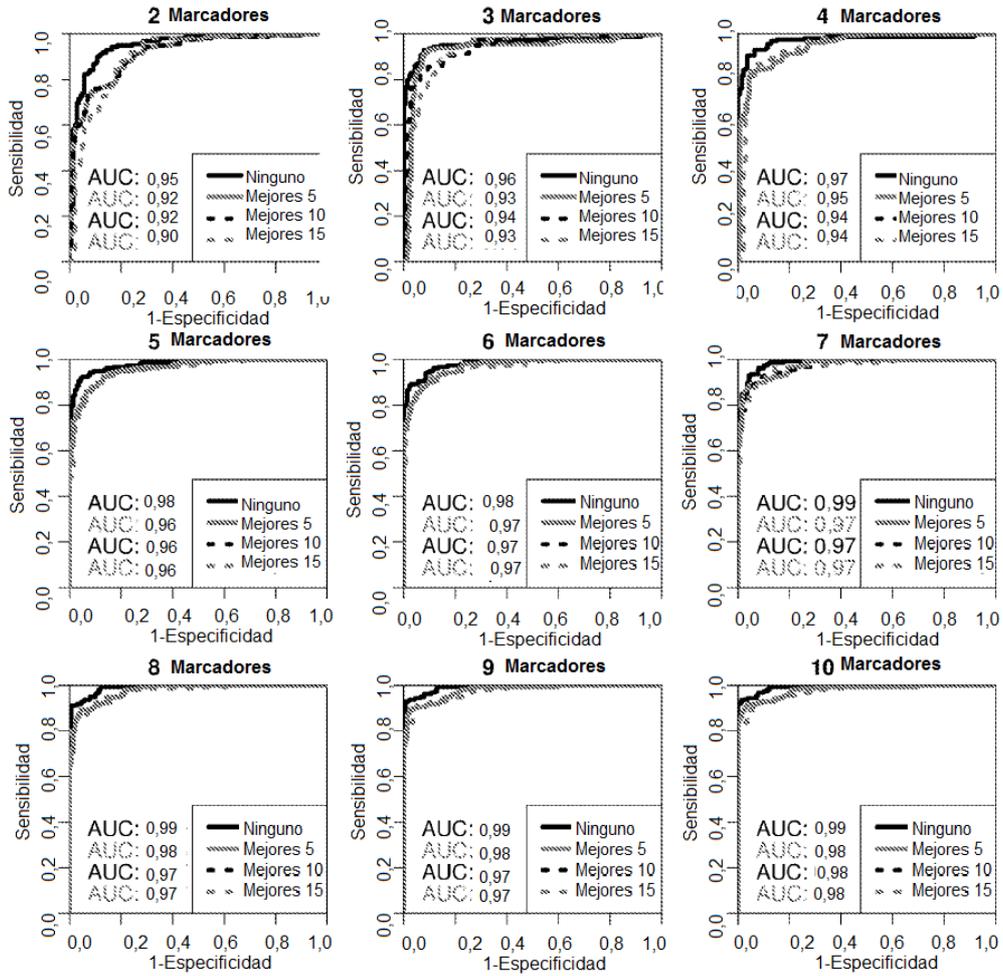


FIG. 12

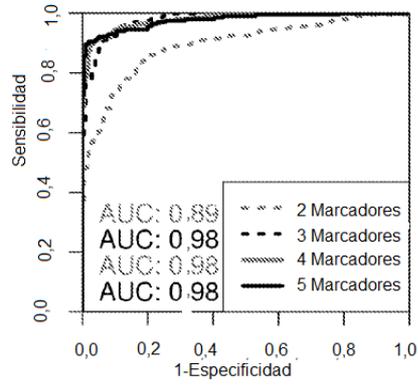


FIG. 13A

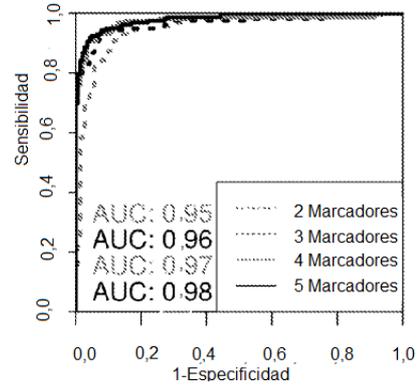


FIG. 13B

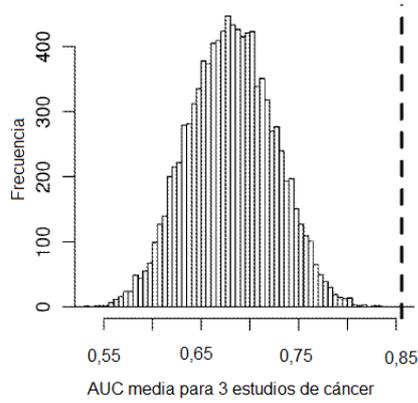


FIG. 14A

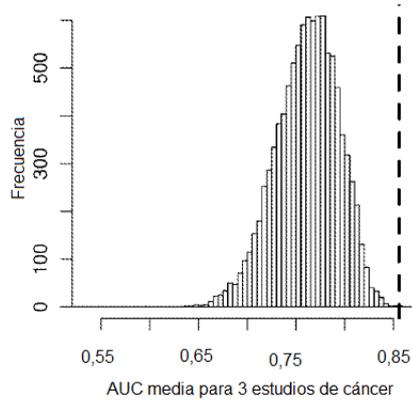


FIG. 14B

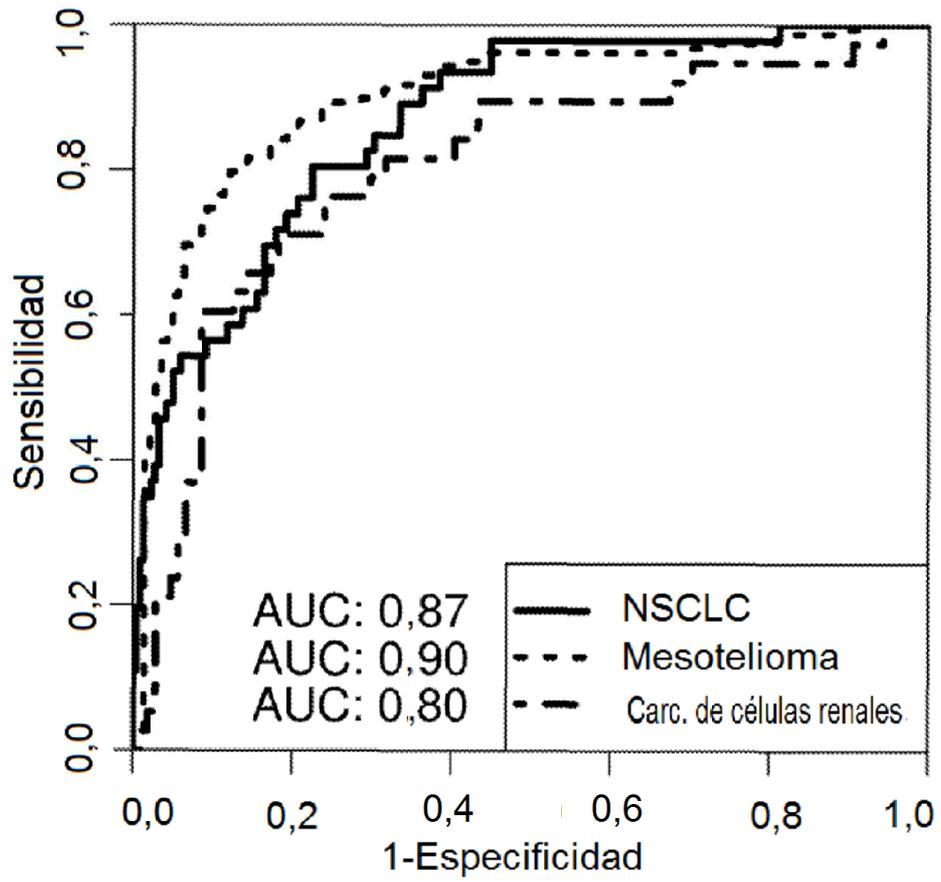


FIG. 15