

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 329**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2009 E 09718437 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2257810**

54 Título: **Diagnóstico molecular y clasificación de melanoma maligno**

30 Prioridad:

05.03.2008 US 34109 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.10.2013

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**KASHANI-SABET, MOHAMMED y
HAQQ, CHRISTOPHER**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 424 329 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

Diagnóstico molecular y clasificación de melanoma maligno.

5 Antecedentes de la invención

El melanoma es la quinta neoplasia más común en los Estados Unidos, cuya incidencia está creciendo más rápidamente que cualquier otra forma de cáncer. Actualmente aproximadamente uno de cada setenta americanos se espera que desarrolle melanoma durante su vida. El melanoma es un tumor maligno de melanocitos (células pigmentarias). Aunque la mayoría de los melanomas surgen en la piel, este cáncer también puede surgir en superficies mucosas o en otros sitios a los cuales migran las células de la cresta neural. Los melanomas que no se han propagado más allá de su sitio de origen son muy curables ya que estas formas tempranas son lesiones delgadas que no han invadido más allá de la dermis papilar. El tratamiento de dichos melanomas localizados en fase temprana es escisión quirúrgica con márgenes proporcionales a la microfase de la lesión primaria. Algunos melanomas que se han propagado a ganglios linfáticos regionales pueden ser curables con escisión amplia del tumor primario y eliminación de los ganglios linfáticos regionales implicados. En contraste, las formas más avanzadas de melanoma presentan un elevado riesgo de mortalidad por metástasis. Cuando sucede metástasis, las células cancerosas pueden propagarse mediante los ganglios linfáticos hasta sitios distantes tales como el hígado, los pulmones, o el cerebro. El pronóstico para pacientes en las fases más tardías de esta enfermedad es malo con una supervivencia promedio de seis a diez meses.

La capacidad de curar las formas tempranas de melanoma acoplado con su rápida conversión en una forma metastásica incurable pone de relieve la necesidad de métodos de diagnóstico más precisos tanto para la detección temprana de esta enfermedad como para mejores marcadores que sirvan como pronosticadores del progreso de la enfermedad para producir estrategias de tratamiento médico mejor informadas. Lo que compone el problema de idear estrategias terapéuticas apropiadas basadas en diagnóstico y pronóstico precisos es el hecho de que los médicos han descubierto que el melanoma frecuentemente muestra un comportamiento clínico impredecible. Por ejemplo, aunque el grosor vertical del tumor primario es uno de los factores de pronóstico más importante que determina la supervivencia, muchos pacientes con melanomas gruesos no tienen metástasis mientras que un pequeño subconjunto de pacientes con tumores delgados mueren de su enfermedad. Por lo tanto se requieren marcadores mejorados para mejorar los algoritmos de pronóstico para pacientes de melanoma recién diagnosticado. Aunque se han estudiado extensivamente, no se usan rutinariamente factores moleculares en el diagnóstico y la evaluación del pronóstico de pacientes con melanoma. Dichos biomarcadores proporcionarían nuevas vías para la detección de melanoma temprano y constituirían dianas para la evaluación del riesgo de melanoma, así como dianas para el desarrollo de nuevos fármacos. Los métodos y composiciones de esta invención proporcionan estas herramientas adicionales para el cuidado de pacientes con melanoma.

Breve resumen de la invención

Generalmente, los métodos de esta invención hallan uso particular en el diagnóstico de melanoma detectando los marcadores NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y fibronectina 1 (FN1), que se expresan de forma diferencial (regulados negativa o positivamente) en células de melanoma. Estos marcadores por tanto pueden usarse de forma diagnóstica para distinguir melanoma de nevos benignos. Los marcadores se usan en combinación. ARPC2, FN1, NCOA3, RGS1, SPP1, y WNT2 se usan en un ensayo de diagnóstico de seis marcadores para melanoma.

Se proporcionan kits de diagnóstico que comprenden reactivos para detectar los marcadores.

En una primera realización, esta invención proporciona un método *in vitro* para diagnosticar melanoma en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica de un sujeto con reactivos que se unan específicamente a un panel de marcadores seleccionados que comprenden: (i) los polipéptidos ARPC2, FN1, NCOA3, RGS1, SPP1, y WNT2, o (ii) los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos, donde hay al menos un reactivo que se une a cada marcador; y

(b) determinar si cada uno de los marcadores seleccionados se sobreexpresa o subexpresa o no en la muestra; proporcionando de este modo un diagnóstico para melanoma en el sujeto.

En un aspecto de esta realización, el reactivo puede ser un anticuerpo, que puede ser monoclonal. En otro aspecto de esta realización, el reactivo puede ser un ácido nucleico, incluyendo un oligonucleótido o serie de cebadores de RT PCR. En otros aspectos de esta realización, el melanoma es melanoma primario o melanoma metastásico y la muestra puede ser una biopsia de piel. En aspectos adicionales de esta realización, el diagnóstico distingue entre nevos benignos frente a melanoma maligno. En algunos formatos, la etapa de determinación puede realizarse usando un inmunoensayo enzimático, tal como un ensayo ELISA o inmunohistoquímico. En otros formatos, la etapa de determinación puede realizarse usando FISH o CGH.

En una segunda realización, la presente invención proporciona un kit para su uso en el diagnóstico de melanoma en un sujeto, comprendiendo el kit reactivos que se unen específicamente a un panel de marcadores seleccionados que comprenden: (i) los polipéptidos ARPC2, FN1, NCOA3, RGS1, SPP1, y WNT2, o (ii) los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos. El kit puede contener adicionalmente reactivos adicionales para realizar la detección usando un inmunoensayo enzimático, tal como un ensayo ELISA o inmunohistoquímico. En otros formatos, el kit puede contener adicionalmente reactivos adicionales para realizar la detección usando FISH o CGH.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Fotomicrografías de melanoma primario que demuestran inmunotinción ausente (panel A) e intenso (panel B) de NCOA3.

Figura 2: Análisis de Kaplan-Meier de supervivencia libre de recidiva (RFS) (panel A) y supervivencia específica de enfermedad (DSS) (panel B) de acuerdo con el nivel de expresión de NCOA3.

Figura 3: Panel superior. Inmunotinción de NCOA3 en un melanoma desmoplásico. Obsérvese tinción marrón de células ahusadas. Panel inferior. Inmunotinción de NCOA3 en la metástasis de ganglio linfático del mismo paciente. Obsérvese tinción difusa de células tumorales en el centro.

Figura 4: Actividad anti-metastásica de ribozimas (Rz) y ARNip dirigido contra NCOA3 murino. Se inyectaron células de melanoma B16-F10 por vía intravenosa en grupos de 10 ratones C57B1/6. En los días 3 y 10 después de la inyección, se inyectaron por vía intravenosa complejos de lípido catiónico:ADN que codifican secuencias de vector de control o dos ribozimas y ARNip dirigidos contra diferentes sitios del ARN murino de NCOA3. Los ratones se sacrificaron en el día 25 y se analizaron para la cantidad de tumores pulmonares metastásicos. Las cuatro construcciones mostraron reducciones significativas en la carga tumoral metastásica en comparación con el vector de control (4613) solo ($P < 0,05$).

Figura 5: Pesos de los pulmones de ratones que albergan tumores tratados con diversos anti-NCOA3 o construcciones de control. Los detalles experimentales son idénticos a los descritos en la Figura 4.

Figura 6: Actividad anti-metastásica de ribozima 397 (Rz) dirigida contra NCOA3 contra cáncer mamario murino. Se inyectaron células de carcinoma mamario 4T1 por vía intravenosa en grupos de 10 ratones BALB/c. En los días 3 y 10 después de la inyección, se inyectaron por vía intravenosa complejos de lípido catiónico:ADN que codifican secuencias de vector de control, Rz397, ARNip385, y controles mutantes que contienen una mutación de una única base en la ribozima (m-Rz397) o ARNip (m-ARNip385). Los ratones se sacrificaron el día 25 y se analizaron para la cantidad de tumores pulmonares metastásicos. Los ratones tratados con Rz397 tuvieron significativamente menos tumores pulmonares que ratones tratados con ARNip385, m-Rz397, o con el vector de control solo.

Figura 7: El direccionamiento a NCOA3 suprime la invasión de células tumorales in vitro. Se transfectaron células B16 con vector solamente, o vector que expresa Rzs397 o ARNip385 dirigido contra NCOA3 murino, y se determinó la invasión usando un ensayo con cámara de Boyden 24 horas después de la transfección.

Figura 8: Fotomicrografías de baja energía (40x, panel A) y alta energía (100x, panel B) de inmunotinción con Wnt-2 en un nevo melanocítico compuesto, que muestra tinción intensa en los nidos del nevo intraepidérmico, con tinción disminuida en los nidos subepidérmicos y dérmicos.

Figura 9: Fotomicrografías de baja energía (40x, panel A) y alta energía (100x, panel B) de inmunotinción con Wnt-2 en un melanoma primario (4,1 mm de grosor, nivel IV de Clark) que demuestra tinción intensa de grupos de melanoma intraepidérmicos que invaden en la dermis.

Figura 10: Actividad anti-metastásica de una ribozima dirigida contra Wnt-2 murina (Mo-Wnt2-Rz879). Se inyectaron células de melanoma B16-F10 por vía intravenosa en grupos de 10 ratones C57B1/6. En el día 7 después de la inyección, se inyectaron por vía intravenosa complejos de lípido catiónico:ADN que codifican secuencias de vector de control o una ribozima dirigida contra diferentes ARN murinos de Wnt-2. Los ratones se sacrificaron en el día 25 y se analizaron para la cantidad de tumores pulmonares metastásicos. La ribozima anti-Wnt-2 mostró reducciones significativas en la carga de tumor metastásico en comparación con el vector de control (4613) solo ($P = 0,0006$).

Figura 11: Fotomicrografías de baja energía (40x, panel A) y alta energía (100x, panel B) de inmunotinción con Wnt-2 de un melanoma primario que surge en un nevo, que muestra tinción intensa del melanoma (M) en los componentes tanto de unión como dérmicos, con tinción ausente en un nevo congénito dérmico subyacente (N).

Figura 12: Actividad anti-metastásica de ribozimas (Rz) y ARNip dirigidos contra PHIP murino. Se inyectaron células de melanoma B16-F10 por vía intravenosa en grupos de 10 ratones C57B1/6. En los días 3 y 10 de la inyección, se inyectaron por vía intravenosa complejos de lípido catiónico:ADN que codifican secuencias de vector de control o tres ribozimas y ARNip dirigidos contra diferentes sitios del ARN de PHIP murino. Los ratones se sacrificaron en el

día 25 y se analizaron para la cantidad tumores pulmonares metastásicos. Dos ribozimas (Rz122 y Rz314) y una construcción de ARNip (ARNip723) mostraron reducciones significativas en la carga de tumor metastásico en comparación con el vector de control (4613) solo ($P < 0,05$).

Figura 13: El direccionamiento a PHIP suprime la invasión de células tumorales in vitro. Se transfectaron células B16 con vector que expresa Rz314 o ARNip385 dirigido contra PHIP murino, y se determinó la invasión usando un ensayo de cámara de Boyden 24 horas después de la transfección. Hubo una supresión significativa en la invasión de B16 por Rz314 cuando se comparaba con una ribozima mutante inhabilitada (mRz314), y por ARNip723 cuando se comparaba con varios ARNip inactivos de control.

Figura 14: Determinación de la cantidad de copias del gen NCOA3 en melanoma por hibridación de fluorescencia in situ (FISH).

Figura 15. Diagrama ROC en el diagnóstico de melanoma para el ensayo multimarcador usando valores de intensidad de marcadores combinados para los cinco marcadores.

Figura 16. Algoritmo de diagnóstico utilizado para los conjuntos de capacitación y validación que combinan valores de intensidad de marcadores así como diferencias superior a inferior. Para cada diagnóstico declarado en el algoritmo se incluyen las cantidades de observaciones correctas e incorrectas en la conjunto de capacitación.

Figura 17A-E. Fotomicrografías representativas de inmunotinción para ARPC2 (panel A), FN1 (panel B), RGS1 (panel C), SPP1 (panel D), y WNT2 (panel E) en nevos benignos.

Figura 18A-E. Fotomicrografías representativas de inmunotinción para ARPC2 (panel A), FN1 (panel B), RGS1 (panel C), SPP1 (panel D), y WNT2 (panel E) en melanomas.

Figura 19. Diagramas ROC en el diagnóstico de melanoma utilizando un marcador solo (FN1), tres marcadores (FN1, ARPC2, SPP1), y los cinco marcadores.

Figura 20 A-E. Fotomicrografías representativas de inmunotinción para ARPC2 (panel A), FN1 (panel B), RGS1 (panel C), SPP1 (panel D), y WNT2 (panel E) en melanomas que surgen en asociación con un nevo, donde M representa el melanoma y N representa el nevo.

Figura 21A-E. Inmunotinción para neoplasias melanocíticas mal diagnosticadas, diagnosticadas correctamente por cada uno de los cinco marcadores. A) tinción de ARPC2 en una mujer de 44 años de edad con un grosor de 0,76 mm, nivel III de Clark, melanoma no ulcerado inicialmente diagnosticado como nevo benigno; B) tinción de FN1 en una mujer de 29 años de edad con un nevo displásico inicialmente diagnosticado como un melanoma de 0,25 mm, nivel II de Clark; C) tinción de RGS1 en una mujer de 31 años de edad con melanoma metastásico en fase IV con una lesión inicialmente diagnosticada como una proliferación melanocítica intraepidérmica atípica; D) tinción de SPP1 en un hombre de 46 años de edad con un melanoma desmoplásico no ulcerado de 0,8 mm, nivel IV de Clark inicialmente diagnosticado como nevo de Spitz; E) tinción de WNT2 en una mujer de 44 años de edad con melanoma no ulcerado de 0,76 mm, nivel III de Clark inicialmente diagnosticado como nevo benigno.

Figura 22. Algoritmo de diagnóstico usando diferencias en valores superior a inferior para un ensayo de diagnóstico de seis genes para melanoma.

Figura 23. Algoritmo de diagnóstico usando tanto valores de intensidad de tinción como diferencias superior a inferior para un ensayo de diagnóstico de seis genes para melanoma.

Descripción detallada de la invención

Introducción

A pesar de la investigación intensiva, no hay marcadores moleculares en uso rutinario para el diagnóstico y la evaluación del pronóstico de pacientes con melanoma. Un prerrequisito hacia el desarrollo de dichos marcadores es el conocimiento de genes que se expresen de forma diferencial en células de melanoma.

Se determinó que los genes Wnt-2, NCOA3, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y fibronectina 1 muestran expresión diferencial en melanoma.

Como se detalla a continuación, estos genes presentan patrones de expresión distintivos que son característicos de diferentes aspectos de progresión de melanoma, y por tanto, pueden usarse para diagnosticar y pronosticar diferentes fases de este cáncer. Por ejemplo, nuestros datos revelan que NCOA3 es un buen indicador de metástasis de melanoma a ganglios linfáticos regionales, recidiva de la enfermedad, y muerte, mientras que Wnt-2 puede ser un marcador de diagnóstico para nevo benigno frente a melanoma maligno. Además, nuestros datos indican que SPP1 se sobreexpresa en melanomas en comparación con nevos benignos. Nuestros datos también

revelan que NCOA3 puede usarse como indicador de un subconjunto de melanoma desmoplásico que metastatizará a ganglios linfáticos regionales. Estos resultados revelan que los marcadores desvelados en este documento pueden usarse solos o en combinación para proporcionar herramientas de diagnóstico y de pronóstico más definitivas para el médico.

5

Además, las proteínas codificadas por estos genes se expresan de forma diferencial en melanomas.

Por consiguiente, esta invención proporciona métodos para el diagnóstico de melanoma en base a la expresión diferencial de NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y fibronectina 1 en células de melanoma. Los marcadores se usan en combinación en forma de un panel de marcadores. Se utiliza un ensayo de seis marcadores basado en la expresión diferencial de ARPC2, FN1, NCOA3, RGS1, osteopontina (SPP1), y WNT2 para el diagnóstico de melanoma. La invención también proporciona kits para el diagnóstico de melanoma que comprende reactivos para detectar los marcadores.

10

15 Definiciones

El melanoma es una forma de cáncer que es benigna en melanocitos, las células que producen el pigmento. Aunque aparece frecuentemente en la piel, el melanoma también puede aparecer en el ojo y raramente en las membranas de las fosas nasales, mucosa oral, faríngea, mucosa vaginal y anal. El American Joint Committee on Cancer (AJCC) ha ideado un sistema para clasificar los melanomas en 4 fases (con muchas subfases) basado en criterios patológicos y tasas de supervivencia. El melanoma puede surgir a partir de lunares o nevos benignos en la piel y progresar a través de las fases definidas por el sistema de estadificación del AJCC. Véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper et al., 16ª ed., 2005, para antecedentes adicionales.

20

El término "marcador" se refiere a una molécula (típicamente proteína, ácido nucleico, carbohidrato, o lípido) que se expresa en la célula, se expresa en la superficie de una célula cancerosa o se secreta por una célula cancerosa en comparación con una célula normal, y que es útil para el diagnóstico de cáncer, para proporcionar un pronóstico. Dichos marcadores son moléculas que se expresan de forma diferencial, por ejemplo, se sobreexpresan o subexpresan en un melanoma u otra célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, sobre/subexpresión de factor 1, sobre/subexpresión de factor 2, sobre/subexpresión de factor 3 o mayor en comparación con una célula normal, un nevo, o un cáncer primario (frente a metástasis). Además, un marcador puede ser una molécula que se sintetiza inapropiadamente en la célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene delecciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal.

30

Los marcadores pueden usarse individualmente o en combinación con otros marcadores para cualquiera de los usos, por ejemplo, diagnóstico o pronóstico de melanoma, como se desvela en este documento.

35

Como se usa en este documento, un "marcador de evaluación de melanoma" se refiere a un marcador expresado de forma diferencial en células de melanoma y se refiere de forma equivalente a un polipéptido o ácido nucleico que codifica el polipéptido o cualquier parte del polipéptido.

40

"Muestra biológica" incluye secciones de tejidos tales como biopsia y muestras de autopsia, y secciones congeladas recogidas para propósitos histológicos. Dichas muestras incluyen muestras cutáneas, muestras de superficies mucosas, sangre y fracciones o productos sanguíneos (por ejemplo, suero, plasma, plaquetas, glóbulos rojos, y similares), esputo, tejido linfático y de la lengua, células cultivadas, por ejemplo, cultivos primarios, explantes, y células transformadas, deposiciones, orina, etc. Una muestra biológica se obtiene típicamente de un organismo eucariota, más preferiblemente un mamífero tal como un primate, por ejemplo, chimpancé o ser humano; vaca; perro; gato; un roedor, por ejemplo, cobaya, rata, ratón, conejo.

45

Una "biopsia" se refiere al proceso de retirar una muestra tisular para evaluación de diagnóstico o pronóstico, y a la propia muestra tisular. Puede aplicarse cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica a los métodos de diagnóstico de la presente invención. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido a evaluar (por ejemplo, piel, superficie mucosa, etc.), el tamaño y tipo del tumor (por ejemplo, sólido o suspendido, sangre o fluido ascítico), entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativas incluyen, aunque sin limitación, biopsia de escisión, biopsia de incisión, biopsia con aguja, biopsia quirúrgica. Una "biopsia de escisión" se refiere a la retirada de una masa tumoral completa con un pequeño margen de tejido normal rodeándola. Una "biopsia de incisión" se refiere a la retirada de una cuña de tejido que incluye un diámetro de sección transversal del tumor. Un diagnóstico o pronóstico hecho por endoscopia o fluoroscopia puede requerir una "biopsia por punción" de la masa tumoral, o una "biopsia por punción y aspiración con aguja fina" que generalmente contiene una suspensión de células de dentro de la masa tumoral. Las técnicas de biopsia se analizan, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, et al., eds., 16ª ed., 2005, Capítulo 70, y durante toda la Parte V.

55

60

Los términos "sobreexpresa", "sobreexpresión" o "sobreexpresado" se refieren de forma intercambiable a una proteína o ácido nucleico que se transcribe o traduce a un nivel enormemente detectable, habitualmente en una célula cancerosa, en comparación con una célula normal, un nevo, o un cáncer primario. El término incluye sobreexpresión debido a transcripción, procesamiento post-transcripcional, traducción, procesamiento post-

65

traduccional, localización celular (por ejemplo, orgánulo, citoplasma, núcleo, superficie celular), y estabilidad de ARN y proteína, en comparación con una célula normal. La sobreexpresión puede detectarse usando técnicas convencionales para detectar ARNm (es decir, RT-PCR, PCR, hibridación) o proteínas (es decir, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas). La sobreexpresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o mayor en comparación con una célula normal. En ciertos casos, la sobreexpresión es de factor 1, factor 2, factor 3, factor 4 o niveles más elevados de transcripción o traducción en comparación con una célula normal. La sobreexpresión también puede incluir cualquier expresión en una célula de muestra en comparación con ausencia de expresión en una célula normal.

Los términos “subexpresa”, “subexpresión” o “subexpresado” se refieren de forma intercambiable a una proteína o ácido nucleico que se transcribe o traduce a un nivel detectablemente inferior, habitualmente en una célula cancerosa, en comparación con una célula normal, un nevo, o un cáncer primario. El término incluye subexpresión debido a transcripción, procesamiento post-transcripcional, traducción, procesamiento post-traduccional, localización celular (por ejemplo, orgánulo, citoplasma, núcleo, superficie celular), y estabilidad de ARN y proteína, en comparación con una célula normal. La subexpresión puede detectarse usando técnicas convencionales para detectar ARNm (es decir, RT-PCR, PCR, hibridación) o proteínas (es decir, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas). La subexpresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% etc. en comparación con una célula normal. En ciertos casos, la subexpresión es de factor 1, factor 2, factor 3, factor 4 o niveles de expresión más inferiores de transcripción o traducción en comparación con una célula normal. La subexpresión también puede incluir la ausencia expresión en una célula de muestra en comparación con cualquier expresión en una célula normal.

“Tratamiento terapéutico” y “terapias contra el cáncer” se refieren a quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia, inmunoterapia, y terapia biológica (dirigida).

Por “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad o dosis suficiente” en este documento se entiende una dosis que produce efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrán averiguarla los especialistas en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos aminoácidos o nucleótidos que son iguales (es decir, aproximadamente un 60% de identidad, preferiblemente un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o identidad superior sobre una región especificada, cuando se compara y alinea para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación o región designada) medido usando un algoritmo de comparación de secuencia BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos a continuación, o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio web del NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similares). Dichas secuencias entonces se dice que son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere a, o puede aplicarse a, el complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que tienen delecciones y/o adiciones, así como aquellas que tienen sustituciones. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden dar cuenta de huecos y similares. Preferiblemente, existe identidad sobre una región que es de al menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferiblemente sobre una región que es de 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencia, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, se introducen las secuencias de ensayo y de referencia en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Preferiblemente, pueden usarse los parámetros por defecto del programa, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula los porcentajes de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo relativos a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, como se usa en este documento, incluye referencia a un segmento de una cualquiera de las varias posiciones contiguas seleccionadas entre el grupo que consiste en 20 a 600, habitualmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más habitualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de alinear óptimamente las dos secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), por aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en la Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (véase, por

ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. 1987-2005, Wiley Interscience)).

Un ejemplo preferido de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) y Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en este documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas descritos. El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencia de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que cumplen o satisfacen algún valor umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se refiere al umbral del valor de palabra vecina (Altschul et al., *supra*). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para hallar HSP más largos que los contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. Los valores acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valor de recompensa para un par de restos apareados; siempre > 0) y N (valor de penalización para restos desapareados; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de valores para calcular el valor acumulativo. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: el valor de alineación acumulativo desciende por debajo de la cantidad X a partir de su valor máximo conseguido; el valor acumulativo llega a 0 o por debajo de 0, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de valor negativo; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T, y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de valores BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas hebras.

“Ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma mono o bicatenaria, y los complementos de los mismos. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos nucleotídicos conocidos o restos o enlaces modificados de la estructura, que son sintéticos, de origen natural, y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares que el ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de un modo similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforoamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos peptidonucleicos (PNA).

“Molécula de ARN” o un “ARNip”, se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN bicatenario, teniendo dicho ARN bicatenario la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o gen diana cuando se expresa el ARNip en la misma célula que el gen o gen diana. “ARNip” por tanto se refiere al ARN bicatenario formado por las hebras complementarias. Las partes complementarias del ARNip que hibridan para formar la molécula bicatenaria típicamente tienen identidad sustancial o completa. En una realización, un ARNip se refiere a un ácido nucleico que tiene identidad sustancial o completa con un gen diana y forma un ARNip bicatenario. La secuencia del ARNip puede corresponder al gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo. Típicamente, el ARNip es de al menos aproximadamente 15-50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNip bicatenario es de 15-50 nucleótidos de longitud, y el ARNip bicatenario es de aproximadamente 15-50 pares de bases de longitud, preferiblemente de aproximadamente 20-30 nucleótidos básicos, preferiblemente de aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, ó 30 nucleótidos de longitud).

Un polinucleótido “antisentido” es un polinucleótido que es sustancialmente complementario a un polinucleótido diana y tiene la capacidad de hibridar específicamente con el polinucleótido diana.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica de ARN. La composición de moléculas ribozima preferiblemente incluye una o más secuencias complementarias a un ARNm diana, y la secuencia catalítica bien conocida responsable de la escisión del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.093.246). También pueden usarse moléculas ribozima diseñadas para escindir catalíticamente transcritos de ARNm diana para evitar someter a traducción los ARNm diana.

Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de forma explícita. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden conseguirse generando secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más (o todos) de los codones seleccionados se sustituye con bases mixtas y/o restos de desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)). La expresión ácido nucleico se usa de forma intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

Una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita “variantes de corte y ajuste” y secuencias de ácido nucleico que codifican formas truncadas de antígenos cancerosos. Así mismo, una proteína particular codificada por un ácido nucleico abarca de forma implícita cualquier proteína codificada por una variante de corte y ajuste o forma truncada de ese ácido nucleico. “Variantes de corte y ajuste”, como el nombre sugiere, son productos de corte y ajuste alternativo de un gen. Después de la transcripción, un transcrito de ácido nucleico inicial puede sufrir corte y ajuste de modo que diferentes (alternativos) productos de corte y ajuste de ácido nucleico codifiquen diferentes polipéptidos. Los mecanismos para la producción de variantes de corte y ajuste varían, pero incluyen corte y ajuste alternativo de exones. Los polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico por transcripción de lectura directa también se abarcan por esta definición. Cualquier producto de una reacción de corte y ajuste, incluyendo formas recombinantes de los productos de corte y ajuste, se incluyen en esta definición. Los ácidos nucleicos pueden truncarse en el extremo 5' o en el extremo 3'. Los polipéptidos pueden truncarse en el extremo N-terminal o el extremo C-terminal. Las versiones truncadas de ácido nucleico o secuencias polipeptídicas pueden ser de origen natural o crearse de forma recombinante.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable en este documento para hacer referencia a un polímero de restos aminoacídicos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos aminoacídicos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos aminoacídicos y miméticos aminoacídicos que funcionan de un modo similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que están modificados posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y/o fosfoserina. Análogos aminoacídicos se refiere a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, es decir, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Miméticos aminoacídicos se refiere a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de un modo similar a un aminoácido de origen natural.

Los aminoácidos pueden mencionarse en este documento por sus símbolos de tres letras habitualmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Los nucleótidos, así mismo, pueden mencionarse por sus códigos de una letra habitualmente aceptados.

“Variantes modificadas de forma conservativa” se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, variantes modificadas de forma conservativa se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. A causa de la degeneración del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en que se especifica una alanina por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son “variaciones silenciosas”, que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. En este documento cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe todas las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico. Un especialista en la técnica reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias sonda reales.

En cuanto a secuencias de aminoácidos, un especialista en la técnica reconocerá que sustituciones, deleciones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia proteica que altere, añada o elimine un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de forma conservativa” en la que la alteración provoca la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Son bien conocidas en la técnica tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Dichas variantes modificadas de forma conservativa son en adición a y no excluyen variantes polimórficas, homólogos inter-especie, y alelos.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservativas por otro: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T); y 8) Cisteína (C), Metionina (M). Véase, por ejemplo, Creighton, *Proteins* (1984).

Un “marcador” o un “resto detectable” es una composición detectable por medio espectroscópico, fotoquímico, bioquímico, inmunológico, químico, u otro medio físico. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos electroquímicos, enzimas (por ejemplo, como las usadas habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que pueden hacerse detectables, por ejemplo, por incorporación de un radiomarcador en el péptido o usarse para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

El término “recombinante” cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se ha obtenido de una célula modificada de ese modo. Por tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se hallan dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que se expresan anormalmente de otro modo, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

La expresión “condiciones de hibridación rigurosa” se refiere a condiciones en las cuales una sonda hibridará con su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Una guía extensiva en cuanto a la hibridación de ácidos nucleicos se halla en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C inferiores que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica definida, pH, y concentración de ácido nucleico) a la cual el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias dianas están presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la de fondo, preferiblemente 10 veces la de hibridación de fondo. Condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50%, 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 42°C, o 5x SSC, SDS al 1%, incubación a 65°C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65°C.

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas aún son sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea usando la degeneración máxima de codones permitida por el código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridan en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. “Condiciones de hibridación moderadamente rigurosas” ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es al menos dos veces la de fondo. Los especialistas en la técnica reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similar. Se proporcionan directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, por ejemplo, y *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, *et al.*, *supra*.

Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32°C y 48°C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación por PCR de elevada rigurosidad, una temperatura de aproximadamente 62°C es típica, aunque las temperaturas de hibridación de elevada rigurosidad pueden variar de aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Las condiciones de ciclo típicas para amplificaciones tanto de elevada como de baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90°C - 95°C durante 30 segundos - 2 minutos, una fase de hibridación que dura 30 segundos - 2 minutos, y una fase de extensión de aproximadamente 72°C durante 1 - 2 minutos. Se proporcionan protocolos y directrices para reacciones de amplificación tanto de baja como de elevada rigurosidad, por ejemplo, en Innis *et al.* (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.).

“Anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región flanqueante de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de la misma que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu, así como la miríada de genes de región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican en kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de unión a antígeno de un anticuerpo será más crítica en la especificidad y afinidad de unión. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, derivados de suero, un hibridoma o clonados de forma recombinante, y también pueden ser quiméricos, primatizados, o humanizados.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N-terminal de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsable del reconocimiento de antígeno. Las expresiones cadena ligera variable (V_L) y cadena pesada variable (V_H) se refieren a

estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o en forma de varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase *Fundamental Immunology* (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un especialista en la técnica apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* de forma química o usando metodología de ADN recombinante. Por tanto, el término anticuerpo, como se usa en este documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos, o los sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv de cadena sencilla) o aquellos identificados usando bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)).

En una realización, el anticuerpo se conjuga a un resto "efector". El resto efector puede ser cualquiera de varias moléculas, incluyendo restos de marcaje tales como marcadores radioactivos o marcadores fluorescentes.

Las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos de marcadores representativos para su uso en la presente invención están disponibles para su recuperación online de cualquier fuente adecuada, como entenderán los especialistas en la técnica con referencia a esta divulgación. Por ejemplo, las siguientes secuencias de aminoácidos y nucleótidos están disponibles en el sitio web del NCBI usando el motor de búsqueda Entrez.

NCOA3 se refiere a un miembro de la familia de proteínas co-activadoras del receptor de esteroides en seres humanos. Los números de acceso para ácidos nucleicos representativos que codifican NCOA3 incluyen: NM_008679, BC092516, y BC088343, entre otros. Los números de acceso para proteínas NCOA3 representativas incluyen: CAI42141, CAC17693, CAB40662, AAH88343, y NP_032705, entre otros.

Wnt-2 se refiere a un miembro de una familia de proteínas extracelulares que pueden unirse a receptores de superficie celular para activar una vía de señalización en células. Los números de acceso para ácidos nucleicos representativos que codifican Wnt-2 incluyen: NM_003391 y NM_023653, entre otros. Los números de acceso para proteínas Wnt-2 representativas incluyen: NP_004176, NP_078613, y AAF30299, entre otros.

La osteopontina, o SPP1 (fosfoproteína 1 secretada), se refiere a una familia de glucoproteínas fosforiladas que son abundantes en la matriz mineral ósea y acelera la regeneración y remodelación ósea. También se produce en otros tejidos y desempeña una tarea en la regulación y progresión de muchas enfermedades, como potenciando las capacidades invasivas y proteolíticas de células tumorales. Los números de acceso para secuencias de proteínas representativas para osteopontina incluyen: AAA62729, AAA59974, CAA 40091, AAC28619, y NM_000582, entre otros.

Los números de acceso para secuencias representativas para ARPC2, RGS1 o fibronectina 1 son los siguientes: ARPC2: NM_152862 y NM_005731; RGS1: NM_002922; FN1 (fibronectina 1): NM_212475, NM_054034, NM_212476, NM_002026, NM_212474, NM_212478, y NM_212482.

Los ácidos nucleicos que codifican NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, o sus polipéptidos codificados se refieren a todas las formas de ácidos nucleicos (por ejemplo, gen, pre-ARNm, ARNm) o proteínas, sus variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos inter-especie que (según sea aplicable a ácido nucleico o proteína): (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente el 60% de identidad de secuencia de aminoácidos, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferiblemente 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% o mayor identidad de secuencia de aminoácidos, preferiblemente sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácidos, con un polipéptido codificado por un ácido nucleico de referencia o una secuencia de aminoácidos descrita en este documento; (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, creados contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos de referencia, fragmentos inmunogénicos de la misma, y variantes modificadas de forma conservativa de la misma; (3) hibridan específicamente en condiciones de hibridación rigurosa con un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos de referencia, y variantes modificadas de forma conservativa de la misma; (4) tienen una secuencia de ácido nucleico que tiene más de aproximadamente el 95%, preferiblemente más de aproximadamente el 96%, 97%, 98%, 99%, o mayor identidad de secuencia de nucleótidos, preferiblemente sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más nucleótidos, con una secuencia de ácido nucleico de referencia. Una secuencia polinucleotídica o polipeptídica es típicamente de un mamífero incluyendo, aunque sin limitación, primate, por ejemplo, ser humano; roedor, por ejemplo, rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja, o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y proteínas incluyen moléculas tanto de origen natural como recombinantes. Se incluyen formas truncadas y con corte y ajuste alternativo de estos antígenos en la definición.

La expresión “se une específicamente (o selectivamente)” cuando se refiere a una proteína, ácido nucleico, anticuerpo, o compuesto de molécula pequeña se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína o ácido nucleico, particularmente NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1 a menudo en una población heterogénea de proteínas o ácidos nucleicos u otros agentes biológicos.

En el caso de anticuerpos, en condiciones de inmunoensayo designadas, un anticuerpo especificado puede unirse a una proteína particular al menos dos veces la unión de fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces la de fondo. La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, pueden seleccionarse anticuerpos policlonales para obtener solamente aquellos anticuerpos policlonales que sean específicamente inmunorreactivos con el antígeno seleccionado y no con otras proteínas. Esta selección puede conseguirse sustrayendo los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con otras moléculas. Puede usarse una diversidad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, se usan de forma rutinaria inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988) para una descripción de formatos de inmunoensayo y condiciones que pueden usarse para determinar inmunorreactividad específica).

La expresión “efectos funcionales” en el contexto de ensayos para ensayar compuestos que modulan una proteína marcadora incluye la determinación de un parámetro que está indirecta o directamente bajo la influencia de una proteína marcadora tal como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, por ejemplo, un efecto químico o fenotípico tal como actividad transcripcional alterada de NCOA3 o actividad alterada de la vía de señalización de Wnt-2 y los efectos corriente debajo de dichas proteínas sobre el metabolismo y crecimiento celular. Un efecto funcional, por lo tanto, incluye actividad de unión al ligando, activación y represión transcripcional, la capacidad de las células de proliferar, la expresión en células durante la progresión de melanoma, y otras características de las células de melanoma. “Efectos funcionales” incluyen actividades *in vitro*, *in vivo*, y *ex vivo*.

Por “determinación del efecto funcional” se entiende ensayar un compuesto que aumente o disminuya un parámetro que está indirecta o directamente bajo la influencia de un marcador tal como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, por ejemplo, midiendo los efectos físicos y químicos o fenotípicos. Dichos efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido para los especialistas en la técnica, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice refractivo); propiedades hidrodinámicas (por ejemplo, forma), cromatográficas; o de solubilidad para la proteína; ensayos de unión a ligando, por ejemplo, unión a anticuerpos; midiendo marcadores inducibles o activación transcripcional del marcador; midiendo cambios en la actividad enzimática; la capacidad de aumentar o disminuir la proliferación celular, apoptosis, detención del ciclo celular, midiendo cambios en los marcadores de superficie celular. La determinación del efecto funcional de un compuesto sobre la progresión de células de melanoma también puede realizarse usando ensayos conocidos para los especialistas en la técnica tales como metástasis de células de melanoma por inyección en la vena de la cola de células de melanoma en ratones. Los efectos funcionales pueden evaluarse por muchos medios conocidos para los especialistas en la técnica, por ejemplo, microscopía para mediciones cuantitativas o cualitativas de alteraciones en características morfológicas, medición de cambios en los niveles de ARN o proteínas para otros genes expresados en células de melanoma, medición de la estabilidad del ARN, identificación de expresión génica corriente abajo o indicadora (CAT, luciferasa, β -gal, GFP y similares), por ejemplo, mediante quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, unión a anticuerpo, marcadores inducibles, etc.

“Inhibidores”, “activadores”, y “moduladores” de los marcadores se usan para hacer referencia a moléculas activadores, inhibidoras o moduladoras identificadas usando ensayos *in vitro* o *in vivo* de marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen, bloquean parcial o totalmente la actividad, disminuyen, evitan, retardan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan negativamente la actividad o expresión de marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, por ejemplo, antagonistas. “Activadores” son compuestos que aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibilizan, agonizan, o regulan positivamente la actividad de marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), WIF1, ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, por ejemplo, agonistas. Inhibidores, activadores o moduladores también incluyen versiones modificadas genéticamente de marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, por ejemplo, versiones con actividad alterada, así como ligandos de origen natural y sintético, antagonistas, agonistas, anticuerpos, péptidos, péptidos cíclicos, ácidos nucleicos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas ARNi, moléculas orgánicas pequeñas y similares. Dichos ensayos para inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, expresión de marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, *in vitro*, en células, o extractos celulares, expresión de compuestos moduladores putativos, y después determinación de los efectos funcionales sobre la actividad, como se ha descrito anteriormente.

Las muestras o ensayos que comprenden marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1, que se tratan con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador para examinar el grado de inhibición. A las muestras de control (no tratadas con inhibidores) se les asigna un valor de actividad proteica relativa del 100%. La inhibición de marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o

fibronectina 1 se consigue cuando el valor de actividad relativo al control es de aproximadamente el 80%, preferiblemente del 50%, más preferiblemente del 25-0%. La activación de marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), WIF1, ARPC2, RGS1 o fibronectina 1 se consigue cuando el valor de actividad relativo al control (no tratado con activadores) es del 110%, más preferiblemente del 150%, más preferiblemente del 200-500% (es decir, dos a cinco veces mayor relativo al control), más preferiblemente del 100-3000% superior.

La expresión "compuesto de ensayo" o "fármaco candidato" o "modulador" o equivalentes gramaticales como se usan en este documento describe cualquier molécula, de origen natural o sintética, por ejemplo, proteína, oligopéptido (por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 10 a 20 o 12 a 18 aminoácidos de longitud, preferiblemente 12, 15 o 18 aminoácidos de longitud), molécula orgánica pequeña, polisacárido, péptido, péptido circular, lípido, ácido graso, ARNip, polinucleótido, oligonucleótido, etc., a ensayar para la capacidad de modular directa o indirectamente marcadores de melanoma tales como NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 o fibronectina 1. El compuesto de ensayo puede estar en forma de una biblioteca de compuestos de ensayo, tal como una biblioteca combinatoria o aleatorizada que proporciona un intervalo suficiente de diversidad. Los compuestos de ensayo se ligan opcionalmente a un compañero de fusión, por ejemplo, compuestos de direccionamiento, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizadores, compuestos dirigibles, y otros restos funcionales. Convencionalmente, se generan nuevas entidades químicas con propiedades útiles identificando un compuesto de ensayo (llamado un "compuesto principal") con alguna propiedad o actividad deseable, por ejemplo, actividad inhibidora, creando variantes del compuesto principal, y evaluando la propiedad y actividad de esos compuestos variantes. A menudo, se emplean métodos de exploración de alto rendimiento (HTS) para dicho análisis.

Una "molécula orgánica pequeña" se refiere a una molécula orgánica, de origen natural o sintética, que tiene un peso molecular de más de aproximadamente 50 Dalton y menos de aproximadamente 2500 Dalton, preferiblemente menos de aproximadamente 2000 Dalton, preferiblemente entre aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 Dalton, más preferiblemente entre aproximadamente 200 a aproximadamente 500 Dalton.

Métodos de diagnóstico y pronóstico

La presente invención proporciona métodos para diagnosticar melanoma detectando la expresión de marcadores expresados de forma diferencial en células de melanoma en diferentes fases de la neoplasia. El diagnóstico implica determinar el nivel de expresión de NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y fibronectina 1 en forma de polipéptido o ácido nucleico en un paciente o muestra de paciente y después comparar el nivel de expresión con una medida inicial o intervalo. Típicamente, el valor inicial es representativo de niveles de expresión del polipéptido o ácido nucleico en una persona sana que no padece melanoma, medidos usando una muestra biológica tal como una biopsia de piel. Una variación de los niveles de un polinucleótido o ácido nucleico de la invención a partir del intervalo basal (por encima o por debajo) indica que el paciente tiene un cáncer o está en riesgo de desarrollar un cáncer, dependiendo del marcador usado. En el caso de NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y fibronectina 1 la sobreexpresión sería coherente con un diagnóstico de melanoma.

Como se usa en este documento, la expresión "proporcionar un pronóstico" se refiere a proporcionar una predicción del transcurso probable y desenlace de melanoma. Los métodos también pueden usarse para idear una terapia adecuada para el tratamiento de melanoma, por ejemplo, indicando si el melanoma está o no aún en una fase benigna o si el melanoma ha avanzado a una fase en que se requeriría terapia agresiva.

Pueden usarse reactivos de anticuerpo en ensayos para detectar los niveles de expresión de NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y fibronectina 1 en muestras de paciente usando cualquiera de varios inmunoensayos conocidos para los especialistas en la técnica. Los reactivos de anticuerpo monoclonal adecuados para su uso en la detección de la expresión de NCOA3 se desvelan en la solicitud de Estados Unidos N° 61/033663, presentada el 4 de marzo de 2008. Además, los reactivos de anticuerpo monoclonal adecuados para su uso en la detección de la expresión de Wnt-2 se desvelan en la solicitud de Estados Unidos N° 61/033,641, presentada el 4 de marzo de 2008.

Técnicas y protocolos de inmunoensayos se describen en líneas generales en Price y Newman, "Principles and Practice of Immunoassay," 2ª Edición, Grove's Dictionaries, 1997; y Gosling, "Immunoassays: A Practical Approach," Oxford University Press, 2000. Puede usarse una diversidad de técnicas de inmunoensayo, incluyendo inmunoensayos competitivos y no competitivos. Véase, por ejemplo, Self et al., Curr. Opin. Biotechnol., 7:60-65 (1996). El término inmunoensayo abarca técnicas que incluyen, sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA) tales como la técnica de inmunoensayo de múltiples enzimas (EMIT), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), ELISA de captura de anticuerpo IgM (MAC ELISA), e inmunoensayo enzimático con micropartículas (MEIA); ensayos inmunohistoquímicos (IHC); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoensayos (RIA); ensayos inmunoradiométricos (IRMA); inmunoensayos de polarización de fluorescencia (FPIA); y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, dichos inmunoensayos pueden automatizarse. También pueden usarse inmunoensayos junto con fluorescencia inducida por láser. Véanse, por ejemplo, Schmalzing et al., Electrophoresis, 18:2184-93 (1997); Bao, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci., 699:463-80 (1997). Los inmunoensayos con liposomas,

tales como inmunoensayos con liposomas con inyección de flujo e inmunodetectores liposómicos, también son adecuados para su uso en la presente invención. Véase, por ejemplo, Rongen et al., *J. Immunol. Methods*, 204:105-133 (1997). Además, los ensayos de nefelometría, en los que la formación de complejos proteína/anticuerpo provoca un aumento en la dispersión de la luz que se convierte en una señal de tasa de pico como función de la concentración de marcador, son adecuados para su uso en los métodos de la presente invención. Los ensayos de nefelometría están disponibles en el mercado por Beckman Coulter (Brea, CA; Kit nº 449430) y pueden realizarse usando un Analizador Nefelómetro Behring (Fink et al., *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 27:261-276 (1989)).

La unión inmunológica específica del anticuerpo a proteínas puede detectarse directa o indirectamente. Los marcadores directos incluyen marcas fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos, y similares, unidos al anticuerpo. Puede usarse un anticuerpo marcado con yodo ^{125} . Un ensayo de quimioluminiscencia que use un anticuerpo quimioluminiscente específico para la proteína es adecuado para detección sensible, no radioactiva de niveles de proteína. Un anticuerpo marcado con fluorocromo también es adecuado. Ejemplos de fluorocromo incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas, y lisamina. Los marcadores indirectos incluyen diversas enzimas bien conocidas en la técnica, tales como peroxidasa de rábano rústico (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β -galactosidasa, ureasa, y similares. Puede usarse un sistema de detección de peroxidasa de rábano rústico, por ejemplo, con el sustrato cromogénico tetrametilbenzidina (TMB), que produce un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Puede usarse un sistema de detección de fosfatasa alcalina con el sustrato cromogénico fosfato de p-nitrofenil, por ejemplo, que produce un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. Así mismo, puede usarse un sistema de detección de β -galactosidasa con el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), que produce un producto soluble detectable a 410 nm. Puede usarse un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como urea-púrpura de bromocresol (Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO).

Una señal del marcador directo o indirecto puede analizarse, por ejemplo, usando un espectrofotómetro para detectar color a partir de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación tal como un contador gamma para la detección de ^{125} I; o un fluorómetro para detectar fluorescencia en presencia de luz de una cierta longitud de onda. Para la detección de anticuerpos ligados a enzimas, puede hacerse un análisis cuantitativo usando un espectrofotómetro tal como un lector de microplaca EMAX (Molecular Devices; Menlo Park, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la presente invención pueden automatizarse o realizarse de forma robótica, y puede detectarse la señal de múltiples muestras de forma simultánea.

Los anticuerpos pueden inmovilizarse en una diversidad de soportes sólidos, tales como partículas de matriz magnética o cromatográfica, la superficie de una placa de ensayo (por ejemplo, pocillos de microtitulación), trozos de un material de sustrato sólido o membrana (por ejemplo, plástico, nylon, papel), y similares. Puede prepararse una tira de ensayo recubriendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una serie sobre un soporte sólido. Esta tira después puede sumergirse en la muestra de ensayo y procesarse rápidamente a través de lavados y etapas de detección para generar una señal medible, tal como una mancha coloreada.

Como alternativa, pueden usarse moléculas de unión a ácido nucleico tales sondas, oligonucleótidos, series oligonucleotídicas y cebadores en ensayos para detectar expresión diferencial de ARN en muestras de paciente, por ejemplo, RT-PCR. En una realización, se usa RT-PCR de acuerdo con métodos convencionales conocidos en la técnica. En otra realización, pueden usarse ensayos de PCR tales como ensayos Taqman® disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems, para detectar ácidos nucleicos y variantes de los mismos. En otras realizaciones, puede usarse qPCR y microseries de ácido nucleico para detectar ácidos nucleicos. Los reactivos que se unen a biomarcadores seleccionados de cáncer pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos para los especialistas en la técnica o adquirirse en el mercado.

El análisis de ácidos nucleicos puede conseguirse usando técnicas rutinarias tales como análisis de Southern, reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR), o cualquier otro método basado en hibridación a una secuencia de ácido nucleico que sea complementaria a una parte de la secuencia codificante del marcador (por ejemplo, hibridación slot blot) también están dentro del alcance de la presente invención. Las técnicas de amplificación por PCR aplicables se describen en, por ejemplo, Ausubel *et al.* e Innis *et al.*, *supra*. Los métodos de hibridación de ácido nucleico generales se describen en Anderson, "Nucleic Acid Hybridization," BIOS Scientific Publishers, 1999. La amplificación o hibridación de una pluralidad de secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN genómico, ARNm o ADNc) también puede realizarse a partir de secuencias de ARNm o ADNc dispuestas en una microserie. Los métodos de microserie se describen en líneas generales en Hardiman, "Microarrays Methods and Applications: Nuts y Bolts," DNA Press, 2003; y Baldi et al., "DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling," Cambridge University Press, 2002.

El análisis de marcadores de ácido nucleico y sus variantes puede realizarse usando técnicas conocidas en la técnica incluyendo, sin limitación, microseries, análisis basados en reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de secuencia, hibridación *in situ* fluorescente (FISH), hibridación genómica comparativa (CGH), y análisis electroforético. Un ejemplo no limitante de un análisis basado en PCR incluye un ensayo de discriminación alélica

Taqman® disponible en Applied Biosystems. Ejemplos no limitantes de análisis de secuencia incluyen secuenciación de Maxam-Gilbert, secuenciación de Sanger, secuenciación de ADN en serie capilar, secuenciación por ciclo térmico (Sears et al., *Biotechniques*, 13:626-633 (1992)), secuenciación en fase sólida (Zimmerman et al., *Methods Mol. Cell Biol.*, 3:39-42 (1992)), secuenciación con espectrometría de masas tal como espectrometría de masas por desorción láser asistida por matriz/ionización con tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS; Fu et al., *Nat. Biotechnol.*, 16:381-384 (1998)), y secuenciación por hibridación. Chee et al., *Science*, 274:610-614 (1996); Drmanac et al., *Science*, 260: 1649-1652 (1993); Drmanac et al., *Nat. Biotechnol.*, 16:54-58 (1998). Ejemplos no limitantes de análisis electroforético incluyen electroforesis en bloque de gel tal como electroforesis en gel de agarosa o poliacridamida, electroforesis capilar, y electroforesis en gel con gradiente desnaturizante. Otros métodos para detectar variantes de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, el ensayo INVADER® de Third Wave Technologies, Inc., análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo, un ensayo de movilidad de heterodúplex, análisis de polimorfismos conformacionales de hebra sencilla (SSCP), extensión de cebador de un único nucleótido (SNUPE) y pirosecuenciación.

FISH y CGH son métodos para analizar el ADN genómico para alteraciones genéticas desequilibradas. En resumen, se marca el ADN genómico de una muestra de ensayo (por ejemplo, células de melanoma) (por ejemplo, un marcador fluorescente rojo) y se mezclan con ADN genómico normal marcado con otro color (por ejemplo, un marcador fluorescente verde) y la mezcla se hibrida con una preparación tisular humana normal propagada en metafase, u otro patrón de referencia. Las regiones de desequilibrio cromosómico (cantidad de copias aumentada o disminuida) en la muestra de melanoma se localizan o mapean con relación a los cromosomas normales en metafase como aumentos o disminuciones en la proporción de fluorescencia verde a rojo. Hay protocolos detallados para realizar FISH o CGH disponibles en la técnica, por ejemplo, en *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications*, editado por Yao-Shan Fan, Humana Press, 2002; *Cancer Cytogenetics: Methods and Protocols*, editado por John Swansbury, Humana Press, 2003.

En la realización de FISH y CGH, se prepara una muestra cromosómica depositando células, en forma de suspensiones de células individuales o en forma de una preparación tisular, sobre soportes sólidos tales como portaobjetos de vidrio y fijadas eligiendo un fijador que proporcione la mejor resolución espacial de las células y la óptima eficacia de hibridación. La hibridación *in situ* generalmente implica las siguientes etapas principales: (1) fijación de la estructura tisular o biológica a analizar; (2) tratamiento pre-hibridación de la estructura biológica para aumentar la accesibilidad del ADN diana, y para reducir la unión no específica; (3) hibridación de la mezcla de ácidos nucleicos con el ácido nucleico en la estructura o tejido biológico; (4) lavados post-hibridación para eliminar los fragmentos de ácido nucleico no unidos en la hibridación; y (5) detección de los fragmentos de ácido nucleico hibridados. En algunos casos, es necesario bloquear la capacidad de hibridación de secuencias repetitivas. Para dichos propósitos, puede usarse ADN genómico humano como agente para bloquear dicha hibridación. Para la hibridación, se marca una sonda de ensayo que hibrida con una región cromosómica de interés (por ejemplo, uno o más de los marcadores desvelados en este documento) con un colorante, y se marca una sonda de control que hibrida con una región diferente con un segundo colorante. A menudo es útil un ácido nucleico que hibrida con una parte estable del cromosoma de interés, tal como la región del centrómero, como sonda de control. Usando dichos controles, pueden cuantificarse las diferencias entre la eficacia de hibridación de una muestra a otra. Si se usan múltiples marcadores de ensayo en una única hibridación, cada uno puede marcarse con un marcador distinguible por separado.

Dada la sensibilidad de los métodos FISH y CGH, puede usarse una diversidad de muestras de ensayo. Pueden usarse secciones tumorales incrustadas en parafina, así como material fresco o congelado. Otros tipos de preparaciones incluyen aquellos derivados de tumores primarios no cultivados (véase, por ejemplo, Kallioniemi, A. et al., *Cytogenet. Cell Genet.* 60:190-193 (1992)). Por ejemplo, pueden usarse muestras sanguíneas o muestras tisulares pequeñas de biopsia de tumores (véase, por ejemplo, Kallioniemi, A. et al., *Cytogenet. Cell Genet.* 60:190-193 (1992)). También pueden analizarse pequeñas cantidades de células obtenidas de biopsia por aspiración o células en fluidos corporales (por ejemplo, sangre, orina, esputo y similares).

Puede usarse un resto detectable en los ensayos descritos en este documento. Puede usarse una amplia diversidad de restos detectables, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el anticuerpo, los requisitos de estabilidad, y la instrumentación disponible y las provisiones de eliminación. Los restos detectables adecuado incluyen, aunque sin limitación, radionúclidos, colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oregon Green™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraarrodamina (TRITC), Cy3, Cy5, etc.), marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), ficoeritrina, etc.), compuestos fluorescentes autoinactivados que se activan por proteasas asociadas a tumores, enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina, y similares.

Los formatos físicos útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de localizaciones abordables discretas para la detección de una pluralidad de diferentes marcadores. Dichos formatos incluyen microseries y ciertos dispositivos capilares. Véanse, por ejemplo, Ng et al., *J. Cell Mol. Med.*, 6:329-340 (2002); patente de Estados Unidos Nº 6.019.944. En estas realizaciones, cada localización superficial discreta puede comprender anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores para la detección en cada localización. Las superficies pueden comprender

de forma alternativa una o más partículas discretas (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas) inmovilizadas en localizaciones discretas de una superficie, donde las micropartículas comprenden anticuerpos para inmovilizar uno o más marcadores para la detección.

5 El análisis puede realizarse en una diversidad de formatos físicos. Por ejemplo, podrían usarse placas de microtitulación o automatización para facilitar el procesamiento de grandes cantidades de muestras de ensayo. Como alternativa, podrían desarrollarse formatos de muestra única para facilitar el diagnóstico o pronóstico de un modo oportuno.

10 Como alternativa, los anticuerpos o sondas de ácido nucleico de la invención pueden aplicarse a secciones de biopsias de paciente inmovilizadas en portaobjetos de microscopio. La tinción resultante del anticuerpo o el patrón de hibridación *in situ* puede visualizarse usando uno cualquiera de una diversidad de métodos de microscopía óptica o fluorescente conocidos en la técnica.

15 En algunas realizaciones, el melanoma en un paciente puede diagnosticarse o evaluarse de otro modo visualizando la expresión *in situ* de una o más de las secuencias génicas o polipéptidos desvelados en este documento. Los especialistas en la técnica para visualizar la presencia o expresión de moléculas incluyendo ácidos nucleicos, polipéptidos y otros agentes bioquímicos en pacientes vivos apreciarán que la información de expresión génica descrita en este documento puede utilizarse en el contexto de una diversidad de métodos de visualización. Dichos
20 métodos incluyen, aunque sin limitación, métodos de tomografía computarizada de emisión de un único fotón (SPECT) y tomografía emisora de positrones (PET). Véanse, por ejemplo, Vassaux y Groot-wassink, "In Vivo Noninvasive Imaging for Gene Therapy," J. Biomedicine and Biotechnology, 2: 92-101 (2003); Turner, J., Smyth, P., Fallon, J.F., Kennedy, J.L., Potkin, S.G., FIRST BIRN (2006). Imaging and genetics in schizophrenia. Neuroinformatics, en impresión.

25 La formación de imágenes PET y SPECT muestra el funcionamiento químico de órganos y tejidos, mientras que otras técnicas de formación de imágenes -tales como rayos X, CT y MRI- muestran la estructura. El uso de formación de imágenes PET y SPECT es útil para identificar y controlar el desarrollo de melanoma. En algunos casos, el uso de formación de imágenes PET o SPECT permite detectar enfermedades años antes de la aparición de los síntomas. El uso de moléculas pequeñas para marcar y visualizar la presencia y expresión de polipéptidos y nucleótidos ha tenido éxito, por ejemplo, en la visualización de proteínas en los cerebros de pacientes de Alzheimer, como se describe por, por ejemplo, Herholz K et al., Mol Imaging Biol., 6(4):239-69 (2004); Nordberg A, Lancet Neurol., 3(9):519-27 (2004); Neuropsychol Rev., Zakzanis KK et al., 13(1):1-18 (2003); Kung MP et al, Brain Res., 1025(1-2): 98-105 (2004); y Herholz K, Ann Nucl Med., 17(2):79-89 (2003). También son útiles anticuerpos y sondas
35 de ácido nucleico.

Los genes expresados de forma diferencial desvelados en este documento, o sus péptidos codificados, o fragmentos de los mismos, pueden usarse en el contexto de aplicaciones de formación de imágenes PET o SPECT. Después de la modificación con restos indicadores apropiados para aplicaciones PET o SPECT, pueden usarse moléculas que
40 interaccionan o se unen con los marcadores de ácido nucleico o con cualquier polipéptido codificado por esos transcritos para visualizar los patrones de expresión génica y facilitar el diagnóstico y pronóstico como se describe en este documento. Así mismo, si los polipéptidos codificados codifican enzimas, pueden usarse moléculas marcadas que interaccionan con los productos de catálisis por la enzima para la formación de imágenes *in vivo* y la aplicación diagnóstica descrita en este documento.

45 **Composiciones y kits**

La invención proporciona composiciones y kits para practicar los ensayos descritos en este documento usando anticuerpos específicos para los polipéptidos o ácidos nucleicos específicos para los polinucleótidos de la invención.

50 Los kits para realizar los ensayos de diagnóstico de la invención típicamente incluyen, en medios de recipiente adecuados, una sonda que comprende un anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que se une específicamente a los polipéptidos o polinucleótidos marcadores de la invención, y un marcador para detectar la presencia de la sonda. Los kits pueden incluir varios anticuerpos o secuencias polinucleotídicas que codifican polipéptidos de la invención,
55 por ejemplo, anticuerpos que reconocen NCOA3, Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y Fibronectina 1.

Los medios de recipiente de los kits generalmente incluirán al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, frasco, jeringa y/u otro recipiente en el que puede colocarse y/o formarse en alícuotas adecuadamente un primer anticuerpo específico para uno de los polipéptidos o un primer ácido nucleico específico para uno de los
60 polinucleótidos de la presente invención. Cuando se proporcionan un segundo y/o tercer y/o adicionales componentes, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer y/u otros recipientes adicionales en que puede colocarse este componente. Como alternativa, un recipiente puede contener una mezcla de más de un anticuerpo o ácido nucleico reactivo, uniéndose específicamente cada reactivo a un marcador diferente de acuerdo con la presente invención. Los kits de la presente invención también incluirán típicamente un medio para contener el
65 anticuerpo o ácido nucleico sonda en confinamiento cerrado para venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes para inyección y/o de plástico moldeado por soplado en que se retienen los viales deseados.

Los kits pueden comprender adicionalmente controles positivos y negativos, así como instrucciones para el uso de los componentes del kit contenidos en el mismo, de acuerdo con los métodos de la presente invención.

5 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, y no para limitar, la invención.

EJEMPLO 1: Correlación de la sobreexpresión de NCOA3 con un desenlace de melanoma

Se evaluó la expresión de NCOA3 usando análisis inmunohistoquímico de una microserie tisular de melanoma (TMA) que contenía melanomas primarios de 343 pacientes con histología definida y seguimiento. El impacto de la presencia o ausencia de diversos factores pronósticos sobre la supervivencia sin recidiva (RFS) y específica de la enfermedad (DSS) de pacientes con melanoma se evaluó usando regresión de Cox y análisis de Kaplan-Meier. El impacto de la presencia o ausencia de diversos factores sobre metástasis a ganglio linfático centinela (SLN) se evaluó usando análisis de regresión lógica.

Como los siguientes resultados demuestran, un grado creciente de expresión de NCOA3 fue significativamente predictivo de metástasis al SLN ($P=0,013$) y la cantidad media de metástasis al SLN ($P=0,031$). El análisis de Kaplan-Meier demostró una asociación significativa entre la sobreexpresión de NCOA3 y la reducción de RFS ($P=0,021$) y DSS ($P=0,030$). El análisis de regresión lógica reveló que un grado creciente de expresión de NCOA3 era un indicador independiente del estado de SLN ($P=0,017$). El análisis de regresión de Cox de múltiples variables mostró el impacto independiente de la expresión de NCOA3 sobre RFS ($P=0,0095$) y DSS ($P=0,021$). NCOA3 fue el factor más potente para predecir DSS, superando el grosor del tumor y la ulceración. Por tanto, estos resultados identifican a NCOA3 como un nuevo marcador independiente de desenlace de melanoma, con un impacto significativo sobre la metástasis al SLN, RFS y DSS.

Caracterización y construcción de TMA de melanoma

Se construyó una TMA de 343 melanomas primarios con al menos dos años de seguimiento, recidiva documentada, o que han experimentado biopsia del SLN. El desglose demográfico de la cohorte aparece en la Tabla 1. De los 343 pacientes, 259 habían experimentado biopsia del SLN, proporcionando de este modo información referente al estado del SLN. Los criterios para experimentar biopsia del SLN incluyen los siguientes: melanoma > 1,0 mm de grosor, o presencia de cualquiera de los siguientes factores histológicos en melanomas por debajo de 1,0 mm de grosor: nivel IV o V de Clark, ulceración, implicación vascular, microsatélites, regresión extensiva (cubriendo más del 50% del diámetro del tumor), o biopsia inadecuada (biopsia parcial que muestra melanoma transeccionado en la base). El seguimiento medio de esta cohorte fue de 49 meses, con una mediana del seguimiento de 45 meses. Las TMA se construyeron como se ha descrito previamente tomando núcleos tisulares de 1,0 mm de diámetro del bloque de parafina (véase Kashani-Sabet M. et al., J Clin Oncol, 22:617-623, 2004; Kononen J. et al., Nat Med 4: 844-847, 1998).

Tabla 1: Sumario de la demográfica de los pacientes

Variable demográfica	Cantidad (% , si procede)
Edad (mediana)	53
Género masculino	227 (66,2)
Localización anatómica	
Cabeza y cuello	60 (17,5)
Tronco	137 (39,9)
Extremidad	146 (42,6)
Tipo de tumor histológico	
Melanoma de propagación superficial	159 (46,4)
Melanoma nodular	121 (35,3)
Melanoma acral	19 (5,5)
Melanoma léntigo maligno	11 (3,2)
Melanoma desmoplásico	9 (2,6)
Melanoma no clasificado de otro modo	24 (7,0)
Grosor del tumor	
T1 (< 1,0 mm)	22 (6,4)
T2 (1,01-2,0 mm)	110 (32,1)
T3 (2,01-4,0 mm)	97 (28,3)
T4 (> 4,0 mm)	114 (33,2)

Inmunohistoquímica

Se desparafinizaron los portaobjetos y se rehidrataron en xileno, después se sometieron a microondas en tampón citrato 10 mM. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%, y los portaobjetos se

incubaron secuencialmente con los reactivos de bloqueo Avidina y Biotina. Después se añadió el anticuerpo primario, IgG monoclonal de ratón anti-NCOA3 (Abcam nº ab14139) a una dilución 1:10 y se incubó durante 60 min. a temperatura ambiente. Se usó anticuerpo biotinilado de caballo anti-IgG de ratón (Vector Laboratories, Burlingame, CA) como anticuerpo secundario para la amplificación, seguido de incubación con ABC-HRP (Vector Laboratories) durante 30 min., y solución de DAB/peróxido de hidrógeno (Sigma).

Evaluación de la tinción inmunohistoquímica

Las regiones de tinción más intensa se valoraron para cada núcleo de serie tisular. La expresión de la proteína NCOA3 se graduó usando la siguiente escala: sin tinción (0), tinción débil (1), tinción moderada (2), y tinción intensa (3). Las series se valoraron por un patólogo sin acceso a la identidad de los casos, y cada valor se replicó mediante un ensayo de valoración independiente diferente. Se determinó un valor consenso para los pocos casos de valoración discrepante entre los ensayos replicados. Los controles de especificidad para la tinción de NCOA3 incluyeron líneas celulares de tumor mamario, de melanoma (LOX y FEM) y secciones tisulares de melanoma. Los controles positivos incluyeron secciones de tumor mamario así como células LOX y FEM, mientras que los controles negativos incluyeron tejido de la amígdala y la línea celular de carcinoma mamario T47D. El control negativo usado para la inmunohistoquímica incluyó el uso de solución salina tamponada con fosfato en lugar de anticuerpo primario, con todas las demás condiciones experimentales mantenidas constantes.

Análisis estadísticos

Los métodos estadísticos usados para evaluar la trascendencia de diversos factores pronósticos sobre el desenlace de melanoma se han descrito previamente (véase Kashani-Sabet M. et al., J Clin Oncol, 22:617-623, 2004; Kashani-Sabet M. et al., J Clin Oncol, 20:1826-1831, 2002; Kashani-Sabet, M. et al., Arch Dermatol. 137:1169-1173, 2001). Tanto para RFS como para DSS, la definición de elevados valores de NCOA3 (definidos como un valor de 2 ó 3) se seleccionó originalmente basándose en los mejores umbrales para valor predictivo de DSS sobre el análisis de Kaplan-Meier, y los mismos umbrales se usaron de forma uniforme y constante en todos los posteriores análisis de una variable y múltiples variables de RFS y DSS. La asociación entre la elevada expresión de NCOA3 y RFS o DSS se evaluó usando el ensayo exacto de Fisher y regresión de Cox tanto de una variable como de múltiples variables. Para el estado del SLN, los mejores umbrales se determinaron en un valor de 0 frente a 1 ó 2 frente a 3 basándose en los resultados del análisis de regresión logística de una variable, y los mismos umbrales se usaron de forma uniforme y constante para todos los posteriores análisis para examinar el estado del SLN. La asociación entre la expresión creciente de NCOA3 y metástasis al SLN se evaluó usando análisis de ji cuadrado y regresión logística tanto de una variable como de múltiples variables. La asociación entre la expresión creciente de NCOA3 y el recuento medio de SLN se evaluó usando el análisis de la varianza (ANOVA) y el ensayo de Le direccional. Con la excepción de este análisis direccional, todos los valores P presentados son dobles. Además de los factores pronósticos analizados por el AJCC, se incluyeron los siguientes factores en el conjunto de datos: tasa mitótica, vascularidad del tumor, presencia o ausencia de microsatélites, implicación vascular, y regresión. La codificación para los atributos clínicos o patológicos se realizó como se ha descrito previamente (véase Kashani-Sabet M. et al., J Clin Oncol, 22:617-623, 2004).

Resultados

Dados nuestros resultados con microserie de ADNc que sugieren expresión diferencial del gen NCOA3 en melanomas metastásicos cuando se comparan con tumores primarios no relacionados, aspiramos a examinar el impacto pronóstico de la expresión de NCOA3 a nivel proteico en una TMA que contiene 343 núcleos de melanoma primario. Se analizó la expresión de NCOA3 usando un anticuerpo monoclonal disponible en el mercado dirigido contra NCOA3 humano (IgG monoclonal de ratón anti-NCOA3 (Abcam nº ab14139)), y se valoró por un observador sin acceso a los resultados de los pacientes.

La expresión de NCOA3 estuvo ausente en 20 (8%, Fig. 1A) y fue intensa (valor de 3) en 111 (32,4%, Fig. 1B) de los 343 núcleos examinados. La expresión de NCOA3 no se correlacionó significativamente con el subtipo histológico de melanoma (datos no mostrados), con la posible excepción de melanomas desmoplásicos, en los que solamente un tumor primario mostró tinción intensa. Además, la expresión de NCOA3 no se correlacionó con varios factores pronósticos conocidos para melanoma, tales como el grosor del tumor, la ulceración, el nivel de Clark, la tasa mitótica, la implicación vascular, los microsatélites, o la vascularidad del tumor (datos no mostrados).

En primer lugar, se analizó la asociación entre la expresión de NCOA3 y el desenlace de melanoma por análisis de una variable. La elevada expresión de NCOA3 (definida como un valor de 2 ó 3) aumentó significativamente el riesgo de recidiva del melanoma (52,2% frente al 35,9%, $P=0,010$, ensayo exacto de Fisher) y redujo la RFS de pacientes con melanoma en esta cohorte cuando se analizó por análisis de Kaplan-Meier ($P=0,021$, ensayo de rango Log, Fig. 2A). La elevada expresión de NCOA3 se asoció con riesgo aumentado de muerte debido a melanoma (31,9% frente al 18,5%, $P=0,021$, ensayo exacto de Fisher) y redujo la DSS por análisis de Kaplan-Meier ($P=0,030$, ensayo de rango Log, Fig. 2B).

Además del riesgo de recidiva y muerte, la expresión creciente de NCOA3 se correlacionó significativamente con estado positivo del SLN, una medición de micrometástasis a la cuenca nodal regional, por análisis de regresión lógica ($P = 0,013$). Los pacientes con un valor de tinción de NCOA3 de 0 tuvieron una prevalencia del 7,1% de la positividad del SLN, que aumentó hasta el 27,4% en pacientes con un valor de 1 ó 2, y hasta el 38,3% en pacientes con un valor de 3 ($P=0,036$, ensayo de ji cuadrado). Curiosamente, el nivel de expresión de NCOA3 también se correlacionó con la carga tumoral del SLN medida por la cantidad media de SLN implicados. Por tanto, en pacientes con un valor de tinción de NCOA3 de 0, la cantidad media de ganglios implicados fue de 0,07. Ésta aumentó hasta 0,47 ganglios en pacientes con un valor de 1 ó 2, y hasta 0,57 ganglios en pacientes con un valor de 3 ($P = 0,0004$ ANOVA, $P = 0,030$ ensayo direccional de Le).

A continuación, se examinó el impacto de la expresión de NCOA3 sobre el desenlace de melanoma por análisis de múltiples variables. Se realizó análisis de regresión de Cox de múltiples variables, incluyendo el estado de NCOA3 y seis factores pronósticos clínicos e histológicos evaluados por el comité de estadificación del AJCC para melanoma, incluyendo grosor del tumor y ulceración, los factores actualmente usados en la clasificación por estadificación del AJCC para melanoma cutáneo (véase Balch C.M et al., J Clin Oncol, 19: 3622-3634, 2001; Balch C.M et al., J Clin Oncol, 19:3635-3648, 2001). Este análisis reveló que el estado de NCOA3 es un indicador independiente tanto de RFS (Tabla 2) como de DSS (Tabla 3). En el análisis de regresión de Cox de DSS, NCOA3 surgió como el factor más potente para determinar la supervivencia, superando tanto el grosor del tumor como la ulceración. Posteriormente, el análisis de regresión lógica de múltiples variables demostró que la expresión de NCOA3 es un indicador independiente del estado del SLN cuando se incluían los otros seis factores pronósticos en el modelo (Tabla 4).

Finalmente, aspiramos a evaluar el valor predictivo de diversos factores pronósticos cuando se introducían los 12 factores incluidos en el conjunto de datos (y disponibles para análisis) en los modelos de múltiples variables. Además de los siete factores mencionados previamente, este análisis incluyó la tasa mitótica, el grado de vascularidad del tumor, así como la presencia o ausencia de implicación vascular, microsátélites, y regresión. La sobreexpresión de NCOA3 siguió siendo significativamente predictiva de DSS y el estado del SLN (datos no mostrados), cuando se incluían los 12 factores en los modelos de múltiples variables.

Tabla 2. Análisis de regresión de Cox del impacto de factores clínicos, histológicos y moleculares sobre la RFS de la cohorte de melanoma

Factor pronóstico	Proporción de riesgo	ji cuadrado	Valor P (bilateral)
Nivel de Clark	2,22	16,77	< 0,00005
Ulceración	1,94	13,86	0,0002
Nivel de NCOA3 (2,3 frente a 0,1)	1,69	6,72	0,0095
Grosor del tumor	1,27	5,28	0,022
Sitio	1,39	3,61	0,057
Edad	1,03	0,22	0,64
Sex	1,04	0,04	0,85

Tabla 3. Análisis de regresión de Cox del impacto de factores clínicos, histológicos y moleculares sobre la DSS de la cohorte de melanoma

Factor pronóstico	Proporción de riesgo	ji cuadrado	Valor P (bilateral)
Nivel de NCOA3 (2,3 frente a 0,1)	1,91	5,29	0,021
Grosor del tumor	1,34	4,69	0,030
Ulceración	1,65	4,89	0,027
Nivel de Clark	1,75	5,00	0,025
Edad	1,09	1,65	0,20
Sitio	1,41	2,27	0,13
Sexo	1,00	0,0002	0,99

Tabla 4. Análisis de regresión lógica del impacto de factores clínicos, histológicos y moleculares sobre la metástasis al SLN

Factor pronóstico	ji cuadrado	Valor P (bilateral)
Edad decreciente	12,92	0,0003
Grosor del tumor	8,10	0,0044
Nivel de Clark	5,14	0,023
Expresión de NCOA3 (3 frente a 1, 2 frente a 0)	5,70	0,017
Sexo	1,43	0,23
Ulceración	0,79	0,37
Sitio	0,09	0,76

Discusión

Estos resultados muestran que la sobreexpresión de NCOA3 en melanoma cutáneo primario se correlaciona significativamente con recidiva de melanoma y muerte específica de la enfermedad. La expresión de NCOA3 fue significativamente predictiva de la RFS y DSS de esta cohorte cuando se incluyeron los seis factores pronósticos analizados por el comité de estadificación del AJCC en los modelos de múltiples variables. De forma importante, la expresión de NCOA3 superó el grosor del tumor en cada uno de estos análisis, y surgió como el factor más potente para predecir DSS. Desde la publicación de la clasificación revisada por estadificación del AJCC para melanoma (véase Balch C.M et al., J Clin Oncol, 19:3635-3648, 2001), pocos factores pronósticos moleculares han mostrado ser de trascendencia pronóstica independiente cuando se han incluido los seis factores analizados por el Comité de estadificación del AJCC en modelos de múltiples variables, poniendo de relieve la potencial trascendencia de los hallazgos que correlacionan la expresión de NCOA3 y el desenlace asociado con melanoma.

Además, el estado de NCOA3 siguió proporcionando información pronóstica independiente respecto a la DSS y el estado del SLN cuando se incluían los 12 factores pronósticos disponibles en el modelo. Este análisis incluyó factores tales como la tasa mitótica y la implicación vascular, que han demostrado en diversos análisis ser más potentes que la ulceración (véase Kashani-Sabet M. et al., J Clin Oncol, 20:1826-1831, 2002; Azzola M.F. et al., Cancer, 97:1488-1498, 2003). Tomados en conjunto, estos resultados demuestran la utilidad de NCOA3 como un nuevo marcador molecular independiente del desenlace de melanoma, con un impacto significativo sobre las importantes mediciones del desenlace para melanoma.

De forma interesante, las metástasis examinadas en el estudio de perfiles de expresión génica mostraron que NCOA3 sobreexpresado estaba principalmente en metástasis de ganglios linfáticos, lo que indica la importancia potencia de la expresión de NCOA3 para la metástasis a ganglio linfático de melanoma. No solamente la elevada expresión de NCOA3 se correlacionaba con un riesgo significativamente aumentado de metástasis al SLN.

Cohérente con la fuerte correlación entre la expresión de NCOA3 y el estado del SLN fue la observación de que una elevada expresión de NCOA3 raramente se observaba en el pequeño subconjunto de melanomas desmoplásicos incluidos en este análisis. También se ha realizado inmunohistoquímica en un paciente con melanoma desmoplásico con biopsia positiva de ganglio linfático centinela. El análisis demuestra positividad tanto en el tumor primario así como en la metástasis al ganglio linfático (Figura 3). Esto sugiere la utilidad de inmunotinción de NCOA3 en la identificación de casos de melanoma desmoplásico que experimentan metástasis al ganglio linfático centinela.

Dada la predominancia de pacientes que experimentan biopsia del SLN en este conjunto de datos, es posible que algunos de los resultados presentados en este documento puedan haberse sesgado por una parcialidad en la selección. Aún existe controversia en cuanto a la selección de paciente que experimentan biopsia del SLN en el establecimiento de tumores delgados (< 1,0 mm) y gruesos (> 4,0 mm), y los subtipos histológicos particulares, tales como melanoma desmoplásico. Por tanto, los criterios de selección usados para recomendar biopsia del SLN pueden haber influenciado los datos de desenlace presentados. Como resultado, la trascendencia de la sobreexpresión de NCOA3 puede ser más relevante para pacientes que experimentan biopsia del SLN.

Finalmente, estos resultados revelan la trascendencia de amplia base de NCOA3 como marcador pronóstico en cáncer dada su importancia en neoplasias sensibles a hormonas e independientes de hormonas.

En conclusión, nuestros resultados muestran una correlación significativa entre la sobreexpresión de NCOA3 y el riesgo aumentado de recidiva y la supervivencia reducida asociada con melanoma. Además, revelan que la expresión de NCOA3 es independientemente predictiva de varias mediciones de desenlace de melanoma, incluyendo DSS, RFS, y estado del SLN, lo que revela que NCOA3 es un nuevo marcador pronóstico para melanoma cutáneo primario.

EJEMPLO 2: La inhibición de NCOA3 suprime la progresión metastásica de melanoma en modelos murinos

Este ejemplo muestra que la expresión del gen NCOA3 es importante para el mantenimiento del fenotipo metastásico en melanoma. Se usó suministro sistémico génico basado en ribozima no viral (Kashani-Sabet, 2002) y ARNip para abordar el gen NCOA3. Se clonaron ribozimas en cabeza de martillo y ARNip dirigidos contra NCOA3 murino en nuestro plásmido de expresión, y se trataron ratones que albergaban tumores con vectores de control o supresores de NCOA3 en el día 3 y 10 después de inoculación de células tumorales. El análisis de la carga de tumor metastásico en el pulmón (evidenciada por la cantidad de tumores pulmonares) mostró una disminución significativa en animales tratados con la ribozima o ARNip anti-NCOA3 frente al control de vector (Figura 4). El análisis de los pesos de los pulmones, otra medición de la carga de tumor metastásico, reveló a Rz397 como la única construcción que suprime significativamente los pesos de los pulmones de ratones C57B1/6 (Figura 5). Estos estudios demuestran claramente la utilidad del perfilado de expresión génica en la identificación de marcadores funcional, así como moleculares de progresión de melanoma. Además, indican que los marcadores identificados por análisis de microserie de ADNc pueden representar dianas para terapia de melanoma metastásico.

De forma interesante, la administración sistémica de la ribozima anti-NCOA3 dirigida contra el nucleótido 397 también suprimía la progresión metastásica de células de carcinoma mamario murino 4T1 en ratones BALB/c (Figura 6). En el modelo 4T1, la ribozima fue superior en sus efectos anti-tumorales en comparación con el ARNip

dirigido contra la misma región de NCOA3, así como el control de vector y controles de ribozima y ARNip mutantes, inhabilitados. Estos resultados sugieren la utilidad terapéutica potencial del direccionamiento a NCOA3 en la terapia de cáncer mamario metastásico así como melanoma.

- 5 Finalmente, la introducción por transfección transitoria de Rz397 o ARNip385 en células de melanoma B16 in vitro redujo la invasión de células tumorales en matrigel, lo que sugiere un mecanismo potencial mediante el cual el direccionamiento a NCOA3 suprime la metástasis tumoral (Figura 7).

EJEMPLO 3: Expresión diferencial de Wnt-2 en la progresión de melanoma

- 10 Se realizó análisis inmunohistoquímico de la expresión de WNT-2 en un conjunto de ensayo de microserie tisular de 40 nevos benignos y 376 melanomas primarios, y un conjunto de validación de 34 secciones tisulares de melanoma primario que surge en asociación con un nevo. Los nevos benignos mostraron tinción fuerte para Wnt-2 en la zona de unión del nevo, con pérdida casi universal de la expresión en la base del nevo. En contraste, los melanomas primarios mostraron un patrón de tinción más uniforme, sin variación aparente en la tinción en toda la fase de crecimiento vertical. La inmunotinción de Wnt-2 en la base de los melanomas primarios fue significativamente mayor que en la base de los nevos. El análisis de pares coincidentes de la expresión de Wnt-2 de melanoma que surge en asociación con un nevo mostró que la tinción de Wnt-2 en la zona de unión del nevo era significativamente mayor en todos los casos comparados con la base del mismo nevo. Además, los valores de Wnt-2 para los melanomas primarios fueron significativamente mayores en todos los casos cuando se comparaban con sus controles coincidentes en la base del nevo. Estos resultados presentados a continuación validan la importancia de la vía de activación de WNT en la progresión de melanoma, y revelan a Wnt-2 como un nuevo biomarcador para melanoma.

Selección de nevos y melanomas para la incorporación en el conjunto de datos

- 25 Se construyeron dos conjuntos de datos para el análisis realizado en este estudio: (i) un conjunto de ensayo que consta de una microserie tisular de 138 nevos benignos y 376 melanomas primarios, y (ii) un conjunto de validación de 34 secciones tisulares de melanoma primario que surge en un nevo. De los 138 nevos incluidos en las series de nevos, 40 tenían una parte de la epidermis incluida en el núcleo para permitir un análisis preciso de la tinción de Wnt-2 en la zona de unión del nevo frente a la base del nevo. La composición de los 40 nevos en las microseries estudiadas es la siguiente: 5 nevos compuestos adquiridos, 9 nevos compuestos congénitos, 7 nevos intradérmicos adquiridos, 17 nevos intradérmicos congénitos, 1 nevo displásico adquirido, y 1 nevo de unión. Los subtipos histológicos de melanoma primario incluidos en las microseries de melanoma son los siguientes: 176 melanomas de propagación superficial, 132 melanomas nodulares, 14 melanomas léntigo malignos, 22 melanomas acrales, 10 melanomas desmoplásicos, y 22 melanomas no clasificados de otro modo. En la conjunto de validación, se crearon secciones tisulares de 34 casos de melanoma primario que surge en un nevo. De los 34 casos, 28 tuvieron nevos con componentes tanto de unión como dérmicos, mientras que 31 tuvieron tanto nevo dérmico como melanoma invasivo. Lo siguiente es el desglose del subtipo histológico para nevos y melanomas: 22 nevos congénitos, 8 nevos adquiridos, 1 nevo displásico, 19 melanomas de propagación superficial, 7 melanomas nodulares, y 5 melanomas no clasificados de otro modo.

Series tisulares

- 45 Se crearon microseries tisulares como se ha descrito previamente tomando núcleos de tejido de 1,0 mm de diámetro usando un instrumento de serie Beecher (véase Kononen, J. et al., Nat Med, 1998, 4: 844-847; Kashani-Sabet M. et al., J Clin Oncol, 2004, 22: 617-623). Tras la construcción del bloque, se cortaron secciones de 5 µm usando un microtomo tisular y se colocaron en portaobjetos cargados. Se hicieron un total de 16 series de melanoma y un total de 4 serie de nevo con un promedio de aproximadamente 40 tejidos por serie. Las series de melanoma incluían un total de 673 núcleos de tejido (457 melanomas primarios con núcleos duplicados para 150 pacientes). Las series de nevo incluían un total de 138 núcleos de tejido. De los 457 melanomas primarios en la microserie tisular, 376 fueron interpretables para la tinción de Wnt-2.

Inmunohistoquímica

- 55 Los portaobjetos se homearon a 60°C durante 30 min. antes de la tinción, y se desparafinizaron y se rehidrataron por aclarado en xileno. Los portaobjetos después se sometieron a microondas en tampón citrato 10 mM. Se bloqueó la actividad peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%. Después de lavar con PBS, los portaobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. con suero normal de conejo para reducir la tinción de fondo no específica, y después se calentaron con PBS. El anticuerpo primario, IgG policlonal de cabra anti-Wnt-2 (Biovision) se añadió después a una dilución 1:5 y se incubó durante una noche a 4°C. El anticuerpo biotinilado de carba anti-IgG de conejo (Vector Laboratories, Burlingame, CA) se usó como anticuerpo secundario para la amplificación, seguido de incubación con ABC-HRP (Vector Laboratories) durante 30 min., y solución de DAB/peróxido de hidrógeno (Sigma). Los portaobjetos se tiñeron con contraste con hematoxilina y se montaron con permount. Se utilizó el mismo protocolo de tinción inmunohistoquímica de Wnt-2 para portaobjetos de serie tisular y secciones rutinarias.

Evaluación de la tinción inmunohistoquímica

Las regiones de tinción más intensa se valoraron para cada núcleo de serie tisular y sección tisular. La expresión de la proteína Wnt-2 se graduó usando la siguiente escala: sin tinción (0), tinción débil (1+), tinción moderada (2+), y tinción intensa (3+). Las muestras sin melanoma invasivo o nevo o las muestras que no eran interpretables se excluyeron del análisis. Las series y secciones se valoraron por un patólogo sin acceso a la identidad de los casos con dos valoraciones diferentes y un valor consenso determinado para valoraciones discrepantes. Los controles de especificidad para la tinción de Wnt-2 incluyeron líneas celulares de tumor mamario, melanoma (LOX y FEM) y secciones tisulares de melanoma.

Análisis estadístico

Los métodos estadísticos usados para evaluar la trascendencia de diversos factores pronósticos sobre el desenlace asociado con melanoma son los siguientes: en las microseries tisulares, se ensayó la diferencia potencial entre la inmunotinción de Wnt-2 en la zona de unión del nevo y la base del nevo usando el ensayo de signos binomial y el ensayo de rangos con signo de Wilcoxon de pares coincidentes. La diferencia potencial entre la inmunotinción de Wnt-2 en la base del nevo y en la base de melanoma se ensayó usando el ensayo de Mann-Whitney. En las secciones tisulares de melanoma primario que surge en un nevo, la diferencia potencial entre la inmunotinción de Wnt-2 en la zona de unión del nevo y la base del nevo se ensayó usando el ensayo de signos binomial y el ensayo de rangos con signo de Wilcoxon de pares coincidentes. La diferencia potencial entre la inmunotinción de Wnt-2 en la base del nevo y en la base del melanoma se ensayó usando el ensayo de signos binomial y el ensayo de rangos con signo de Wilcoxon de pares coincidentes. Todos los valores P presentados son dobles.

Resultados

Dados los resultados de la microserie de ADNc que muestran la expresión diferencial de la vía Wnt en melanomas cuando se compara con nevus, aspiramos a sondear la expresión diferencial de Wnt-2 en una cohorte independiente más grande de neoplasias melanocíticas. Para este fin, se construyó un conjunto de ensayo que contenía microseries tisulares con 138 nevus melanocíticos y 376 melanomas primarios, y un conjunto de validación de 34 secciones tisulares que contenían melanomas primarios con un nevo pre-existente. La expresión de Wnt-2 se analizó usando un anticuerpo monoclonal disponible en el mercado dirigido contra Wnt-2 humano. En el proceso de optimización de la tinción inmunohistoquímica para Wnt-2, se halló un patrón de tinción intrigante para Wnt-2 en nevus benignos. Los nevus benignos mostraron una fuerte tinción para Wnt-2 en la zona de unión del nevo, con pérdida casi universal de expresión en la base del nevo (Figura 8).

Como resultado de este hallazgo, se restringió el análisis de la expresión de Wnt-2 en las microseries tisulares de nevus a aquellos núcleos de nevo que contenían un trozo de la epidermis, de modo que fuera posible la comparación de la inmunotinción entre la zona de unión del nevo y la base del nevo. Esto redujo el conjunto de serie de nevo eficaz a 40 casos. En cada uno de los 40 casos examinados, la inmunotinción de Wnt-2 fue mayor en la zona de unión del nevo, cuando se comparaba con su base coincidente, un hallazgo que es altamente significativo ($P < 0,00005$, ensayo de signos binomial). La pérdida de inmunotinción de Wnt-2 en la base del nevo aún fue significativa cuando se desglosaba en subtipos de nevo para los dos subtipos histológicos más comunes de nevo presentes en las series, concretamente nevus intradérmicos y melanocíticos compuestos ($P < 0,001$, ensayos de signos binomial).

A continuación, se examinó la inmunotinción de Wnt-2 en una serie tisular que contenía 376 núcleos de melanoma primario. En contraste con los nevus, los melanomas primarios mostraron un patrón más uniforme de tinción, in disminución en la tinción en toda la fase de crecimiento vertical (Figura 9). La gran mayoría de los melanomas primarios analizados mostraron alguna expresión de Wnt-2, y hubo tinción ausente en solamente 8 casos (3,8%). Además, la fuerza de la expresión de Wnt-2 estuvo uniformemente presente entre los diferentes subtipos histológicos de melanoma (Tabla 5). No hubo correlación significativa entre la expresión de Wnt-2 y varios marcadores pronósticos bien conocidos para melanoma, incluyendo el grosor del tumor, el nivel de Clark, la ulceración, la tasa mitótica, los microsatélites, y la implicación vascular (datos no mostrados).

Tabla 5. Grado de expresión de Wnt-2 entre diferentes subtipos histológicos de melanoma primario

Subtipo histológico	Valor de Wnt-2			
Cantidad de casos (%)	0	1	2	3
SSM	7/176 (4,0)	45/176 (25,6)	92/176 (52,3)	32/176 (18,2)
NM	5/132 (3,8)	28/132 (21,2)	60/132 (45,5)	39/132 (29,5)
LMM	0/14	5/14 (35,7)	7/14 (50)	2/14 (14,3)
AM	1/22 (4,5)	7/22 (31,8)	11/22 (50)	3/22 (13,6)
DM	0/10	5/10 (50)	3/10 (30)	2/10 (20)
NOC	1/22 (4,5)	10/22 (45,5)	8/22 (36,4)	3/22 (13,6)

Abreviaturas: SSM, melanoma de propagación superficial; NM, melanoma nodular; LMM, melanoma léntigo maligno; AM, melanoma acral; DM, melanoma desmoplásico; NOC, melanoma no clasificado de otro modo.

Entonces se comparó la inmunotinción de Wnt-2 en los melanomas primarios con la observada en los nevos. Dado el patrón de expresión de Wnt-2 en los nevos, se comparó el valor de Wnt-2 en la base del nevo con el del observado en la base del melanoma. El valor medio en la base de los melanomas (1,88) fue significativamente mayor que el valor medio en la base de los nevos (0,57, $P < 0,00005$, ensayo T para muestras independientes).

Para examinar adicionalmente la expresión diferencial de Wnt-2 entre los nevos y los melanomas primarios observados en las microseries tisulares, se razonó que un entorno óptimo en que evaluar las diferencias potenciales era en casos de melanoma con nevos pre-existentes, para los cuales se controlan automáticamente muchos factores de desviación potenciales (edad, género, localización anatómica, y subtipos histológicos potencialmente irrelevantes de nevo y melanoma, entre otros), creando de este modo un análisis de pares coincidentes de-facto. De esta manera, se acumuló un conjunto de validación de 34 casos de melanoma primario en asociación con un nevo, y se realizó tinción inmunohistoquímica de Wnt-2 en secciones tisulares 5 μ M.

Inicialmente, se analizó la expresión de Wnt-2 en la zona de unión del nevo frente a la base del nevo. De los 34 casos, 28 tuvieron tanto zona de unión como base del nevo presentes dentro de la sección. En cada uno de los 28 casos, la inmunotinción de Wnt-2 en la zona de unión del nevo fue mayor que su base coincidente, un hallazgo que fue elevadamente significativo ($P < 0,00005$, ensayo de signos binomial y ensayo de rangos con signo de Wilcoxon de pares coincidentes). La drástica disminución en la expresión de Wnt-2 en la base del nevo se corroboró analizando el porcentaje de casos con valores altos frente a bajos de Wnt-2. De esta manera, el 90,6% de las zonas de unión obtuvieron un valor de 2 ó 3, mientras que el 94,1% de las bases de los nevos obtuvieron un valor de 0 ó 1 (Tabla 6). De forma interesante, no hubo tinción ausente (valor de 0) en la zona de unión de ningún nevo, y ni tinción fuerte (valor de 3) en la base de los nevos examinados, lo que ilustra adicionalmente esta dicotomía.

Tabla 6. Grado de inmunotinción de Wnt-2 en la zona de unión del nevo frente a la base del nevo

Valor de Wnt-2	Zona de unión del nevo	Base del nevo
	(% de casos que expresan valor)	
0/1+	9,4%	94,1%
2/3+	90,6%	5,9%

Finalmente, se comparó el patrón de expresión de Wnt-2 en la base del melanoma con el presente en la base de su nevo asociado en las muestras teñidas. De los 34 casos, 31 tenían tanto base del nevo como base del melanoma para la comparación. En 29 casos, la inmunotinción de Wnt-2 fue significativamente mayor en la base del melanoma en comparación con su base del nevo coincidentes (como se muestra en la Figura 11), mostrando dos casos valores idénticos de Wnt-2 ($P < 0,00005$, ensayo de signos binomial y ensayo de rangos con signo de Wilcoxon de pares coincidentes). En ningún caso hubo expresión de Wnt-2 mayor en la base del nevo en comparación con el melanoma. Otra vez más, este fenómeno se reflejó en la fuerza de la tinción de Wnt-2 dentro de los nevos y los melanomas. De esta manera, el 100% de los melanomas tuvo un valor de Wnt-2 mayor de 0, en comparación con el 32,4% de los nevos (Tabla 7). Ninguno de los melanomas tuvo expresión ausente de Wnt-2 (valor de 0), y ninguno de los nevos mostró tinción fuerte (valor de 3) en su base.

Tabla 7. Inmunotinción de Wnt-2 en la base del melanoma frente a la base del nevo

Valor de Wnt-2	Base del melanoma	Base del nevo
0 (% de casos que expresan valor)	0%	67,6%
>0 (% de casos que expresan valor)	100%	32,4%

También se realizó inmunotinción de Wnt-2 en tres cohortes adicionales, (i) nevos displásicos, (ii) nevos de Spitz, y (iii) neoplasias melanocíticas mal diagnosticadas. Nuestro análisis revela que la expresión diferencial de Wnt-2 observada en las cohortes de nevo puede extenderse específicamente a nevos displásicos ($p < 0,05$) y nevos de Spitz ($p = 0,004$), subtipos de nevo que son notables por la dificultad en distinguirlos de melanoma a nivel histopatológico. En cada uno de estos casos, la inmunotinción de Wnt-2 fue mayor en la zona de unión del nevo que en la base del nevo, hallazgos que son ambos estadísticamente significativos. Finalmente, se analizaron 7 casos en los que se diagnosticó mal una neoplasia melanocítica ambigua en base a la posterior recidiva de la enfermedad (5 casos en los que un diagnóstico de nevo resultó incorrecto) o revisión experta de la patología (2 casos en los que se revocó un diagnóstico de melanoma). En 6 de los 7 casos, el patrón de inmunotinción de Wnt-2 apuntaba al diagnóstico correcto eventual, incluyendo cinco de los casos inicialmente mal diagnosticados como nevo. Estos resultados muestran la capacidad de la inmunotinción de Wnt-2 de ayudar en el diagnóstico de neoplasias melanocíticas ambiguas dada su capacidad de diagnosticar correctamente el 85,7% de dicho casos.

Discusión

En este estudio, se proporcionan evidencias convincentes de la expresión diferencial de Wnt-2 a nivel proteico en la progresión de melanoma. Nuestros resultados indican claramente que Wnt-2 se expresa de forma diferencial en

melanomas en comparación con nevos melanocíticos, tanto en el análisis de microserie tisular así como en el análisis de pares coincidentes, en que cada melanoma se emparejó con su nevo pre-existente. En este último análisis, se descubrió que solamente los melanomas expresaban Wnt-2 de forma elevada en su base, y solamente los nevos demostraron tener expresión ausente de Wnt-2 en su base.

Además, se observó un patrón interesante de expresión de Wnt-2 en los nevos melanocíticos. En todos los casos examinados, la expresión de Wnt-2 fue significativamente inferior en la base del nevo que su zona de unión. Además, la inmunotinción de Wnt-2 estuvo ausente en la base de una parte significativa (55%) de los nevos examinados a través de los estudios de serie y también del análisis de melanoma que surge en un nevo.

Las diferencias significativas en el patrón de tinción de Wnt-2 en nevos frente a melanomas muestran la utilidad de la inmunotinción de Wnt-2 en el diagnóstico molecular de neoplasias melanocíticas ambiguas. Los resultados de las series tisulares de nevo y melanoma muestran una especificidad del 98% para elevada tinción de Wnt-2 en el diagnóstico de melanoma, con una especificidad del 70%. Nuestros datos distinguen entre nevos y melanomas en base al nivel de expresión de Wnt-2. Las lesiones melanocíticas que se tiñen intensamente (valor de 2 ó 3+) en su base tenían elevada probabilidad de ser melanomas (99,6%). Las lesiones que muestran poca tinción en su base (valor de 0 ó 1) eran melanomas el 30% de las veces, produciendo la sensibilidad observada. Sin embargo, estas lesiones se analizarían después en su zona de unión, demostrando los nevos tinción disminuida en las partes más profundas en casi todos los casos, mientras que los melanomas demostraron tinción uniforme entre las zonas de unión y más profundas. Hasta la fecha, aunque se han analizado marcadores de proliferación de células tumorales (tales como Ki-67; véase Smolle, J. et al., *Am J Dermatopathol*, 1989, 11:301-307; Rieger, E. et al., *J Cutan Pathol*, 1993, 20:229-236; Kaleem, Z. et al., *Mod Pathol*, 2000, 13:217-222) para su papel en este dilema de diagnóstico diferencial, ningún marcador ha demostrado mostrar una marcada diferencia en la expresión entre nevo y melanoma que sea clínicamente útil.

La disminución en la inmunotinción observada con Wnt-2 se ha observado con unos pocos marcadores diferentes, incluyendo S100A6, Melan-A, y HMB-45 (véase Fullen, D.R. et al., *J Cutan Pathol*, 2001, 28:393-399; Busam, K.J. et al., *Am J Surg Pathol*, 1998, 22:976-982; Kucher, C. et al., *Am J Dermatopathol*, 2004, 26:452-457). Sin embargo, estos marcadores no se utilizan de forma rutinaria para distinguir entre nevos y melanomas primarios. Además, en algunos de estos estudios, los nevos intradérmicos eran el tipo dominante de nevo examinado. Se sabe que los nevos intradérmicos experimentan maduración significativa en su base. En nuestro estudio, cuando se desglosa por subtipo de nevo, no había regulación negativa significativa de la inmunotinción de Wnt-2 en la base de los nevos intradérmicos, los nevos compuestos (en general), así como los nevos compuestos adquiridos displásicos y nevos de Spitz, que pueden no tener el mismo patrón de maduración. Esto demuestra una utilidad de base más amplia de Wnt-2 que un marcador de diagnóstico molecular para melanoma.

Los resultados de microserie de ADNc descritos en esta invención también permiten distinguir marcadores de diagnóstico frente a pronósticos en melanoma. El perfilado de expresión génica reveló que las distintas características de expresión génica caracterizaban la transición de nevo a melanoma primario como el de melanoma primario a metastásico (véase Haq C. et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 6092-6097). Por consiguiente, los marcadores que se expresaban de forma diferencial en la transición de nevo a melanoma pueden ser más útiles como marcadores de diagnóstico, mientras que los marcadores identificados en la transición de primario a metastásico pueden ser más útiles como marcadores pronósticos. Esto está apoyado por los resultados de inmunotinción de Wnt-2 que sugieren su mayor utilidad como marcador de diagnóstico en lugar de como marcador pronóstico. Aunque había una diferencia significativa en la inmunotinción de Wnt-2 entre nevos y melanomas, no hubo asociación significativa entre la expresión de Wnt-2 y varios marcadores pronósticos conocidos para melanoma.

Para analizar el potencial beneficio terapéutico de abordar Wnt-2 para la progresión metastásica, se analizó la eficacia anti-tumoral del suministro sistémico de una ribozima en cabeza de martillo dirigida contra Wnt-2 murino contra melanoma B16. Se inyectaron células B16 por vía intravenosa en ratones C57B1/6, y los ratones se trataron con un vector vacío de control o un vector plasmídico que expresaba la ribozima anti-Wnt-2 7 días después de la inyección de las células tumorales. La carga metastásica se evaluó por la cantidad de tumores pulmonares metastásicos tras el sacrificio. Como se muestra en la Figura 10, una única inyección de la construcción que expresa la ribozima anti-Wnt-2 provocó una supresión significativa de tumores pulmonares grandes (> 2mm), dependientes de angiogénesis. Estos estudios apoyan el papel del direccionamiento de Wnt-2 en la supresión de la progresión metastásica.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran la importancia de Wnt-2 para la transformación de los melanocitos. Aunque parece que la activación de la vía WNT sucede pronto en el desarrollo del melanoma, los datos de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que la expresión de Wnt-2 es necesaria para la continua supervivencia y proliferación de las células de melanoma. El direccionamiento basado tanto en anticuerpo como en ARNip de Wnt-2 provocó la inducción de apoptosis de varias líneas celulares de melanoma *in vitro*, y la supresión significativa del crecimiento de xenoinjertos *in vivo*. Los estudios preliminares obtenidos en nuestro laboratorio también sugieren la necesidad de la expresión de Wnt-2 en la progresión metastásica de melanoma en modelos murinos (véase la Figura 10 anterior). Por tanto, estos resultados sugieren la potencial utilidad terapéutica del direccionamiento de

Wnt-2 como estrategia terapéutica racional para melanoma. Y el ensayo de inmunotinción usado aquí puede ayudar en la identificación de una cohorte de pacientes elegible para un enfoque terapéutico dirigido con inhibidores específicos de Wnt-2.

- 5 En conclusión, nuestros estudios demuestran la expresión diferencial de la vía WNT en melanomas frente a nevus, confirmando los resultados obtenidos previamente del perfilado de expresión génica de neoplasias melanocíticas. Además, confirman la importancia de la activación WNT-2 en la progresión de melanoma. Finalmente, muestran la utilidad de Wnt-2 como un nuevo biomarcador para melanoma y como una diana potencial para terapia.

10 EJEMPLO 4: Papel de la osteopontina en melanoma

También se examinó el papel pronóstico de la expresión de osteopontina en melanoma. Se evaluó la inmunotinción de OPN en una microserie tisular que contenía 350 muestras de melanoma primario que experimentaron biopsia del ganglio linfático centinela, con dos años de seguimiento, o con recidiva documentada. Se registró la expresión de OPN como 0 (ausente), 1 (débil), 2 (moderada), y 3 (intensa). Por análisis de una variable, se correlacionó la expresión creciente de OPN con riesgo aumentado de metástasis al SLN (determinado por regresión lógica), así como supervivencia reducida sin recidiva (RFS) y global (OS), determinada por análisis de Kaplan-Meier. Por análisis de regresión lógica de múltiples variables, la expresión creciente de OPN (definida como un valor de 0 frente a 1, 2, y 3) fue independientemente predictiva de metástasis al SLN con la inclusión de otros 6 marcadores pronósticos conocidos para melanoma. Por análisis de regresión de Cox de múltiples variables, la elevada expresión de OPN (definida como un valor de 0 y 1 frente a 2 y 3) fue independientemente predictiva de supervivencia reducida sin recidiva y global (véanse las siguientes Tablas 8 y 9). Estos resultados identifican a OPN como un nuevo marcador independiente de pronóstico de melanoma dado su papel en la predicción del estado del SLN, la RFS, y la OS.

25 Tabla 8. Análisis de regresión lógica del impacto de factores clínicos, histológicos y moleculares sobre metástasis al SLN

Factor pronóstico		ji cuadrado	Valor P
30	Edad decreciente	15,35	< 0,001
	Grosor del tumor	10,70	0,001
	Expresión de OPN (1,2,3 frente a 0)	7,60	0,006
	Nivel de Clark	1,82	0,18
	Sexo	1,81	0,18
	Sitio	0,80	0,37
35	Ulceración	0,43	0,51

Tabla 9. Análisis de regresión de Cox del impacto de factores clínicos, histológicos y moleculares sobre la OS de la cohorte de melanoma

Factor pronóstico		Proporción de riesgo	ji cuadrado	Valor P
40	Nivel de OPN (2,3 frente a 0,1)	1,60	6,37	0,012
	Nivel de Clark	1,68	5,84	0,016
	Ulceración	1,55	5,77	0,016
	Grosor del tumor	1,29	5,03	0,025
	Sitio	1,44	3,53	0,06
45	Edad	1,06	1,29	0,26
	Sexo	1,065	0,10	0,75

EJEMPLO 5: Cantidad de copias de NCOA3 en melanoma

50 También se determinó la cantidad de copias de NCOA3 en melanoma por hibridación in situ de fluorescencia (FISH). Se desarrolló un ensayo FISH para detectar la expresión de NCOA3 y se analizaron 4 casos de melanoma que mostraron sobreexpresión de NCOA3. El análisis de estos casos por FISH mostró que cada uno de los casos tenía elevadas cantidades de copias del gen NCOA3 (Figura 14). Ésta es la primera demostración de que está presente una elevada cantidad de copias del gen NCOA3 en melanoma.

55 EJEMPLO 6: Expresión de RGS1 en melanoma

Se examinó el impacto pronóstico de la expresión de RGS1 sobre el desenlace de melanoma en una microserie tisular de 301 pacientes. La expresión de RGS1 se determinó usando análisis inmunohistoquímico de muestras tumorales archivadas de melanoma primario, y se valoró en una escala de cuatro puntos (0-3) en base a la intensidad de tinción por un patólogo sin acceso a los resultados de los pacientes.

Se correlacionó la elevada expresión de RGS1 con el grosor creciente del tumor. En tumores con un valor de RGS1 de 0, el grosor medio del tumor fue de 2,2 mm, que aumentó hasta 4,09 mm en tumores con un valor de más de 0 (P < 0,00005, ensayo T). Además, la expresión creciente de RGS1 se correlacionó con vascularidad creciente del

tumor ($P=0,045$). La expresión creciente de RGS1 se correlacionó significativamente con el estado del SLN por análisis de regresión lógica de una variable ($P=0,04$, estadística de ji cuadrado 4,12). La expresión creciente de RGS1 también se correlacionó con carga creciente del SLN, determinada por la cantidad media de SLN positivos. Por tanto, en pacientes con un valor de RGS1 de 0, la cantidad media de SLN positivos fue de 0,118, que aumentó hasta 0,415 en casos con un valor de 1 ó 2 y hasta 0,723 en casos con un valor de 3 ($P=0,0055$ por ANOVA). Por análisis de Kaplan-Meier, se asoció una elevada expresión de RGS1 (definida como un valor de 2 ó 3) con una supervivencia significativamente empeorada específica de la enfermedad (DSS) en comparación con casos con baja expresión de RGS1 (valor de 0 ó 1) ($P=0,018$, ensayo de rango log).

El análisis de regresión de Cox de múltiples variables mostró a RGS1 como un indicador independiente significativo del desenlace asociado con melanoma determinado por análisis de supervivencia sin recidiva (Tabla 10), global (Tabla 11), y específica de la enfermedad (Tabla 12). Por regresión de Cox por etapas, el nivel de Clark, la ulceración, y la expresión de RGS1 permanecieron significativamente predictivos de RFS. Por regresión de Cox por etapas, el nivel de Clark, la ulceración, el sitio, y la expresión de RGS1 permanecieron significativamente predictivos de la OS. Por regresión de Cox por etapas, el grosor y la expresión de RGS1 permanecieron significativamente predictivos de la DSS. Con la inclusión de 12 factores pronósticos histológicos o clínicos, la expresión de RGS1 fue un indicador independiente de RFS ($P=0,04$), OS ($P=0,036$), y DSS ($P=0,01$) en análisis de regresión de Cox por etapas. Estos resultados establecen a RGS1 como un nuevo factor pronóstico independiente para melanoma.

Tabla 10. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la supervivencia sin recidiva (RFS) de la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	PROPORCIÓN DE RIESGO	JI CUADRADO	VALOR P
Nivel de Clark	1,97	22,9	< 0,00005
Ulceración	2,01	14,2	0,0002
Nivel de RGS (0,1,2,3)	1,30	6,65	0,0099
Sitio	1,29	2,01	0,16
Edad	0,94	1,25	0,26
Sexo	1,22	1,12	0,29
Grosor del tumor	1,12	0,87	0,35

Tabla 11. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la supervivencia global de la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	PROPORCIÓN DE RIESGO	JI CUADRADO	VALOR P
Nivel de Clark	1,43	5,25	0,022
Ulceración	1,72	6,98	0,0083
Nivel de RGS (0,1,2,3)	1,34	6,63	0,01
Sitio	1,49	3,71	0,054
Edad	1,06	0,98	0,32
Grosor del tumor	1,24	2,69	0,10
Sexo	1,31	1,54	0,22

Tabla 12. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la supervivencia específica de la enfermedad de la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	PROPORCIÓN DE RIESGO	JI CUADRADO	VALOR P
Nivel de RGS (0,1,2,3)	1,43	7,09	0,0077
Nivel de Clark	1,52	5,47	0,019
Ulceración	1,54	3,30	0,069
Grosor del tumor	1,29	2,74	0,098
Sitio	1,29	1,22	0,27
Sexo	1,23	0,71	0,40
Edad	0,98	0,05	0,82

EJEMPLO COMPARATIVO 7: Ensayo de dos y tres marcadores para el pronóstico

Se analizó el impacto de la expresión combinada de marcadores sobre el desenlace de melanoma. Para empezar, se examinó la positividad del SLN en 309 muestras de melanoma primario en las que estaba disponible la expresión de marcadores tanto para NCOA3 como para SPP1. La expresión de NCOA3 y SPP1 se graduó como alta o baja en base a umbrales óptimos establecidos mediante regresión lógica. La alta expresión de NCOA3 se definió como un valor de 2 y 3, mientras que la alta expresión de SPP1 se definió como un valor mayor de 0. En casos con bajos valores para ambos marcadores, existió positividad del SLN en el 0% del tiempo; esto aumentó hasta el 12,5% en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, hasta el 26,7% en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y hasta el 37,0% en casos con altos valores para ambos marcadores. El impacto gradual de la expresión de marcadores sobre el estado del SLN fue elevadamente significativo (valor P bilateral 0,0007). Además, la cantidad creciente de marcadores sobreexpresados fue significativamente predictiva del estado del SLN determinado por análisis de regresión lógica

de una variable (estadística ji cuadrado 14,7, $P=0,0001$). Una análisis de regresión lógica de una variable que analiza la cantidad de marcadores altamente expresados (0,1 ó 2) mostró un impacto significativo sobre el estado del SLN con sobreexpresión creciente de marcadores ($P=0,0004$). Después, se examinó el impacto de la expresión combinada de marcadores sobre la carga tumoral del SLN, determinada por la cantidad media de SLN positivos. En

casos con bajos valores para ambos marcadores, la cantidad media de SLN positivos fue 0; esto aumentó hasta el 0,25% en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, hasta el 0,38 en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y hasta el 0,63 en casos con altos valores para ambos marcadores. El impacto gradual de la expresión de marcadores sobre la carga tumoral del SLN también fue significativa (ensayo de Kruskal-Wallis no direccional 0,01; ensayo de trascendencia direccional de Le 0,0066).

A continuación, se examinó el impacto de la expresión combinada de marcadores sobre la supervivencia sin recidiva (RFS) de melanoma en esta cohorte. En casos con bajos valores para ambos marcadores, la RFS media fue de 0,45 años; esto aumentó hasta 0,50 en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, hasta 0,55 en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y hasta 0,56 en casos con altos valores para ambos marcadores (ensayo de trascendencia direccional de Le 0,0091). Además, la cantidad creciente de marcadores sobreexpresados fue significativamente predictiva de RFS determinada por análisis de regresión de Cox de una variable ($P=0,017$). Asimismo, hubo un impacto sobre la supervivencia global (OS) cuando se combinaron datos de marcadores. En casos con bajos valores para ambos marcadores, la OS media fue de 0,47 años; esto aumentó hasta 0,51 en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, hasta 0,55 en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y hasta 0,57 en casos con altos valores para ambos marcadores (ensayo de trascendencia direccional de Le 0,018). Finalmente, hubo un impacto sobre la supervivencia específica de la enfermedad (DSS) cuando se combinaron los valores de expresión de los marcadores. De esta manera, en casos con bajos valores para ambos marcadores, la DSS media fue de 0,47 años; esto aumentó hasta 0,52 en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, hasta 0,52 en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y hasta 0,60 en casos con altos valores para ambos marcadores (Valor P 0,04 ANOVA, ensayo de trascendencia direccional de Le 0,0069).

Además, la cantidad creciente de marcadores sobreexpresados fue significativamente predictiva de DSS determinada por análisis de regresión de Cox de una variable ($P=0,013$).

Finalmente, se analizó el impacto de los valores combinados de expresión de marcadores usando análisis de múltiples variables. El impacto de los datos combinados de expresión de marcadores sobre estado del SLN se analizó usando regresión lógica. Este análisis mostró que el estado combinado de NCOA3/SPP1 es el mejor factor que determina el estado del SLN, superando los marcadores histológicos rutinarios (Tabla 13 a continuación). Por análisis de la regresión por etapas, solamente el estado combinado de NCOA3/SPP1 ($P=0,0013$), el grosor del tumor ($P=0,0016$), y la implicación vascular ($P=0,039$) fueron significativamente predictivos del estado del SLN.

Cuando se usan múltiples marcadores, pueden aplicarse los reactivos para estos marcadores y examinarse simultáneamente, o secuencialmente, o ambas. Cuando se usan múltiples marcadores, la etapa de determinar la cantidad de expresión puede verse afectada para los marcadores simultáneamente, secuencialmente o ambas.

Tabla 13. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre el estado del SLN de la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	JI CUADRADO	VALOR P (BILATERAL)
Nivel combinado de NCOA3/SPP1	9,08	0,0026
Implicación vascular	6,05	0,014
Grosor del tumor	3,95	0,047
Nivel de Clark	2,89	0,089
Regresión	2,71	0,10
Microsatélites	1,38	0,24
Ulceración	0,36	0,55
Tasa mitótica	0,34	0,56
Vascularidad tumoral	0,0024	0,96

El impacto del valor combinado de la expresión de marcadores sobre la RFS se examinó usando regresión de Cox de múltiples variables. Por análisis de la regresión por etapas, el estado combinado de NCOA3/SPP1 ($P=0,02$), el nivel de Clark ($P=0,0002$), la ulceración ($P< 0,00005$), la tasa mitótica ($P=0,0003$), y los microsatélites ($P< 0,00005$) fueron significativamente predictivos del estado del SLN.

Finalmente, el impacto del valor combinado de la expresión de marcadores sobre la DSS también se examinó usando regresión de Cox de múltiples variables. Este análisis demostró que el estado combinado de NCOA3/SPP1 es un factor independiente que determina la DSS cuando se incluían 9 factores histológicos en el modelo (Tabla 14 a continuación). Por análisis de regresión de Cox por etapas, los microsatélites ($P=0,0001$), la tasa mitótica ($P=0,0002$), la ulceración ($P=0,0066$), y el estado combinado de NCOA3/SPP1 ($P=0,029$) permanecieron significativamente predictivos de DSS. Estos resultados establecen la trascendencia del impacto pronóstico de combinar valores de expresión de marcadores y demuestran la utilidad de un ensayo pronóstico de múltiples marcadores para melanoma dado su impacto independiente sobre el estado del SLN, la RFS, y la DSS. RGS1 también se ensayó en un ensayo de tres marcadores con NCOA3/SPP1, mostrando los resultados preliminares un impacto significativo sobre la DSS (Tabla 15).

Tabla 14. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la DSS de la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	PROPORCIÓN DE RIESGO	JI CUADRADO	VALOR P (BILATERAL)
Microsatélites	3,77	14,2	0,0002
Tasa mitótica	1,89	5,68	0,017
Nivel combinado de NCOA3/SPP1	1,69	4,32	0,038
Nivel de Clark	1,69	2,80	0,09
Implicación vascular	1,25	0,60	0,44
Regresión	0,44	2,35	0,44
Ulceración	1,22	0,45	0,50
Grosor del tumor	1,10	0,36	0,55
Vascularidad tumoral	1,18	0,33	0,57

Tabla 15. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la DSS de la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	PROPORCIÓN DE RIESGO	JI CUADRADO	VALOR P (BILATERAL)
Nivel combinado de NCOA3/SPP1/RGS1	3,33	7,48	.0062
estado del SLN	1,80	3,93	.047
Grosor del tumor	1,50	3,34	.068
Nivel de Clark	1,41	2,24	.13
Ulceración	1,22	.38	.54
Género	1,14	.20	.66
Edad	1,04	.17	.68
Localización	.96	.02	.88

EJEMPLO COMPARATIVO 8: Un ensayo de múltiples marcadores para distinguir nevos benignos de melanomas malignos

Introducción

Este ejemplo demuestra el uso de análisis inmunohistoquímico tanto para verificar las diferencias en la expresión génica observada a nivel de ARN como para ensayar el valor diagnóstico de este análisis en el diagnóstico diferencia de nevo frente a melanoma.

Métodos

Pacientes de estudio: Se construyeron varios conjuntos de datos, compuestos por 699 neoplasias melanocíticas, para los análisis realizados en este estudio: un conjunto de capacitación, que consta de una microserie tisular (TMA) de 119 nevos benignos y 421 melanomas primarios, y cuatro conjuntos de validación: secciones tisulares de 38 melanomas que surgen en un nevo (produciendo 75 neoplasias melanocíticas evaluables); 39 nevos displásicos; 21 nevos de Spitz; y 24 neoplasias melanocíticas inicialmente mal diagnosticadas. La composición del conjunto de capacitación de 119 nevos en las TMA estudiadas fue la siguiente: 31 nevos intradérmicos congénitos; 29 nevos intradérmicos adquiridos; 21 nevos displásicos adquiridos; 18 nevos compuestos congénitos; 15 nevos compuestos adquiridos; 4 nevos de unión; y 1 nevo no clasificado. Los subtipos histológicos de los 421 melanomas primarios incluidos en las TMA de capacitación son los siguientes: 202 melanomas de propagación superficial; 135 melanomas nodulares; 23 melanomas acrales; 18 melanomas léntigo malignos; 16 melanomas desmoplásicos; y 27 melanomas no clasificados de otro modo. En el conjunto tisular que contiene melanomas primarios que surgen en asociación con un nevo, el desglose de los subtipos histológicos para nevo y melanoma es el siguiente: 22 nevos congénitos; 8 nevos adquiridos; 3 nevos displásicos adquiridos; 1 nevo compuesto adquirido; 1 nevo intradérmico adquirido; 1 nevo displásico congénito; 1 nevo compuesto congénito; 1 nevo intradérmico congénito; 23 melanomas de propagación superficial; 7 melanomas nodulares; y 7 melanomas no clasificados de otro modo.

Series tisulares: Las microseries tisulares se generaron de acuerdo con el método descrito por Kononen J, et al., Nat Med, 1998, 4:844-7; y Kashani-Sabet M, et al., J Clin Oncol, 2004, 22:617-23. Se creó un total de 16 serie de melanoma y un total de 4 series de nevo con un promedio de aproximadamente 40 núcleos de tejido por serie. Las series de melanoma incluyeron un total de 673 núcleos de tejido (457 melanomas primarios con núcleos duplicados para 150 pacientes). Las series de nevo incluyeron un total de 138 núcleos de tejido.

Inmunohistoquímica: Se hornearon los portaobjetos a 60°C durante 30 min. antes de la tinción, y se desparafinizaron y se rehidrataron por aclarado en xileno. Los portaobjetos después se sometieron a microondas en tampón citrato 10 mM. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3%. En el caso de WNT2, después de lavar con PBS, los portaobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con suero normal de conejo para reducir la tinción de fondo no específica, y después se calentaron con PBS. En el caso de FN1, los portaobjetos se incubaron secuencialmente con los reactivos de bloqueo Avidina y Biotina. El anticuerpo primario [IgG policlonal de cabra anti-WNT2 (Biovision, dilución 1:5); IgG policlonal de conejo anti-SPP1 (Abcam, dilución 1:200); IgG policlonal de conejo anti-FN1 (Dako, dilución 1:400); IgG policlonal de conejo anti-ARPC2 (Upstate,

dilución 1:50); e IgG de pollo anti-RGS1 (GeneTex, dilución 1:100 para TMA y dilución 1:50 para secciones tisulares)] se añadió después y se incubó durante una noche a 4°C. Se usó anticuerpo biotinilado de cabra anti-IgG de conejo, anti-IgG de pollo o de conejo anti-IgG de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) como anticuerpo secundario para amplificación, seguido de incubación con ABC-HRP (Vector Laboratories) durante 30 min., y solución de DAB/peróxido de hidrógeno (Sigma). Los portaobjetos se tiñeron con contraste con hematoxilina y se montaron con permount. Excepto donde se indica, se utilizó el mismo protocolo de tinción inmunohistoquímica para portaobjetos de serie tisular y secciones rutinarias.

Evaluación de la tinción inmunohistoquímica: Las regiones de tinción más intensa se valoraron para cada núcleo de serie tisular y sección tisular. La expresión de las proteínas marcadoras se graduó sobre la intensidad celular usando la siguiente escala: sin tinción (0), tinción débil (1), tinción moderada (2), y tinción intensa (3). La intensidad de la expresión de marcador se valoró tanto en la unión entre la epidermis y la dermis (zona de unión, o "superior") de la neoplasia así como en su base ("inferior"). Las localizaciones de "superior" e "inferior" en términos de tumor se refieren a la parte superior del tumor de crecimiento vertical (invasivo) y el área más profunda de la invasión tumoral, respectivamente. En términos de los nevos asociados, se identificaron y registraron tres tipos convencionales de nevos (véase, por ejemplo, Sagebiel R.W., J Invest Dermatol, 1993;100:322S-325S para la clasificación). En nevos de patrón congénito, la parte superior se registró en la región de unión y/o dérmica papilar y la parte inferior en el nevo identificado más profundo en la dermis reticular. En nevos de patrón adquirido, la parte superior se registró en la región de unión y la parte inferior en el nevo identificado más profundo en la dermis papilar. Asimismo, en nevos displásicos, el crecimiento lateral adyacente al nevo precursor caracteriza la atipia aleatoria y los cambios en la arquitectura de displasia, y la parte superior se registró en la región de unión y la parte inferior en el nevo identificado más profundo en la dermis papilar y/o la dermis reticular. Las muestras sin melanoma o nevo se excluyeron del análisis. Las muestras que no eran interpretables debido a tinción insuficiente o ausencia de características de arquitectura se trataron como observaciones desaparecidas. Las series y secciones se valoraron por un patólogo sin acceso a la identidad de las lesiones con dos valoraciones diferentes y un valor consenso determinado para valoraciones discrepante para todos los marcadores. Los controles positivos externos de especificidad para los diversos anticuerpos fueron los siguientes: tumor mamario (WNT2, SPP1); líneas celulares de melanoma LOX y FEM (WNT2, ARPC2, SPP1); secciones tisulares de melanoma (WNT2, FN1, ARPC2, RGS1, SPP1); riñón normal (FN1); timo (RGS1) y linfoma no Hodgkin (RGS1). El control negativo técnico usado para inmunohistoquímica incluyó el uso de solución salina tamponada con fosfato en lugar de anticuerpo primario, con todas las demás condiciones mantenidas iguales.

Análisis estadístico: La eficacia diagnóstica de cada intensidad de marcador (en la base de la neoplasia melanocítica) se evaluó con regresión lógica de una variable. La eficacia diagnóstica de la intensidad de la combinación de los cinco marcadores se evaluó con regresión lógica de múltiples variables. Para el ensayo de múltiples marcadores, la eficacia diagnóstica se analizó usando curvas de características de funcionamiento de receptor (ROC) y se calculó el área bajo la curva ROC. Se calcularon las proporciones de especificidad y sensibilidad y se analizaron usando el ensayo exacto de Fisher. La diferencia entre la intensidad de la inmunotinción del marcador en la base del nevo y en la base del melanoma se ensayó para cada marcador usando el ensayo de Mann-Whitney. La diferencia entre la intensidad de inmunotinción del marcador en la zona de unión de lesión y la base de la lesión también se ensayó para cada marcador usando el ensayo de Mann-Whitney. Todos los valores P presentados son dobles.

Para evaluar la fiabilidad de los valores de expresión de marcadores, los valores de intensidad de WNT2 se compararon con la intensidad densitométrica media (derivada de un análisis cuantitativo de imágenes) para cada caso en el conjunto de capacitación. Inicialmente, se identificaron cuatro intervalos secuenciales de la intensidad densitométrica media que correspondían muy estrechamente con la escala de expresión de marcadores de 0-3. Entonces, la concordancia entre los valores de expresión del marcador WNT2 y su intensidad densitométrica media (cuando ambos están disponibles) se definió como el porcentaje de lesiones en las que tanto la intensidad de la expresión del marcador como la intensidad densitométrica media eran diagnósticamente equivalentes. Se definió una concordancia de porcentaje similar para los valores de WNT2 y se computó para diferencias en valores de expresión "superior-a-inferior".

En base a los datos de las 540 lesiones en el conjunto de capacitación, se obtuvieron algoritmos de diagnóstico de MDMS (Surprise, AZ). Estos algoritmos primero confirmaron una lesión con características displásicas o Spitzoides como un nevo displásico o de Spitz, y después diagnosticaron todas las lesiones no confirmadas como un tipo diferente de nevo benigno o un melanoma. Se obtuvieron algoritmos de diagnóstico diferentes para valores de diferencia "superior-a-inferior", por sí mismos, y para valores de diferencia "superior-a-inferior" combinados con valores de intensidad de expresión. El algoritmo de diagnóstico final que abarca cada uno de estos algoritmos aparece en la Figura 2. Este algoritmo de diagnóstico final se aplicó a las lesiones en los cuatro conjuntos de validación.

Resultados

A continuación se confirmó la expresión proteica diferencial de varios de los transcritos correspondientes identificados en nuestro estudio previo y se examinó la utilidad de un ensayo de diagnóstico de múltiples marcadores

para melanoma en una cohorte independiente más grande de neoplasias melanocíticas. Para este fin, acumulamos un conjunto de tejidos de 699 neoplasias melanocíticas, que comprende un conjunto de capacitación de TMA con 540 melanomas primarios y nevos melanocíticos, y cuatro conjuntos de validación que comprenden secciones tisulares de 159 neoplasias melanocíticas relevantes para el diagnóstico diferencial de nevo frente a melanoma.

Inicialmente se analizó la expresión de cinco marcadores seleccionados (ARC2, FN1, RGS1, SPP1, y WNT2) en el conjunto de capacitación usando anticuerpos disponibles en el mercado dirigidos contra las proteínas mencionadas anteriormente. Cada marcador se valoró en una escala de cuatro puntos para la intensidad de tinción.

En el proceso para optimizar la tinción inmunohistoquímica de los marcadores, se observó un patrón de tinción intrigante en nevos benignos. Los nevos benignos mostraron una tinción sistemáticamente más fuerte en la zona de unión del nevo, con pérdida de expresión en la base del nevo. Por el contrario, la expresión de los marcadores fue más uniforme en las partes invasivas de los melanomas en la comparación entre la zona de unión de la lesión y la base. Como resultado, se valoraron las TMA para la intensidad de expresión tanto en la zona de unión ("superior") así como en la base ("inferior") de cada neoplasia melanocítica en que la orientación de la lesión era claramente demostrable en el núcleo de muestra representado en las series.

Inicialmente, cada uno de los cinco marcadores se evaluó individualmente para su capacidad de diagnosticar melanoma frente a nevo, usando la escala de intensidad de cuatro puntos aplicada a la base de cada lesión. Se identificó el mejor modo de dividir la escala de cuatro puntos de cada marcador (mostrado en la Tabla 16). El mejor método de división de escala se definió como el que maximizaba el valor ji cuadrado resultante asociado con su análisis de regresión lógica de una variable. También se evaluó la capacidad de cada marcador dividido de forma óptima de discriminar entre nevos y melanomas de acuerdo con sus proporciones de sensibilidad y especificidad diagnósticas. Cada uno de los cinco marcadores moleculares demostró sobreexpresarse significativamente en melanomas en comparación con nevos (Tabla 16).

Se realizaron varios análisis para examinar si la combinación de marcadores era útil en su capacidad para diagnosticar melanoma. Específicamente, se examinó un análisis centrado en la intensidad de los valores de intensidad de expresión inferiores en solitario, uno centrado en la diferencia en la expresión entre la zona de unión de la lesión y la base (análisis "superior-a-inferior"), y un tercer análisis que abarca ambos tipos de datos.

Para empezar, se realizó un análisis que examinaba los valores de intensidad de expresión asignados a la base de cada lesión para los cinco marcadores combinados. Los valores de expresión de marcadores óptimamente divididos se combinaron mediante regresión lógica múltiple, y se asignó una probabilidad de ser maligna a cada una de las lesiones para las cuales había datos completos disponibles. Las probabilidades asignadas después se dividieron en su punto óptimo de separación, consiguiendo una especificidad del 93,6% y una sensibilidad del 75,8% ($P < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher). Además, se construyó una curva de características funcionales del receptor (ROC) para este análisis de múltiples marcadores y se muestra en la Figura 1, con un área asociada bajo la curva (AUC) de 0,9105.

Por motivos ilustrativos, se replicó el análisis para cada uno de los marcadores individualmente, y para combinaciones de 3 marcadores. El análisis de un único marcador (por ejemplo, FN1) mostró la AUC más pequeña de 0,5622, que aumentó a un nivel intermedio de 0,7036, cuando se incluían dos marcadores adicionales (ARPC2 y SPP1), culminando en la AUC de 0,9105, cuando se incluían los cinco marcadores en el modelo.

En segundo lugar, se realizó un análisis utilizando solamente las diferencias en la expresión de marcador "superior-a-inferior" para los cinco marcadores. El análisis de la expresión de marcadores en la zona de unión de la lesión frente a la base mostró que los nevos perdían expresión de forma constante para cada uno de los cinco marcadores en comparación con melanomas, en que la inmunotinción del marcador era mucho más uniforme. Este patrón de expresión de marcador "superior-a-inferior" notablemente diferente entre nevos y melanomas se replicó para cada uno de los cinco marcadores, cuando se analizaron por el ensayo de Mann Whitney (datos no mostrados), con especificidad y sensibilidad para cada marcador indicadas en la Tabla 17. De hecho, en el caso de un marcador, WNT2, hubo separación perfecta de las dos distribuciones de valores de diferencia "superior-a-inferior" entre nevos y melanomas en las 144 lesiones analizadas. Por tanto, cada nevo analizado perdió expresión desde su zona de unión hasta su base, mientras que cada melanoma tenía expresión uniforme desde la zona de unión hasta su base. Esta perfecta discriminación entre nevo y melanoma en el caso de WNT2 hizo imposible confiar más en la regresión lógica como herramienta analítica única. El procedimiento de estimación de regresión lógica no puede producir estimaciones de probabilidad máximas de los coeficientes de regresión frente a dicha perfecta discriminación. Por tanto, para analizar la validez diagnóstica del patrón de expresión de marcadores, cuando se combinaban los cinco marcadores, se obtuvo un algoritmo de diagnóstico que constaba de 14 criterios discriminatorios. Los primeros cuatro criterios estaban centrados en confirmar (o no) si una lesión con características displásicas realmente era un nevo displásico. Los diez criterios restantes estaban centrados en la diferencia en los valores de expresión vertical de lesiones no displásicas determinadas direccionalmente coherentes por el ensayo de Mann Whitney referenciado anteriormente. La aplicación de este algoritmo de diagnóstico a las 540 lesiones en el conjunto de capacitación produjo una especificidad del 84,6% y una sensibilidad del 98,7% ($P < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher).

Para abordar la fiabilidad de los valores de expresión y las diferencias "superior-a-inferior", se realizó un análisis de imágenes cuantitativo. Las lesiones teñidas para WNT2 en el conjunto de capacitación se exploraron digitalmente y se calculó la intensidad densitométrica media para cada lesión. La concordancia entre la escala de intensidad de marcadores y la intensidad densitométrica media fue del 90,3% cuando se calculaba como el porcentaje de lesiones diagnosticadas de forma idéntica, usando umbrales correspondientes para diagnosticar melanoma ($P < 0,00005$, ensayo de Mann Whitney). También se evaluó la concordancia en las diferencias en los valores de expresión "superior-a-inferior", y se observó una concordancia del 98,4% entre los valores de intensidad de marcadores y el análisis densitométrico medio ($P < 0,00005$, ensayo de Mann Whitney). El análisis de la regresión lógica de los valores de intensidad densitométrica media en solitario reprodujo la precisión diagnóstica de WNT2 ($P < 0,00005$) identificada por valores de intensidad de marcadores. Además, un análisis "superior-a-inferior" de valores de intensidad densitométrica media de WNT2 mostró una especificidad del 97,1%, con una sensibilidad del 96,6%, lo que reproduce los resultados hallados por los valores de expresión de marcadores.

Finalmente, aspiramos a explorar la utilidad del ensayo de múltiples marcadores para diagnosticar melanoma usando tanto valores de expresión de marcadores así como las diferencias "superior-a-inferior". Una vez más, dada la perfecta separación en los valores de expresión vertical para WNT2, fuimos incapaces de usar regresión lógica. Por tanto, se obtuvo un algoritmo usando tanto datos de los valores de intensidad de expresión así como la expresión diferencial en la zona de unión de la lesión frente a la base (mostrada en la Figura 2) para discriminar entre nevo y melanoma. Curiosamente, cuando se examinó la expresión de marcadores en los nevos, los 21 nevos displásicos incluidos en el conjunto de capacitación fueron identificables justo en base a sus valores de intensidad de expresión de ARPC2 y FN1. Por lo tanto se desarrolló un algoritmo diferente para confirmar como realmente displásicos todos los nevos con características displásicas. Este algoritmo confirmatorio contenía cuatro criterios de discriminación basados en la intensidad de expresión de ARPC2 y FN1. El algoritmo para nevos displásicos entonces se combinó con un algoritmo basado en diferencias "superior-a-inferior", así como en valores de expresión de marcadores. La aplicación de este algoritmo final de diagnóstico al conjunto de capacitación consiguió una especificidad del 94,9% y una sensibilidad del 90,6% en el diagnóstico de melanoma ($P < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher). Se realizaron análisis adicionales usando este algoritmo de diagnóstico solo.

Para validar el ensayo de múltiples marcadores desarrollado en el conjunto de capacitación, se examinaron tanto la intensidad como el patrón de expresión de los cinco marcadores para su expresión en cuatro conjuntos distintos de validación con mayor relevancia para la distinción histológica entre nevo y melanoma. En las TMA habíamos aspirado a acumular una gran cohorte de neoplasias melanocíticas, tanto para validar la expresión diferencial de los marcadores derivados del análisis de microserie de ADNc así como para examinar la utilidad de nuestro ensayo de múltiples marcadores. Sin embargo, ciertos subtipos de nevo no presentan un dilema de diagnóstico diferencial, y ciertos subtipos de melanoma no surgen de nevos pre-existentes.

Para validar nuestros resultados a partir del conjunto de capacitación, un entorno óptimo para evaluar las diferencias potenciales en la expresión fue los casos de melanoma que surgen en asociación con nevos pre-existentes, para los cuales se controlan automáticamente muchos factores de desviación potenciales (edad, género, localización anatómica, y subtipo histológicos potencialmente irrelevantes de nevo y melanoma, entre otros). De esta manera, se acumuló un conjunto de validación de 38 casos de melanoma primario en asociación con un nevo, resultante en 75 neoplasias melanocíticas evaluables. Además, se recogieron dos conjuntos de validación adicionales directamente relevantes para este diagnóstico histológico diferencial: 21 casos de nevo de Spitz; y 39 casos de nevo displásico. Éstos son los dos subtipos problemáticos de nevo más habituales en el diagnóstico diferencial histológico de nevo frente a melanoma. Finalmente, se examinó la expresión de marcadores en un conjunto de datos de 24 lesiones previamente mal diagnosticadas, incluyendo 6 lesiones inicialmente diagnosticadas como melanoma que posteriormente se diagnosticaron como nevo mediante una revisión dermatopatológica consensuada, y 18 lesiones inicialmente diagnosticadas como nevo que posteriormente recurrieron localmente y/o metastatizaron y se diagnosticaron de forma retrospectiva como melanoma. En todos los conjuntos de validación, en vista de la importancia de la expresión de marcadores en la zona de unión del nevo frente a la base del nevo, se examinó la expresión de marcadores usando análisis inmunohistoquímico en secciones tisulares 5 μ M.

Utilizando los algoritmos tanto con el valor de intensidad de expresión de marcadores así como las diferencias en valores de expresión "superior-a-inferior", el ensayo de múltiples marcadores consiguió una especificidad del 94,7% y una sensibilidad del 97,3% en el diagnóstico de melanoma en los 75 melanomas que surgen en un nevo (Figura adicional xx). Además, el algoritmo desarrollado a partir del análisis de nevos displásicos en la TMA identificó correctamente el 94,9% (37/39) de las secciones de nevo displásico y el 95,2% (20/21) de los nevos de Spitz. Finalmente, el ensayo de múltiples marcadores diagnosticó correctamente 18/24 (75,0%) de las lesiones previamente mal diagnosticadas. Cuando se combinaron diversos conjuntos de neoplasias melanocíticas de capacitación y validación, el ensayo de múltiples marcadores produjo una especificidad del 95,1% y una sensibilidad del 90,5% ($P < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher). Se presenta una comparación de la sensibilidad, especificidad, y AUC del ensayo de múltiples marcadores en los diversos conjuntos de datos y usando diversos algoritmos de diagnóstico en la Tabla 18.

Discusión

Este ejemplo desvela un ensayo molecular de múltiples marcadores para distinguir melanoma de nevo benigno usando cinco biomarcadores que se sugirieron por un análisis reciente de microserie de ADNc. En ese análisis, el análisis de grupo jerárquico no supervisado separó correctamente nevo de melanoma en una pequeña cantidad de neoplasias melanocíticas recién disponibles en base a los perfiles de expresión génica, y demostró que un gran conjunto de genes se expresaba de forma diferencial en melanomas frente a nevus (véase Haqq C. et al. Proc Natl Acad Sci USA, 2005;102:6092-7). En este ejemplo, se validó la expresión diferencial de cinco de los genes sugeridos por ese análisis, y se ensayó la utilidad de un ensayo de múltiples marcadores para diagnosticar melanoma frente a nevo. Este ensayo inmunohistoquímico de múltiples marcadores mostró una especificidad del 94,9% y una sensibilidad del 90,6% en un conjunto de capacitación compuesto por una TMA que contenía una gran cantidad de nevus y melanomas primarios. En base a este análisis, el ensayo de diagnóstico de múltiples marcadores entonces se sometió a cuatro diferentes conjuntos de validación con relevancia directa para el diagnóstico diferencial de nevo frente a melanoma, y fue capaz de diagnosticar de forma precisa un elevado porcentaje de melanomas que surgen en un nevo, nevus Spitz y displásicos, así como neoplasias melanocíticas previamente mal diagnosticadas. En el conjunto de datos combinados, el ensayo de múltiples marcadores produjo una especificidad del 95,1% y una sensibilidad del 90,5% en el diagnóstico de melanoma.

Nuestros resultados demuestran que un ensayo de múltiples marcadores compuesto por niveles de expresión proteica de ARPC2, FN1, RGS1, SPP1, y WNT2 puede ser útil en el diagnóstico diferencial de nevo frente a melanoma, lo que representa una de las tareas más abrumadoras en patología. Nuestro estudio es el más grande hasta la fecha que analiza la utilidad de marcadores moleculares en el diagnóstico de melanoma, y es único en utilizar un conjunto integral de tejidos exigido por la heterogeneidad histológica tanto de los nevus como de los melanomas. El ensayo de múltiples marcadores corrigió tres cuartas partes de los casos en que se habían dictaminado diagnósticos patológicos incorrectos, incluyendo melanomas inicialmente mal diagnosticados como nevo, en que el comportamiento clínico de la lesión había dado inicio a la revisión del informe patológico previo. Por tanto, el ensayo de múltiples marcadores aquí descrito puede usarse para ayudar en el diagnóstico histológico de melanoma, proporcionando de este modo nueva información importante a los patólogos y otros médicos responsables del cuidado de los pacientes con neoplasias melanocíticas ambiguas.

Una ventaja importante de esta invención es que pueden evitarse errores en el diagnóstico de melanoma. Dichos errores causan que muchos pacientes experimenten terapia inapropiada. Además, el mal diagnóstico de melanoma es la segunda razón más común de las reclamaciones por negligencia en cáncer en los Estados Unidos, solamente por detrás de errores en el diagnóstico de cáncer de mama (véase Troxel D.B., Am J Surg Pathol, 2003;27:1278-83). Los pacientes diagnosticados erróneamente con un melanoma están en permanente peligro de recidiva y pueden no ser capaces de obtener un seguro de vida, mientras que a pacientes diagnosticados erróneamente con un nevo se les priva de terapia apropiada para su neoplasia, incluyendo potencialmente biopsia del ganglio linfático centinela y terapia sistémica adyuvante. Nuestros resultados demuestran que el ensayo de múltiples marcadores podría revertir (y por lo tanto prevenir potencialmente) un elevado porcentaje de los errores causados por el análisis histológico rutinario de neoplasias melanocíticas.

La expresión diferencial de los marcadores sugerida por el análisis de microserie de ADNc no fue uniforme en el análisis inmunohistoquímico del nevo, ya que la zona de unión del nevo frecuentemente expresaba los marcadores a un nivel mayor que la base del nevo. Esto estaba en fuerte contraste con la mayoría de los melanomas, que mostraron uniformidad en el análisis "superior-a-inferior" de la expresión de marcadores. Como resultado, el patrón de expresión de proteínas fue un discriminador significativo entre nevo y melanoma y, en general, superior a los valores absolutos de expresión de transcrito. Aunque nuestros resultados confirman la expresión diferencial de los genes identificados primero por el análisis de transcriptoma, depuran la información obtenida mediante ese análisis demostrando que la mayor diferencia en la expresión génica recae en la base de la neoplasia melanocítica.

Una de las razones por las cuales se seleccionó inmunohistoquímica para validar los resultados de microserie de ADNc en oposición a otros ensayos potencialmente más cuantitativos tales como PCR cuantitativa, fue la capacidad de la inmunohistoquímica de proporcionar análisis in situ de expresión génica para la lesión en cuestión. Nuestros resultados describen la utilidad de un ensayo molecular que podría desarrollarse como complemento al análisis histopatológico de nevus y melanomas.

Aunque el análisis inmunohistoquímico es, por su propia naturaleza, semi-cuantitativo, se evaluó la fiabilidad de observar valores de intensidad de marcadores usando un análisis cuantitativo de imágenes. Descubrimos una elevada tasa de concordancia (> 90%) entre la precisión diagnóstica de observar los valores de intensidad de marcadores y la intensidad densitométrica media determinada a partir del análisis cuantitativo, y una tasa de concordancia incluso mayor (98%) en diferencias en los valores de expresión "superior-a-inferior". Dado que un algoritmo de diagnóstico centrado solamente en los valores de la zona de unión de la lesión frente a la base produjo una especificidad del 84,6% y una sensibilidad del 98,7% en el conjunto de capacitación, nuestros resultados sugieren la facilidad potencial con que podría aplicarse el análisis de estos marcadores al diagnóstico de neoplasias melanocíticas en el entorno clínico.

Aunque se ha observado una disminución vertical en la inmunotinción con unos pocos marcadores diferentes, incluyendo S100A6, Melan-A, y HMB-45, estos marcadores no tienen valor para distinguir entre nevus y melanomas

primarios, porque no se expresaban de forma diferencial en nevos frente a melanomas (véase Busam K.J., et al., Am J Surg Pathol., 1998, 22: 976-82; Fullen D.R., et al., J Cutan Pathol, 2001;28:393-9; Kucher C., et al., Am J Dermatopathol, 2004;26:452-7; Haqq C. et al., Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:6092-7). Además, en algunos de estos estudios, los nevos intradérmicos fueron el tipo de nevo dominante examinado. Se sabe que los nevos intradérmicos experimentan "maduración" significativa en su base. En nuestro estudio, se observó regulación negativa de la inmunotinción del marcador en la base de los nevos intradérmicos, nevos compuestos, así como nevos de Spitz y displásicos. Esto indica la utilidad de base más amplia de este ensayo de múltiples marcadores como marcador de diagnóstico molecular para melanoma.

En este ejemplo, se describe un ensayo inmunohistoquímico de múltiples marcadores que puede diagnosticar neoplasias melanocíticas con un elevado grado de precisión, ayudando de este modo en este difícil diagnóstico patológico diferencial.

Tabla 16. Discriminación de melanoma de nevo con el uso de valores de expresión de un único marcador en solitario

Marcador	División óptima de escala	ji cuadrado	Valor P
ARPC2	0 frente a 1,2 frente a 3	24,2	< 0,00005
FN1	0 frente a 1,2 frente a 3	4,75	0,0294
RGS1	0, 1, 2 frente a 3	8,98	0,0027
SPP1	0,1 frente a 2,3	11,1	0,0009
WNT2	0, 1, 2, 3 (escala completa)	86,6	< 0,00005

Tabla 17. Precisión diagnóstica para melanoma usando el valor de la zona de unión de la lesión frente a la base de la lesión ("superior-a-inferior") en datos de capacitación para cada marcador individual

Marcador	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	Valor P
			(ensayo exacto de Fisher)
ARPC2	59,7	96,1	< 0,00005
FN1	23,3	98,9	0,0101
SPP1	61,5	99,0	< 0,00005
RGS1	33,3	99,0	< 0,00005
WNT2	100	100	< 0,00005

Tabla 18. Comparación de sensibilidad, especificidad, y AUC de ensayo de múltiples marcadores para el diagnóstico de melanoma en diversos conjuntos de tejido y usando diferentes algoritmos de diagnóstico*

Conjunto de datos	Algoritmo de diagnóstico	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	AUC
Capacitación	Intensidad de marcador solo	93,6	75,8	0,9105
Capacitación	Expresión vertical solo	84,6	98,7	0,9165
Capacitación	Valores combinados de expresión	94,9	90,6	0,9277
Capacitación y validación	Valores combinados de expresión	95,1	90,5	0,9275

* Valor P para todos los análisis < 0,00005 (ensayo exacto de Fisher)

Ejemplo 9: Un ensato de marcadores de diagnóstico de seis genes para melanoma

Se evaluó la utilidad de un ensayo de seis genes en el diagnóstico diferencial de melanoma frente a nevo en un conjunto combinado de datos de 698 pacientes compuesto por un conjunto de capacitación de 538 pacientes (119 nevos y 419 melanomas) y un conjunto de validación de 160 pacientes. Se evaluó la expresión de seis genes (ARPC2, FN1, NCOA3, RGS1, osteopontina (SPP1), y WNT2) usando análisis inmunohistoquímico. Mediante análisis de regresión lógica, el ensayo de seis genes (cuando se analiza por valores de expresión de marcadores solos) mostró una sensibilidad del 77,9% y una especificidad del 92%, con una AUC bajo la ROC de 0,914. Se desarrolló un algoritmo de diagnóstico para examinar la utilidad de los valores superior-a-inferior para los seis marcadores en el diagnóstico de melanoma (Figura 22). Este análisis superior-a-inferior solamente (en que la expresión de marcadores se perdió de forma uniforme en los nevos mientras se mantuvo esta expresión vertical en los melanomas) reveló una sensibilidad del 96,4% y una especificidad del 82,8%. Finalmente, se desarrolló un algoritmo de diagnóstico que abarcaba tanto valores de intensidad de marcadores así como diferencias superior-a-inferior (Figura 23). La aplicación de este algoritmo de diagnóstico a las lesiones del conjunto de capacitación produjo una sensibilidad del 92% y una especificidad del 94,1%. Finalmente, este mismo algoritmo de diagnóstico se aplicó a los cuatro conjuntos de validación, y reveló una sensibilidad del 97,4% y una especificidad del 94,7% en melanomas que surgen en un nevo, e identificó correctamente 37/39 (95%) de los nevos displásicos, 20/21 (95%) de los nevos de Spitz, y 18/24 (75%) de las neoplasias previamente mal diagnosticadas. En el conjunto combinado de datos, el ensayo de múltiples marcadores reveló una sensibilidad del 92,2% y una especificidad del 94,6%. Estos

resultados demuestran la utilidad de este ensayo de seis marcadores en el diagnóstico de melanomas así como nevus.

Ejemplo Comparativo 10: Un ensayo pronóstico de cuatro genes para Melanoma

Se examinó el impacto pronóstico de RGS1, NCOA3, osteopontina (SPP1), y PHIP cuando se combinaron los niveles de expresión de los cuatro marcadores. Se desarrolló un índice pronóstico que reflejaba la cantidad de marcadores sobreexpresados (definida como por encima del umbral para esos marcadores) para cada uno de los 412 casos de melanoma cutáneo primario presentes en la TMA para la cual estaba disponible la expresión de marcadores. Inicialmente, se analizó el impacto de la positividad de múltiples marcadores por análisis de una variable sobre tres importantes parámetros de desenlace: estado del ganglio linfático centinela (estado del SLN), supervivencia sin recidiva (RFS), y supervivencia específica de la enfermedad (DSS). Mediante análisis de una variable, la cantidad creciente de marcadores sobreexpresados fue significativamente predictiva del estado del SLN ($P=0,002$, regresión lógica), la RFS ($P<0,0001$, regresión de Cox), y la DSS ($P<0,0001$, regresión de Cox).

A continuación, se analizó el índice de múltiples marcadores para su impacto pronóstico mediante análisis de múltiples variables, utilizando los seis factores incluidos por el análisis del comité sobre melanoma del AJCC. Mediante análisis de múltiples variables, el ensayo de múltiples marcadores fue un indicador independiente del estado del SLN (Tabla 19), la RFS (Tabla 20), y la DSS (Tabla 21) con la inclusión de estos factores. En el análisis de la DSS, el ensayo de múltiples marcadores surgió por el mejor factor para predecir la DSS. El índice de múltiples marcadores permaneció significativamente predictivo incluso con la inclusión del estado del SLN (Tabla 22). Además, la positividad creciente de los marcadores fue significativamente predictiva de la RFS ($P<0,0001$) y la DSS ($P<0,0001$) por análisis de Kaplan-Meier. Estos resultados demuestran el potente impacto pronóstico del ensayo de múltiples marcadores.

Tabla 19. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre el estado del SLN de la cohorte de melanoma

VALOR DEL FACTOR PRONÓSTICO	JI CUADRADO		PROPORCIÓN DE RIESGO P
Edad	19,60	0,65	<0,0001
Nivel de expresión de múltiples marcadores	8,35	1,33	0,0039
Grosor del tumor	6,89	1,68	0,0087
Nivel de Clark	1,63	1,36	0,20
Sexo	1,49	1,46	0,22
Ulceración	0,77	1,32	0,38
Sitio	0,0006	1,01	0,98

Tabla 20. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la RFS de la cohorte de melanoma

VALOR DEL FACTOR PRONÓSTICO	JI CUADRADO		PROPORCIÓN DE RIESGO P
Nivel de Clark	25,15	1,81	<0,0001
Nivel de expresión de múltiples marcadores	15,52	1,19	0,0001
Ulceración	13,20	1,79	0,0003
Sitio	3,53	1,34	0,06
Grosor del tumor	1,18	1,11	0,28
Edad	0,30	0,97	0,59
Sexo	0	1,00	0,999

Tabla 21. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la DSS de la cohorte de melanoma

VALOR DEL FACTOR PRONÓSTICO	JI CUADRADO PROPORCIÓN DE RIESGO P		
Nivel de expresión de múltiples marcadores	14,18	1,24	0,0002
Nivel de Clark	8,16	1,55	0,0043
Ulceración	4,23	1,52	0,04
Grosor del tumor	3,89	1,29	0,049
Sitio	2,66	1,40	0,10
Sexo	0,01	1,02	0,92
Edad	0,01	0,99	0,93

Tabla 22. Análisis de regresión de Cox del impacto de diversos factores sobre la DSS de la cohorte de melanoma

VALOR DEL FACTOR PRONÓSTICO	JI CUADRADO PROPORCIÓN DE RIESGO P		
Nivel de expresión de múltiples marcadores	8,25	1,31	0,004
Grosor del tumor	6,58	1,62	0,01
estado del SLN	2,69	1,55	0,10
Ulceración	1,88	1,45	0,17
Nivel de Clark	1,25	1,24	0,26
Sexo	0,20	1,13	0,66
Edad	0,15	1,03	0,70
Sitio	0,09	1,08	0,77

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar melanoma en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:
 - (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con reactivos que se unen específicamente a un panel de marcadores seleccionados que comprende: (i) los polipéptidos ARPC2, FN1, NCOA3, RGS1, SPP1, y WNT2, o (ii) los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos, en el que existe al menos un reactivo que se une con cada marcador; y
 - (b) determinar si cada uno de los marcadores seleccionados se sobreexpresa o subexpresa o no en la muestra; proporcionando de este modo un diagnóstico para melanoma en el sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en el que:
 - (a) los reactivos son anticuerpos;
 - (b) los reactivos son anticuerpos marcados;
 - (c) los reactivos son anticuerpos y dicha determinación se realiza usando un inmunoensayo enzimático seleccionado entre el grupo que consiste en ensayo inmunohistoquímico y ELISA;
 - (d) los reactivos son ácidos nucleicos;
 - (e) los reactivos son cebadores de RT PCR; o
 - (f) la etapa de determinación comprende el uso de FISH o CGH.
3. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra es una biopsia de piel.
4. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa de determinación comprende correlacionar la elevada expresión del marcador con un fenotipo metastásico para las células de la muestra.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el diagnóstico distingue entre nevos benignos frente a melanoma maligno.
6. Un kit para su uso en el diagnóstico de melanoma en un sujeto, comprendiendo el kit reactivos que se unen específicamente a un panel de marcadores seleccionados que comprende: (i) los polipéptidos ARPC2, FN1, NCOA3, RGS1, SPP1, y WNT2, o (ii) los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos.
7. El kit de la reivindicación 6, en el que los reactivos son anticuerpos.
8. El kit de la reivindicación 7, en el que los anticuerpos están marcados.
9. El kit de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente reactivos adicionales para la detección usando un inmunoensayo enzimático seleccionado entre el grupo que consiste en ensato inmunohistoquímico y ELISA.
10. El kit de la reivindicación 7, que comprende adicionalmente reactivos adicionales para la detección usando FISH o CGH.
11. El kit de la reivindicación 6, en el que los reactivos son ácidos nucleicos o son cebadores de RT PCR.

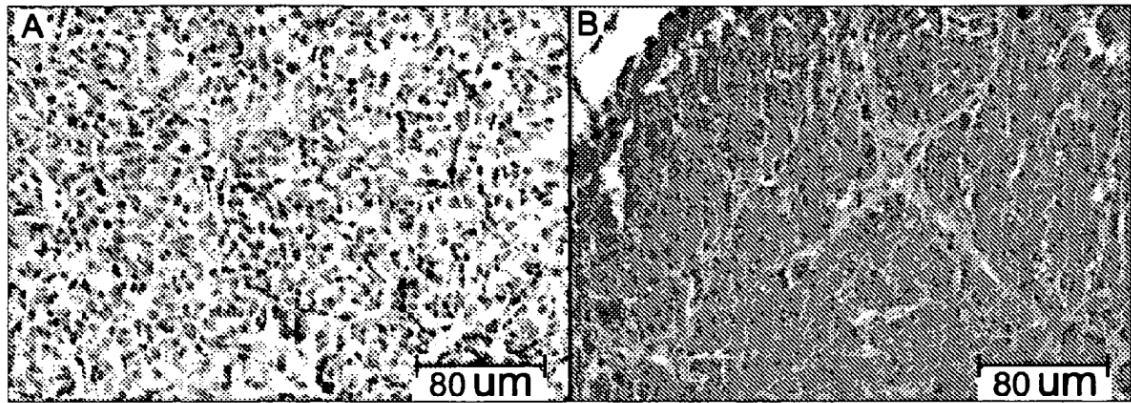


Fig. 1

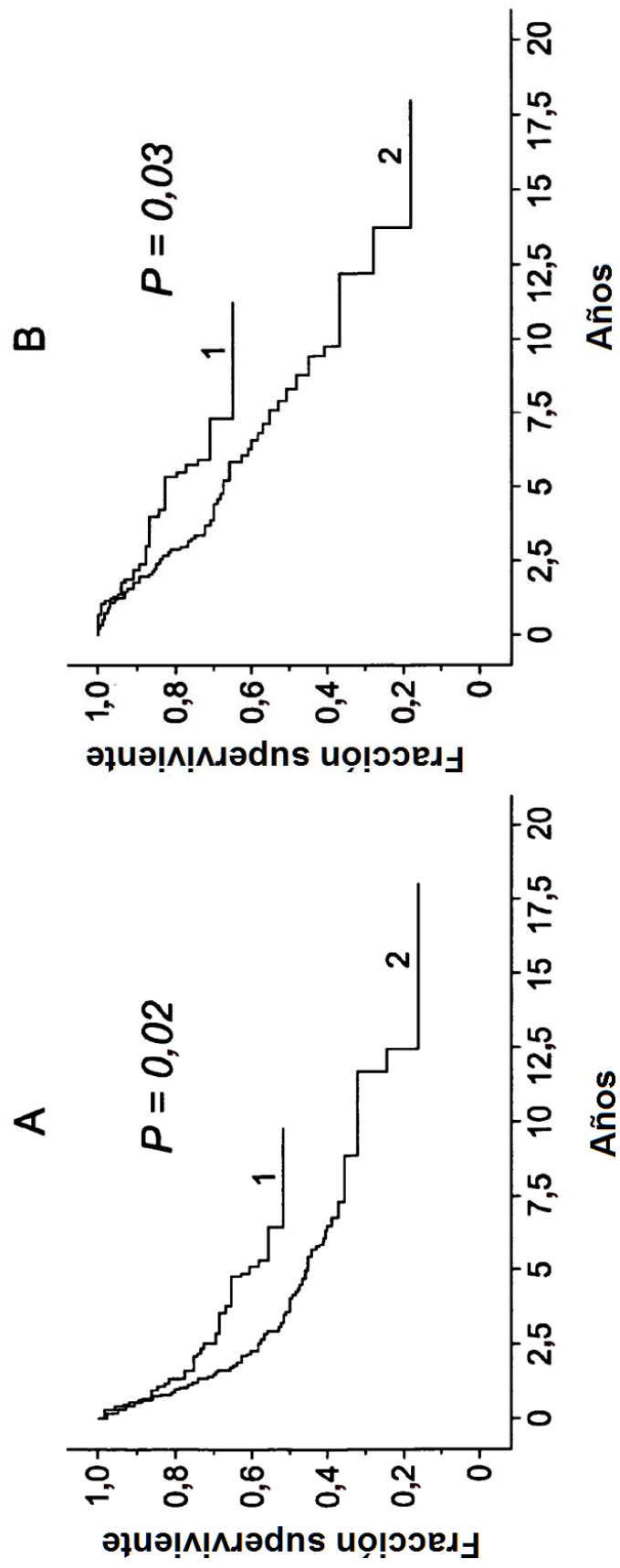


Fig. 2

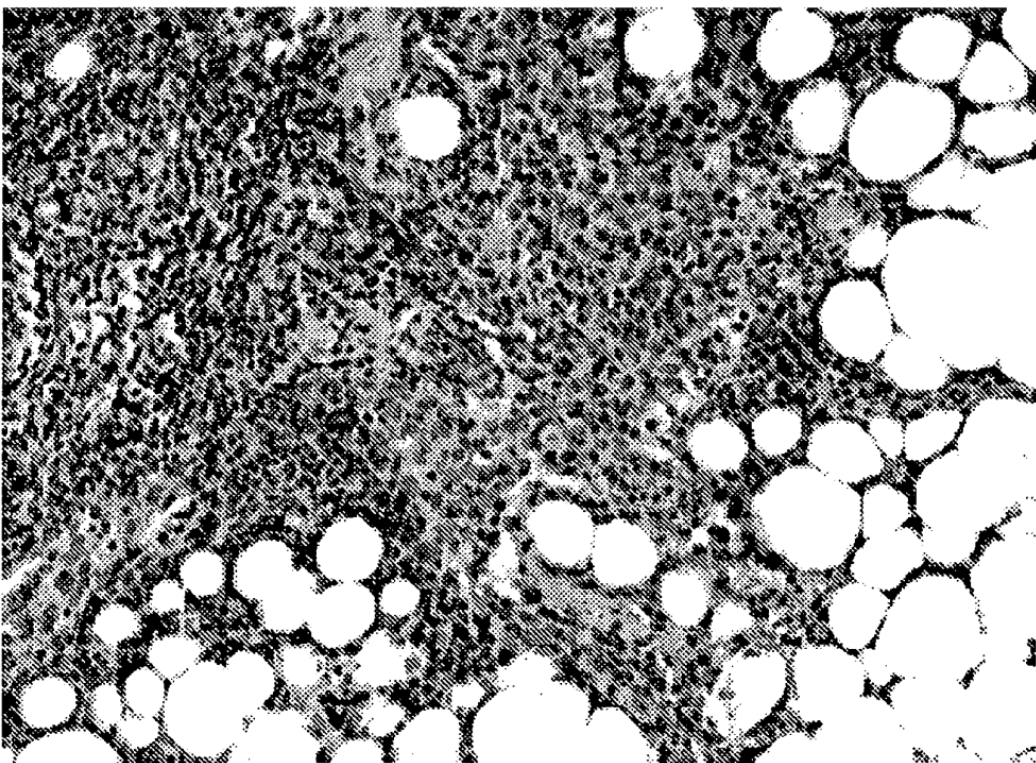
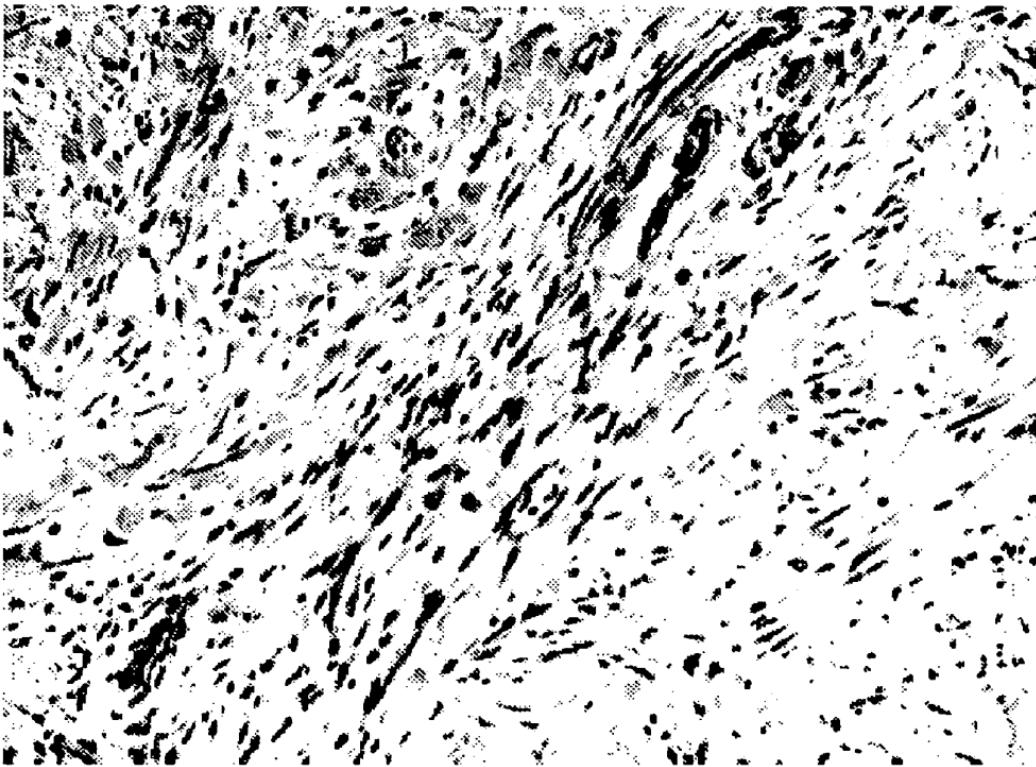


Fig. 3

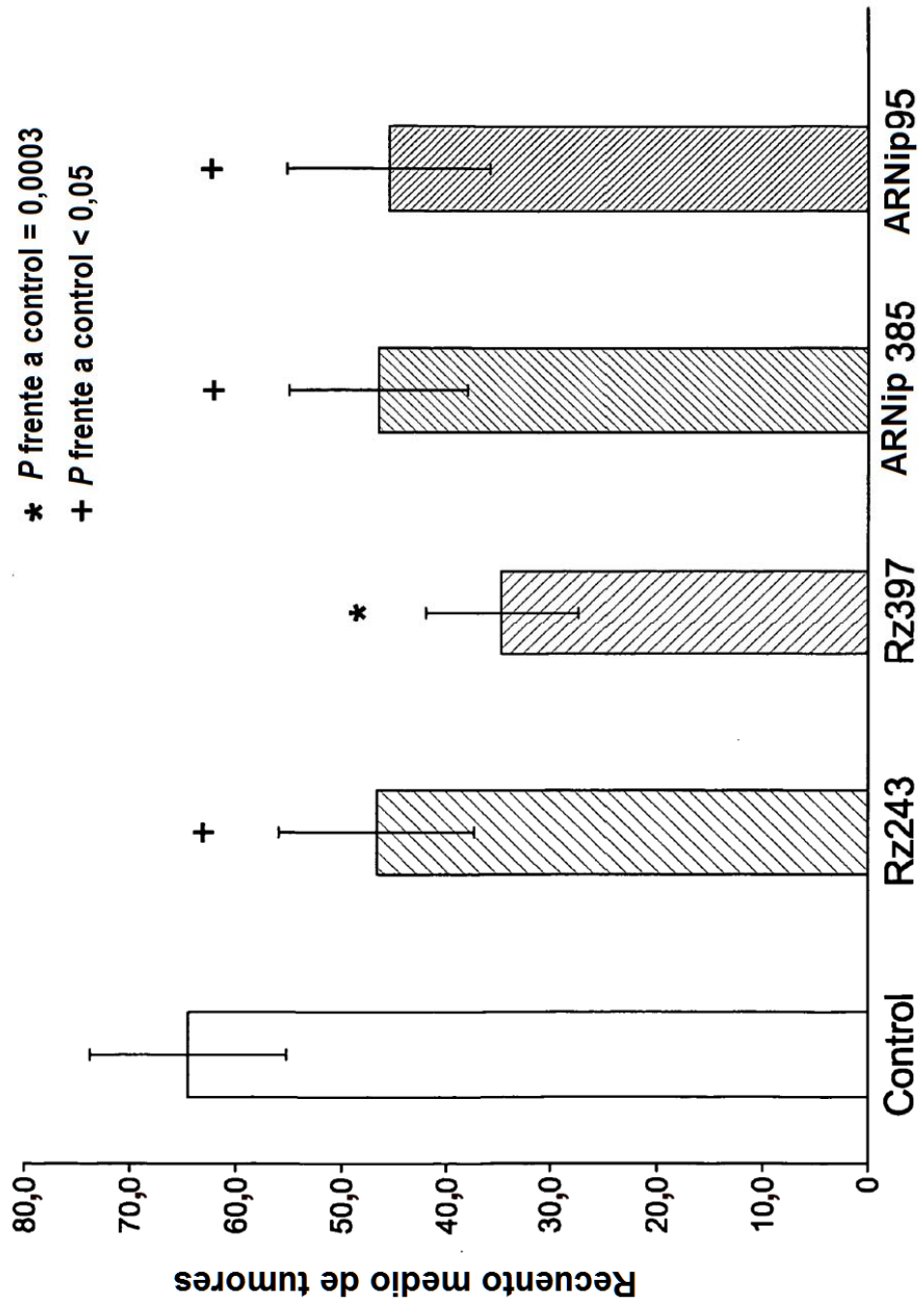


Fig. 4

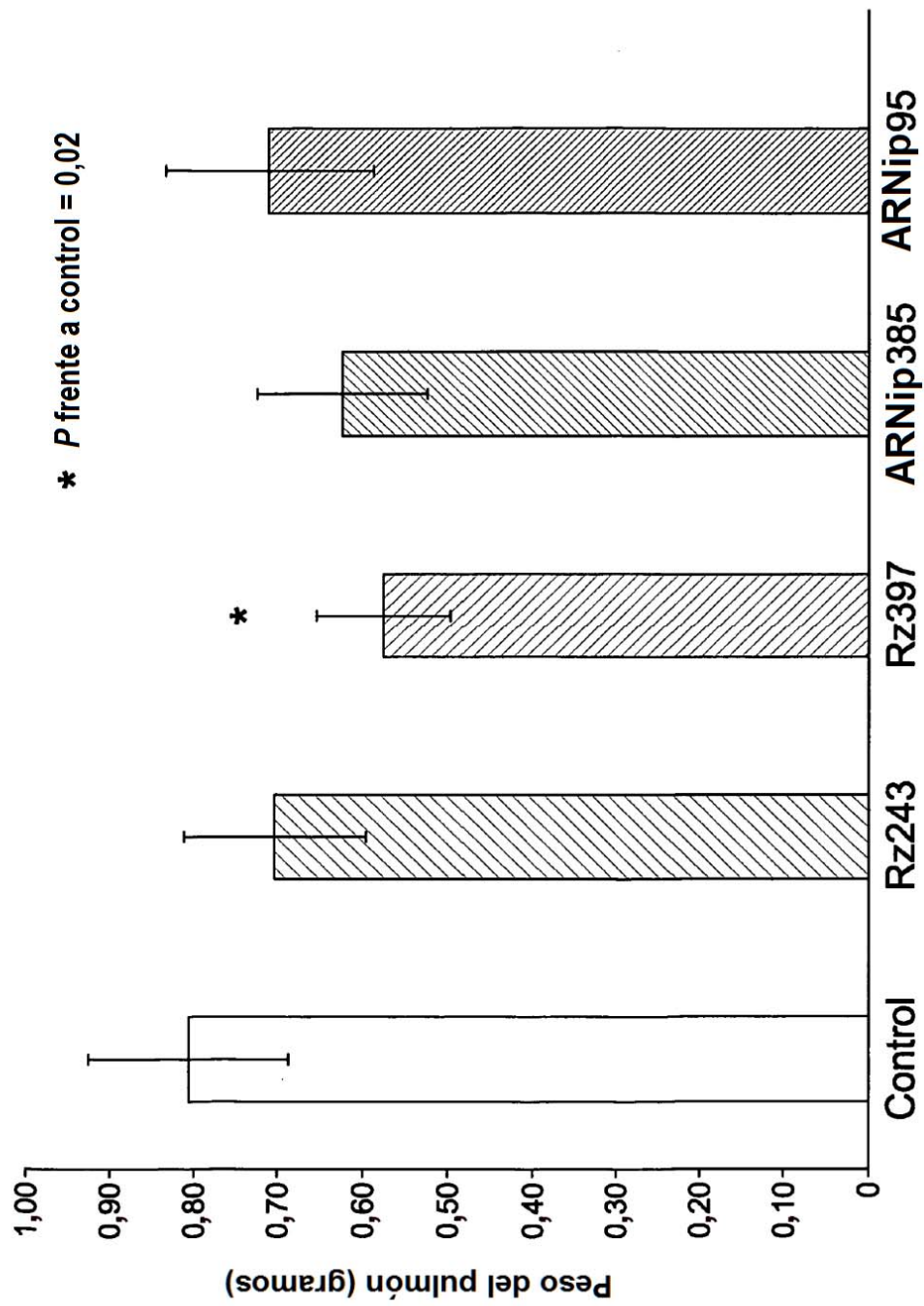


Fig. 5

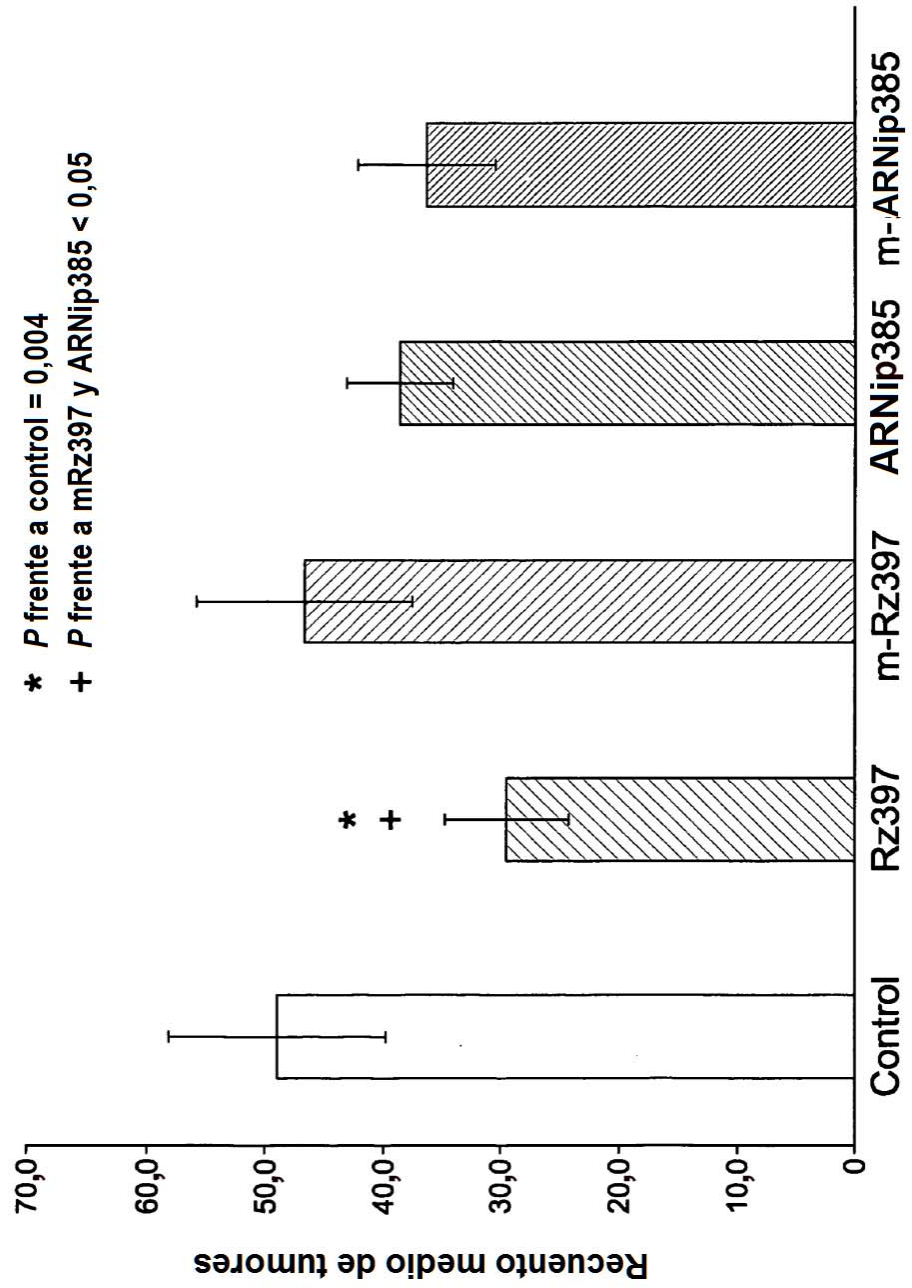


Fig. 6

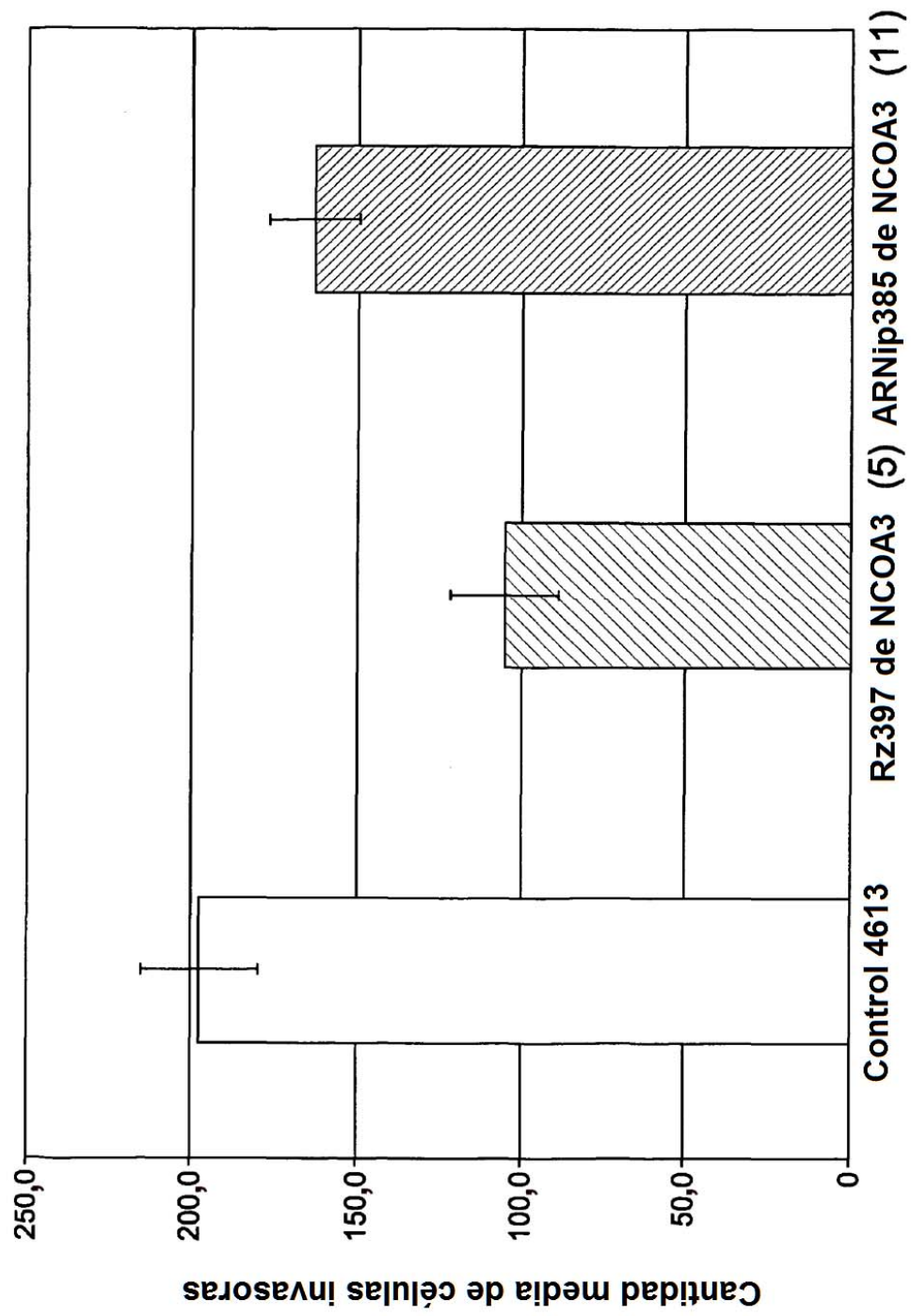


Fig. 7

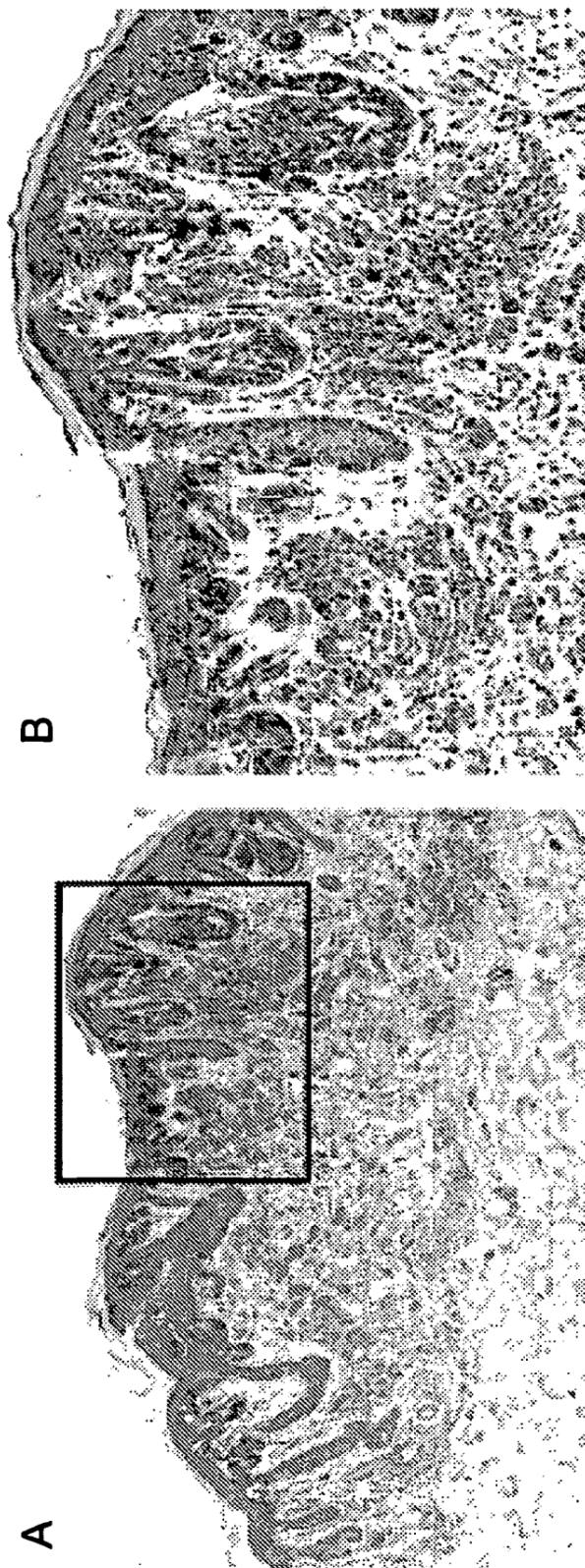


Fig. 8

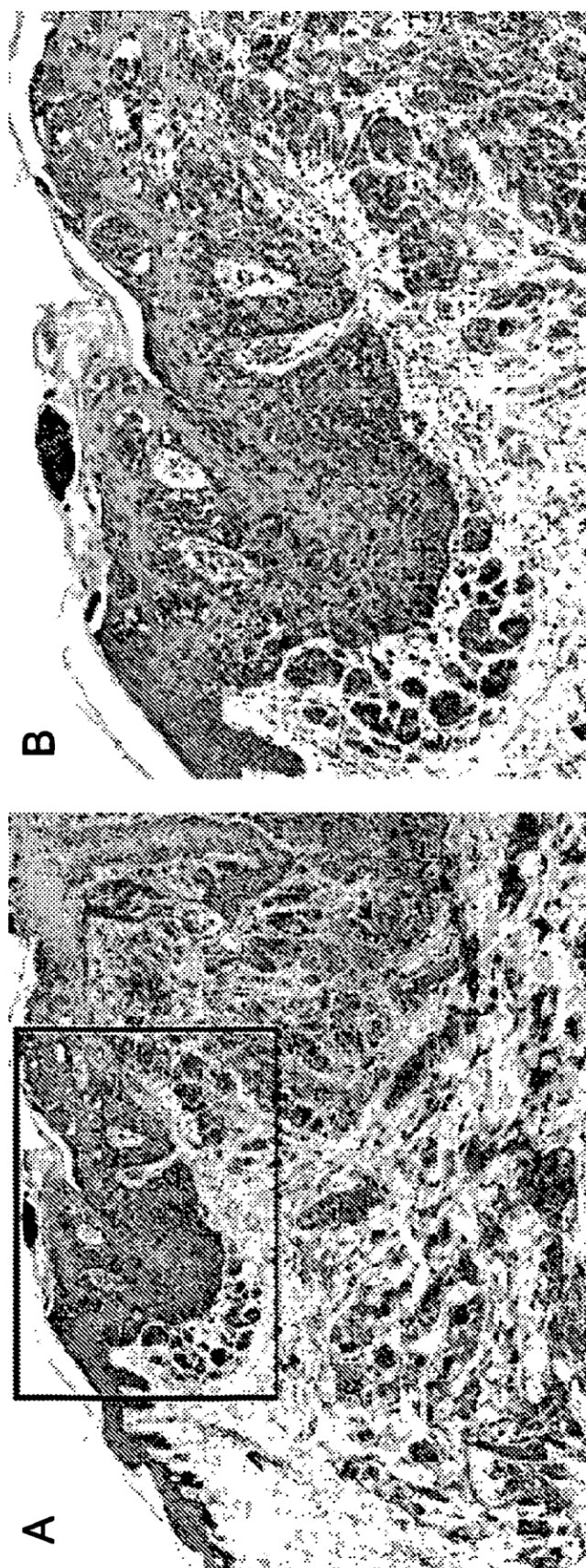


Fig. 9

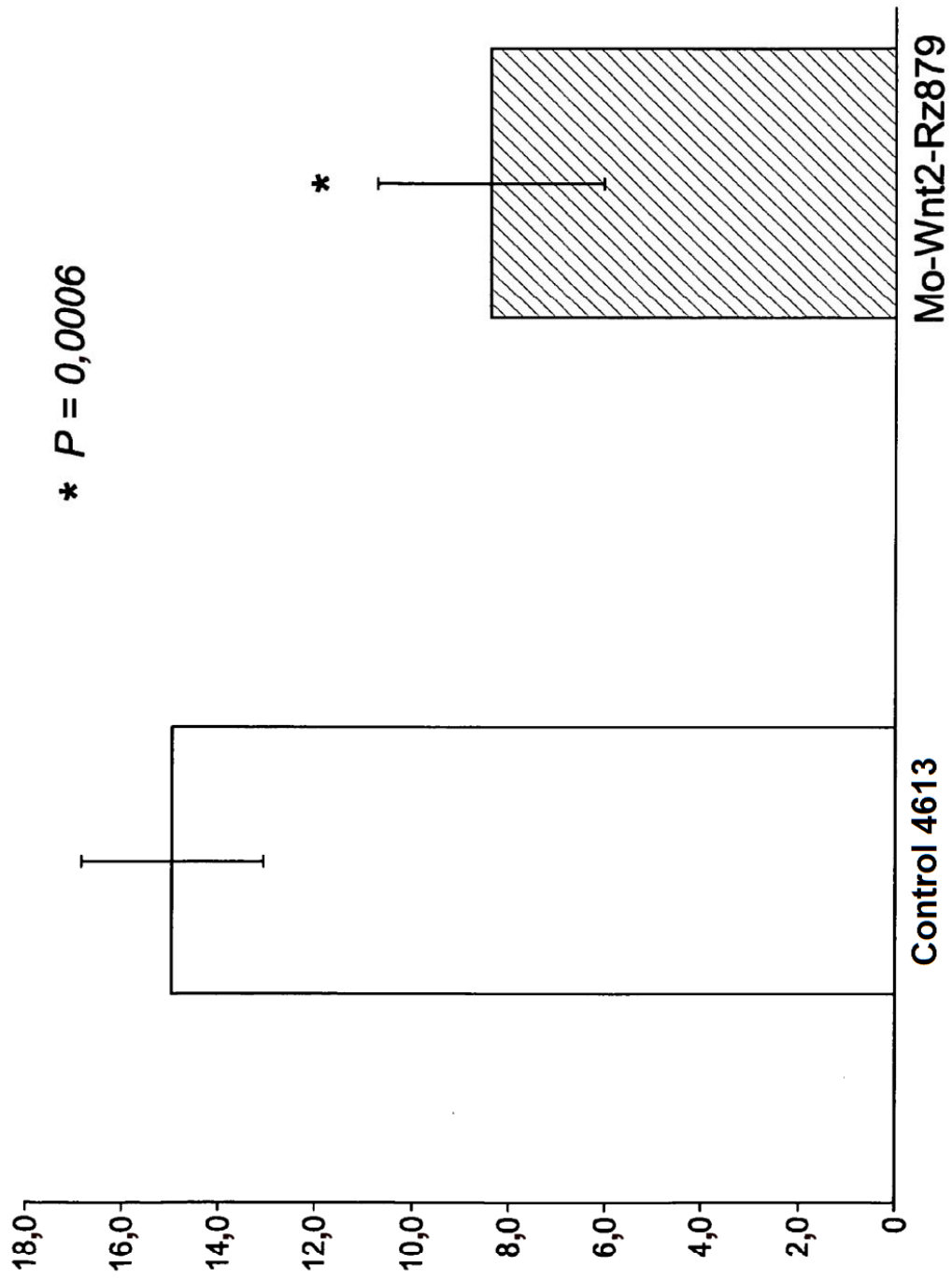


Fig. 10

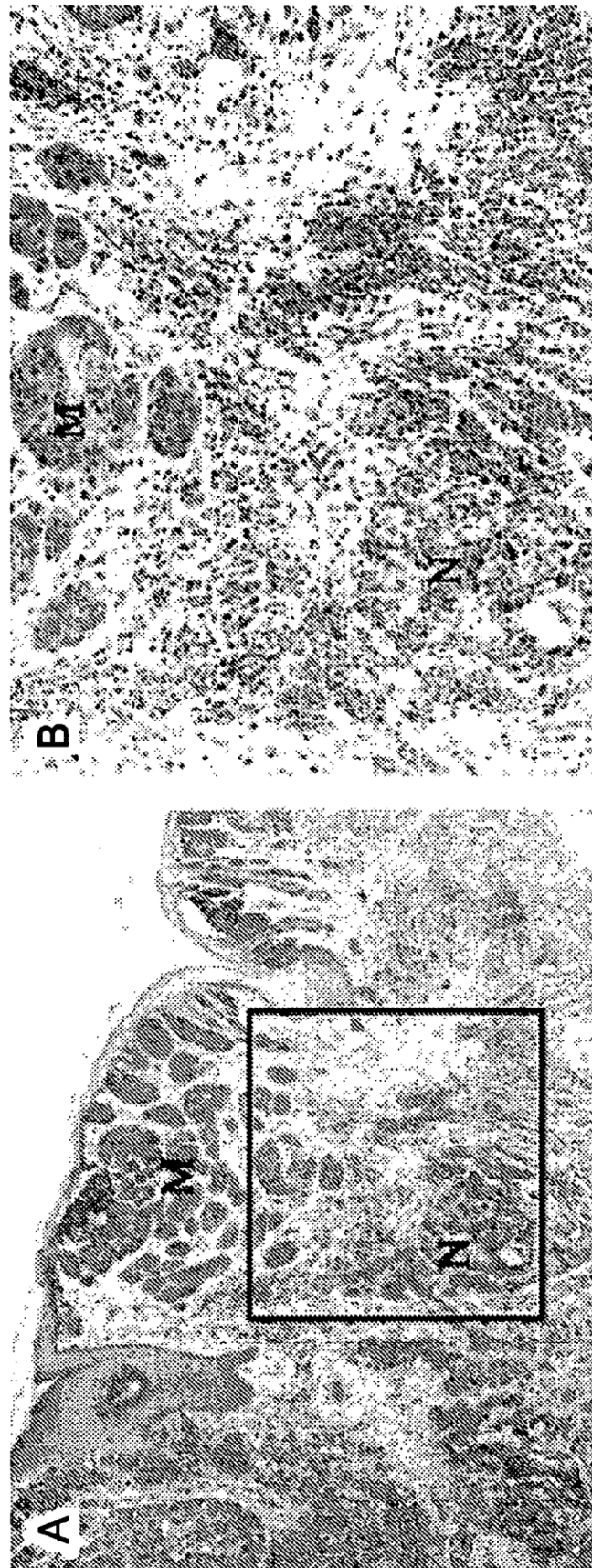


Fig. 11

Recuento de tumores E57 : B16

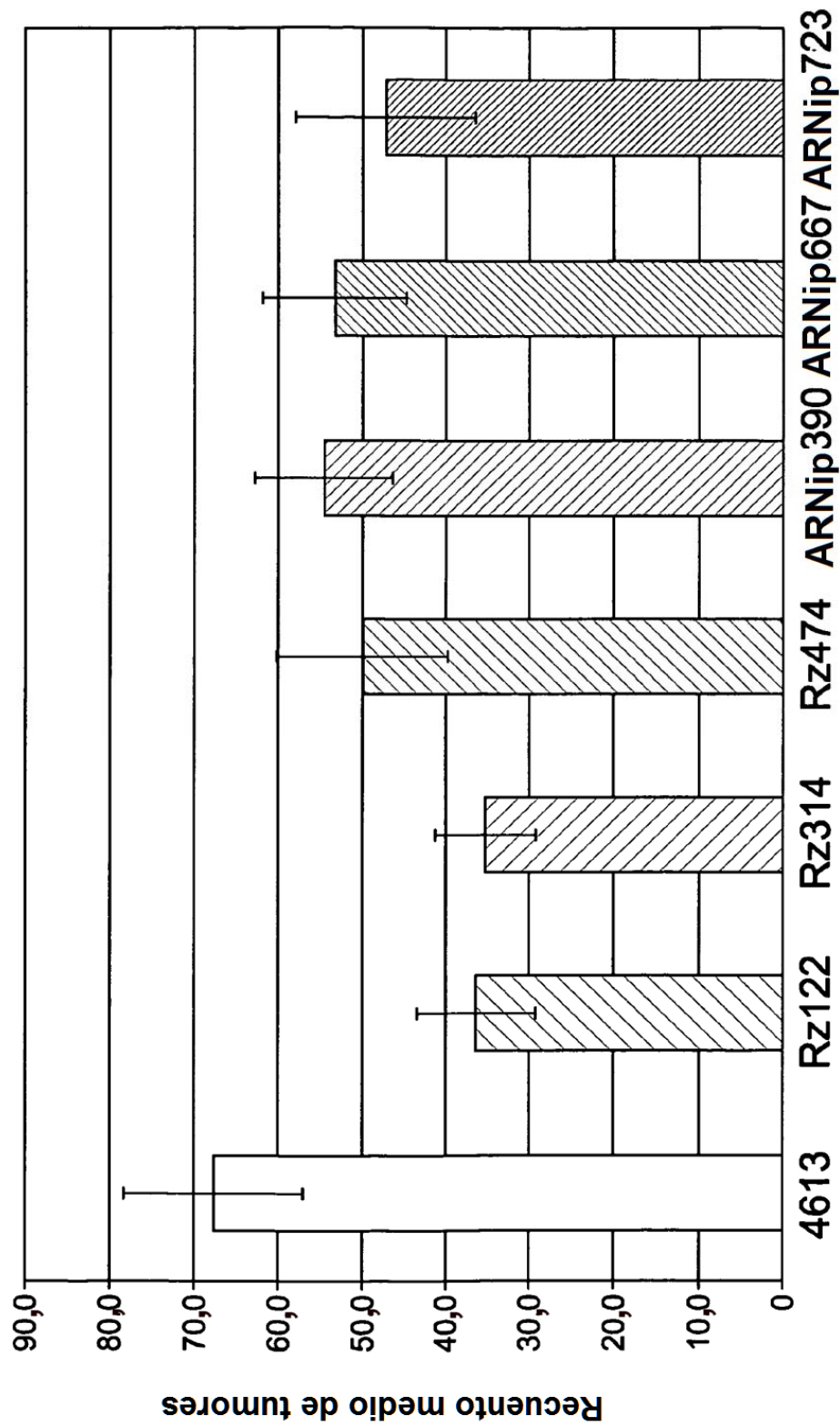


Fig. 12

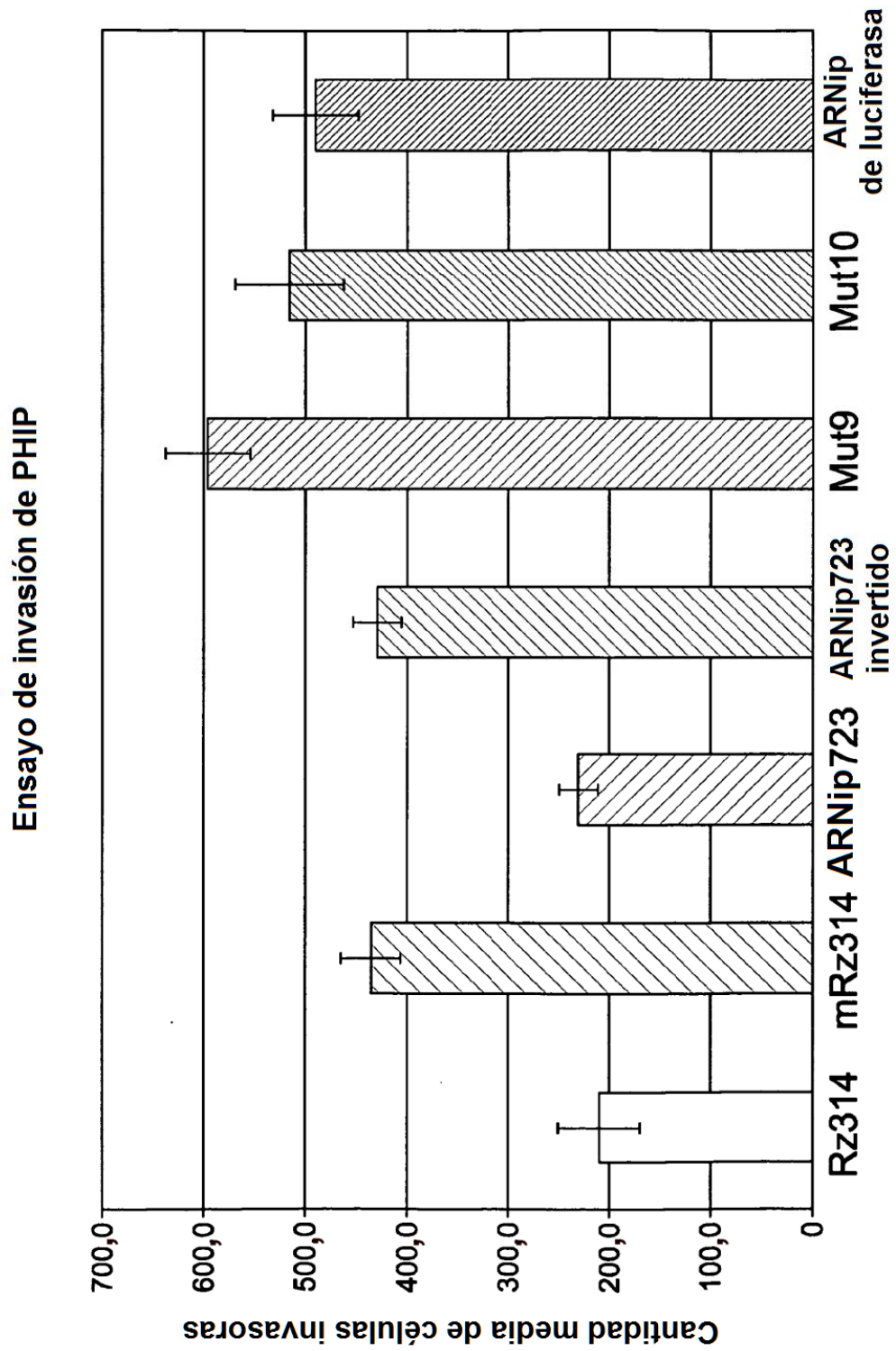


Fig. 13

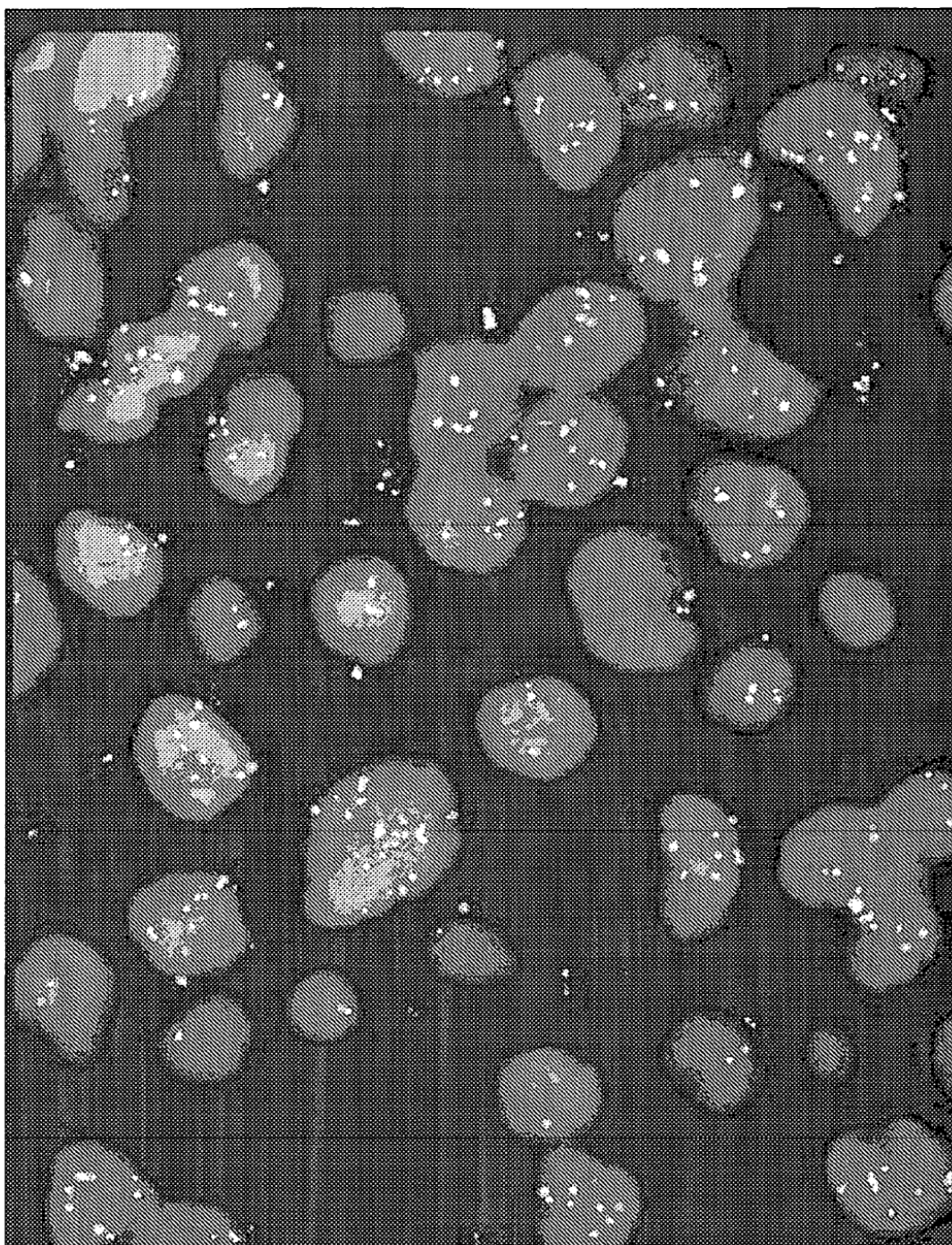


Fig. 14

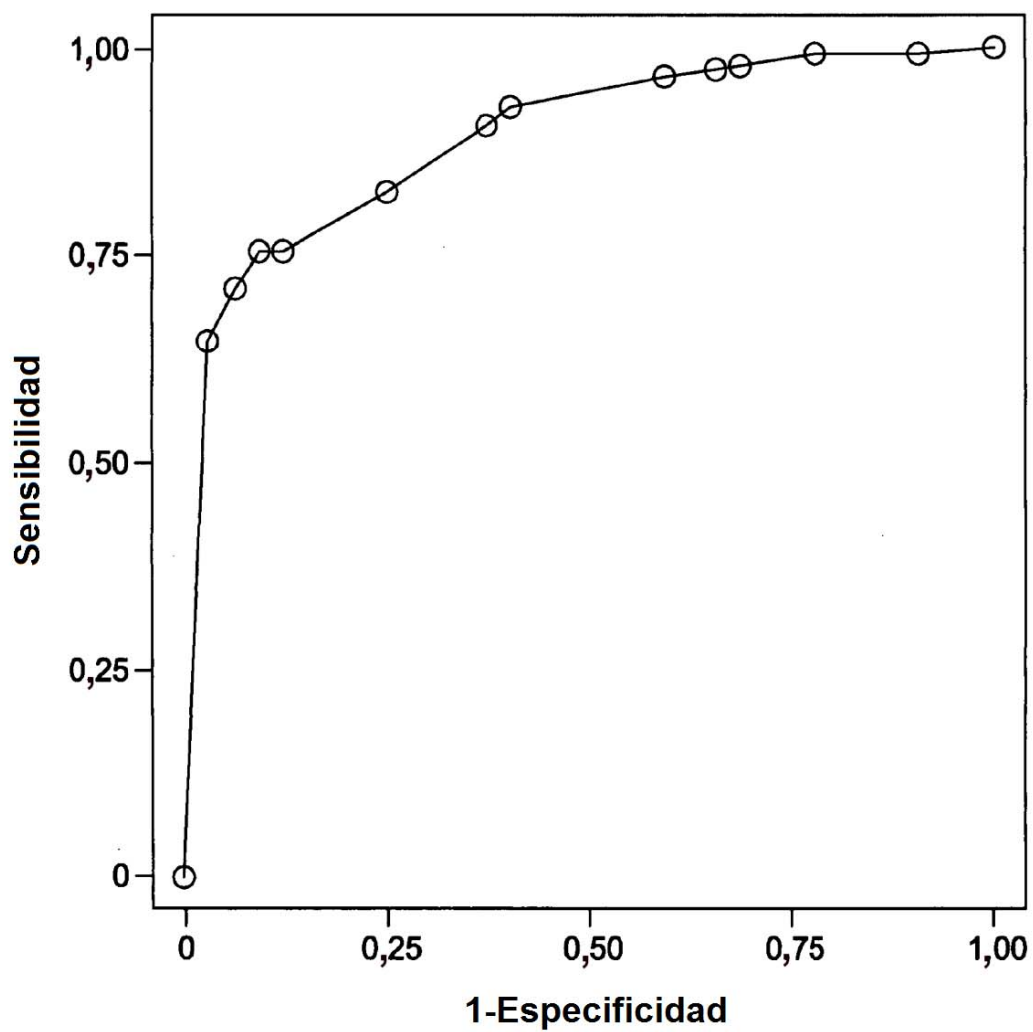


Fig. 15

Fig. 16 hoja 1

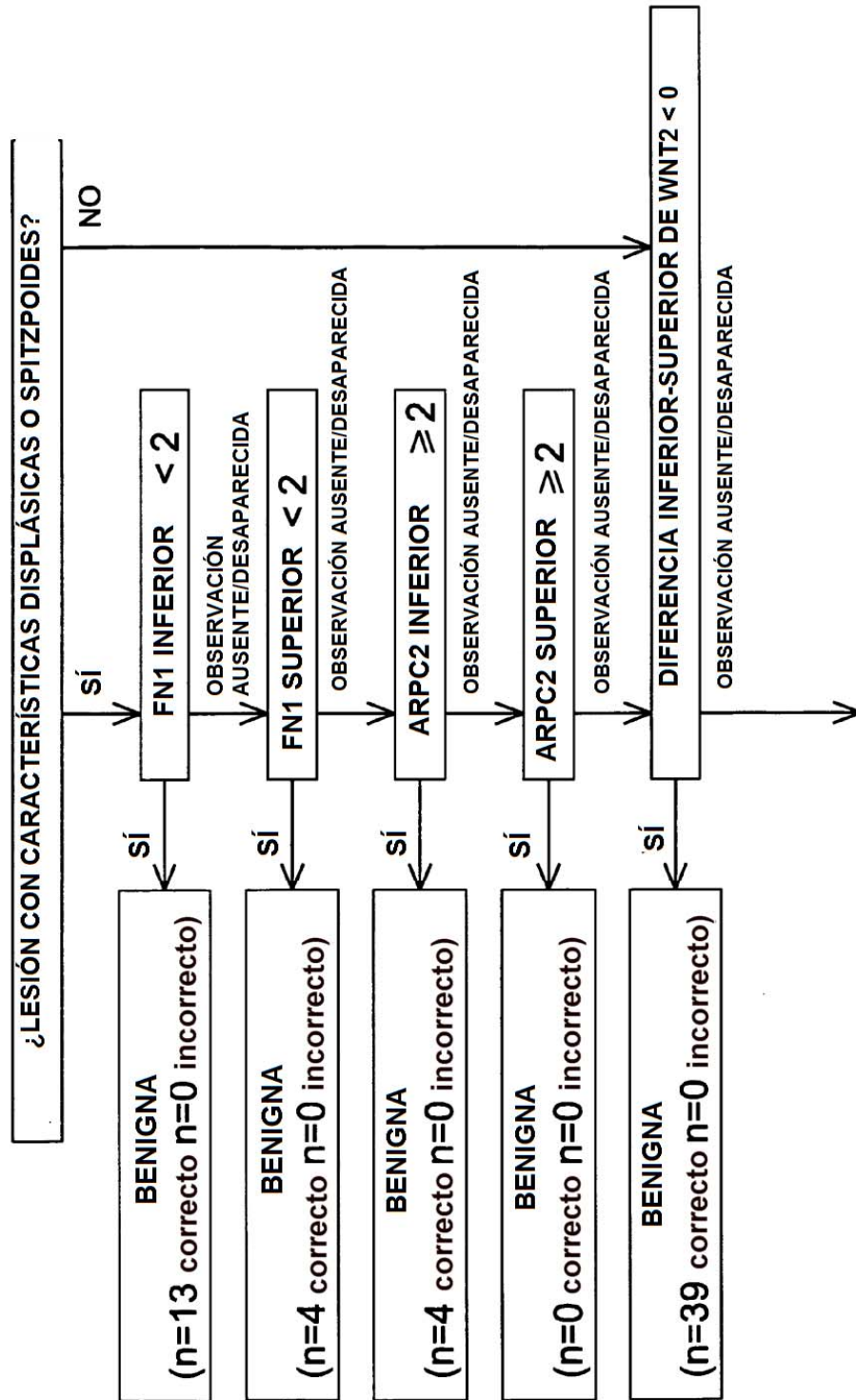


Fig. 16 hoja 2

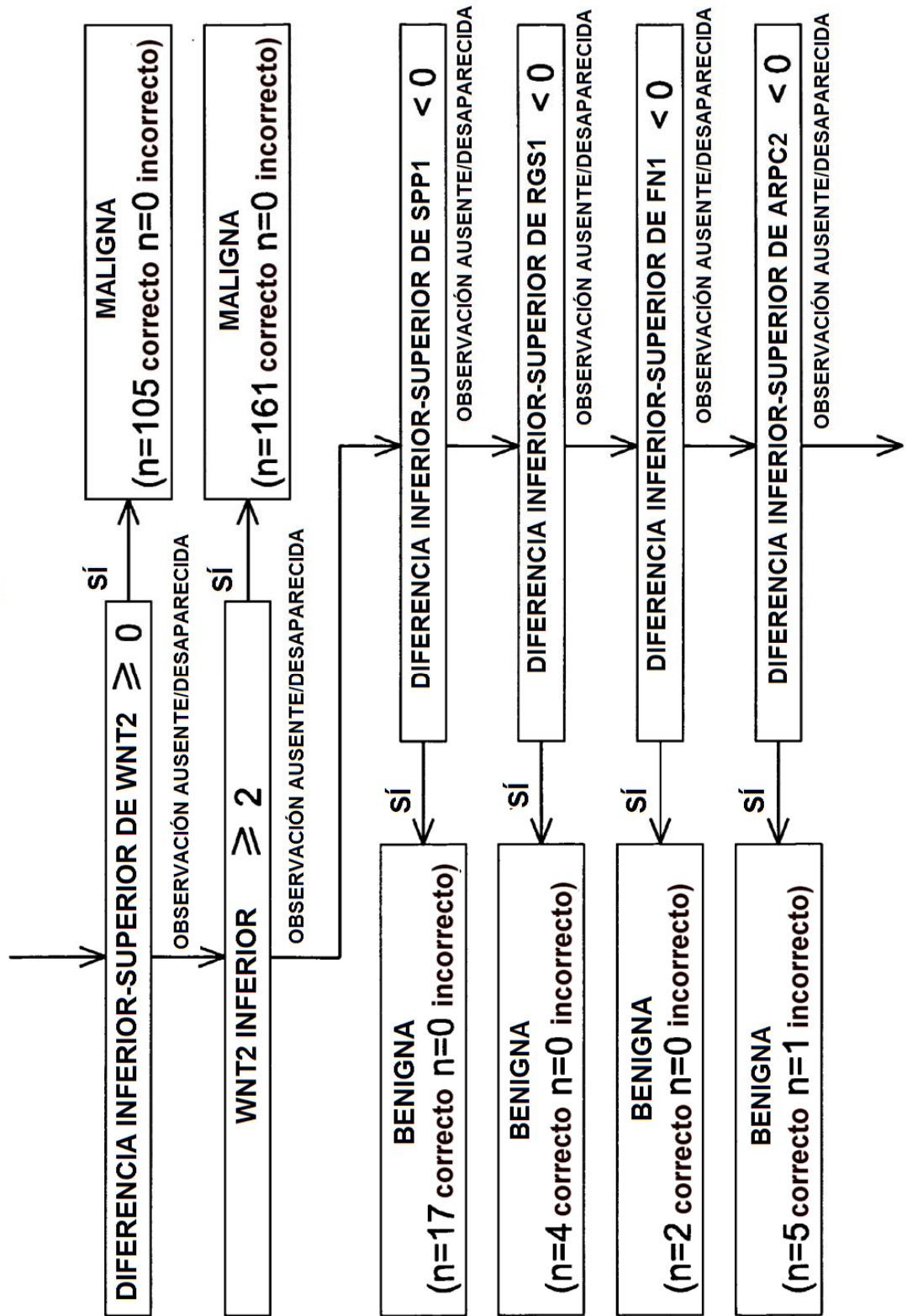


Fig. 16 hoja 3

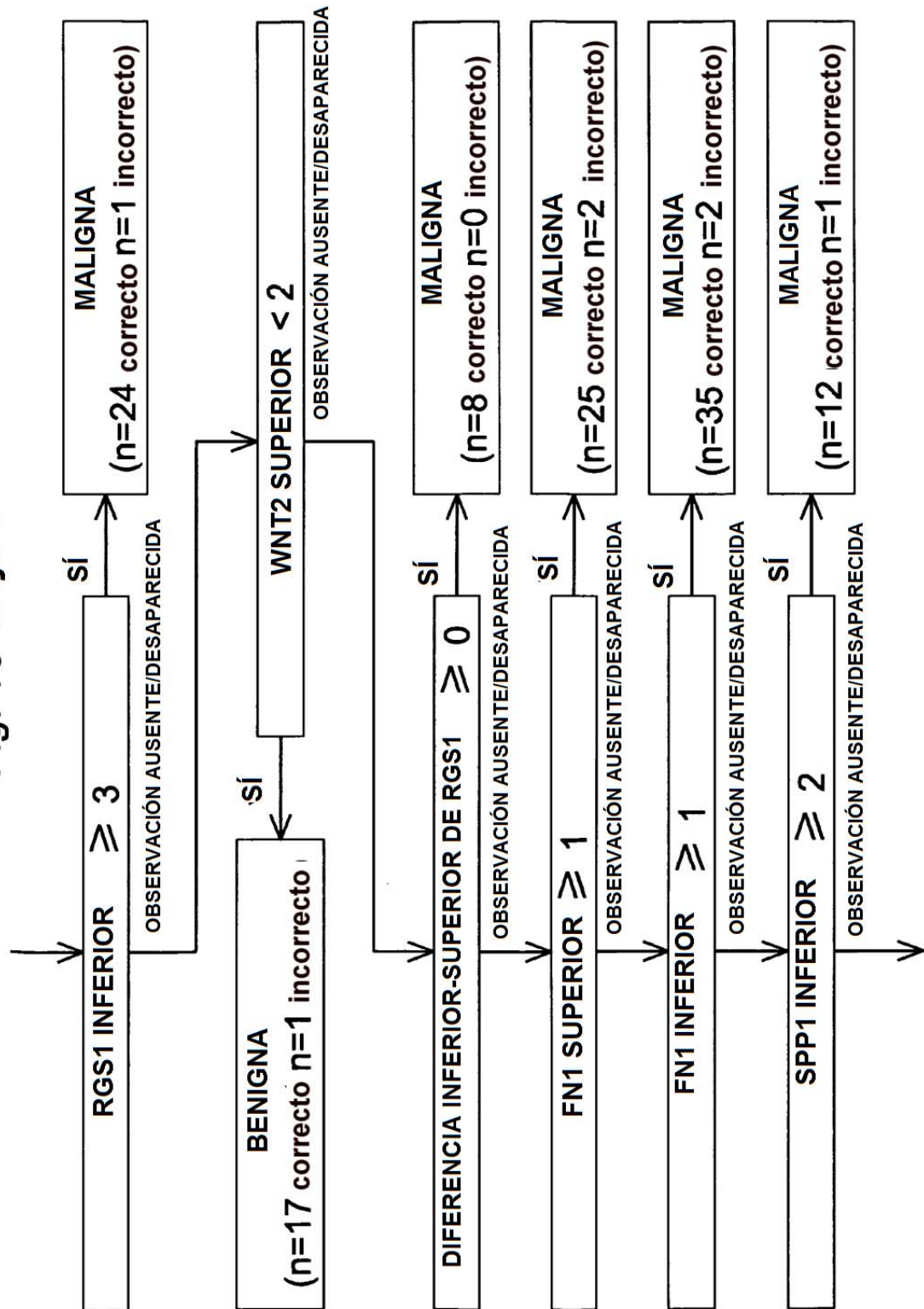


Fig. 16 hoja 4

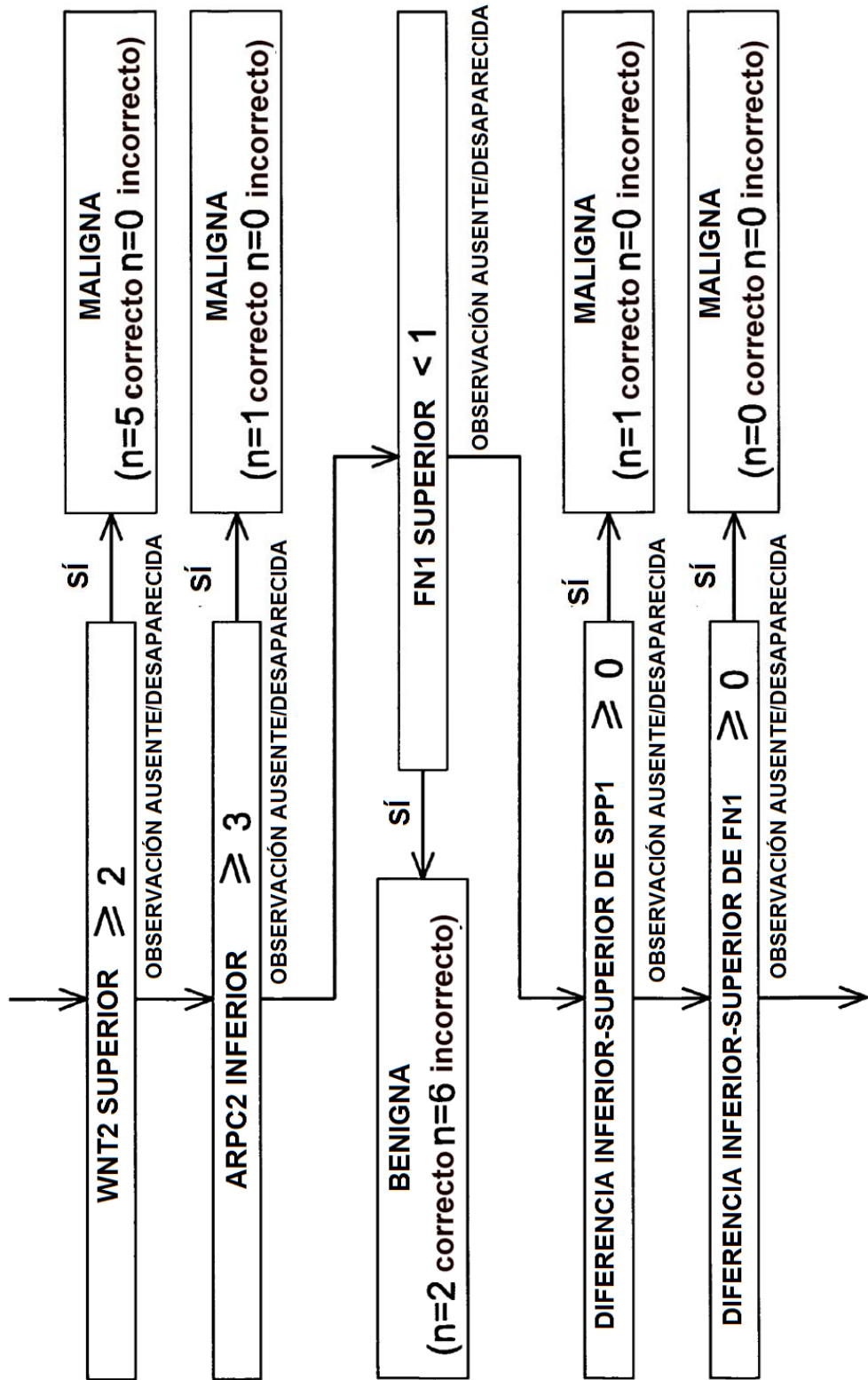


Fig. 16 hoja 5

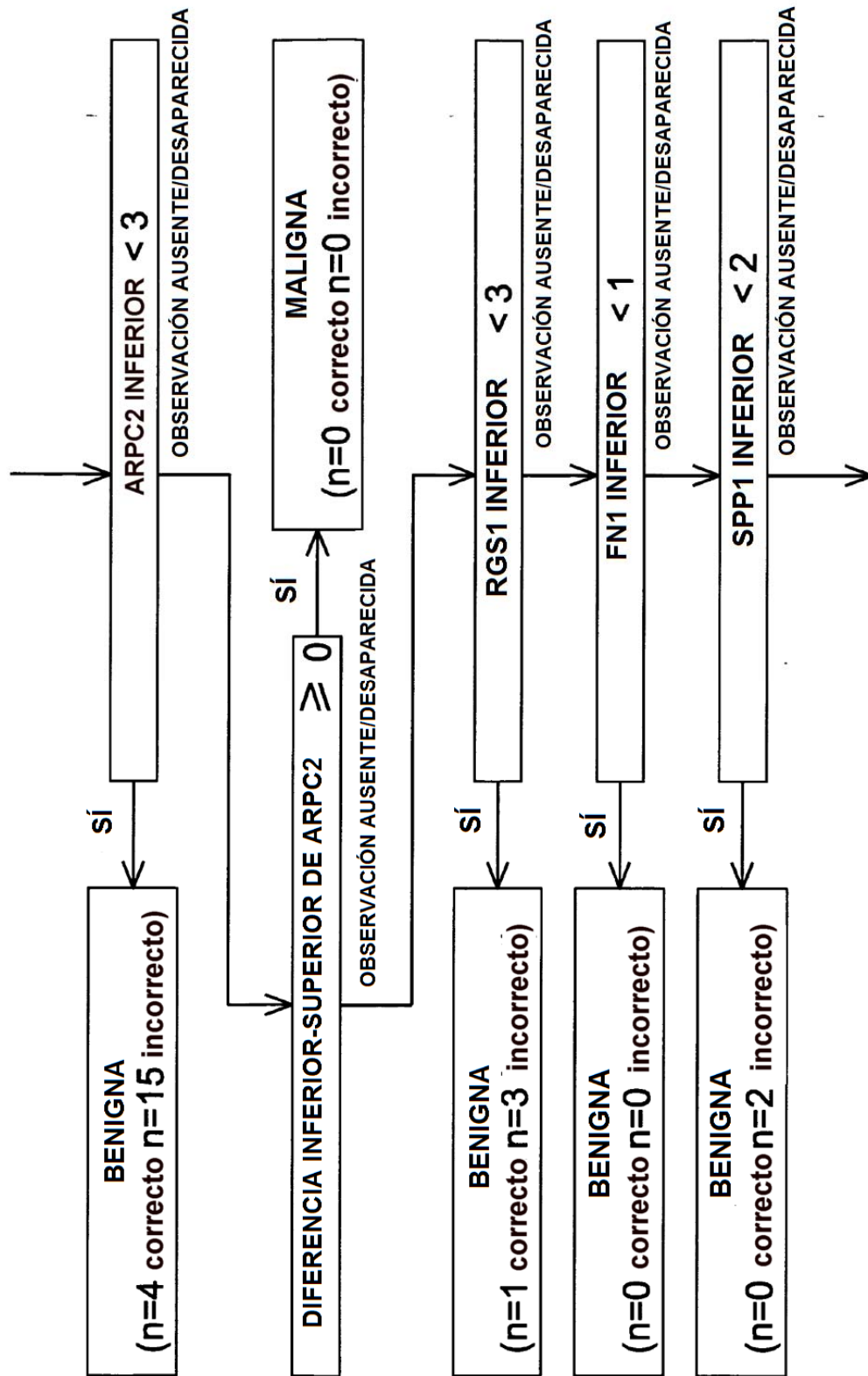
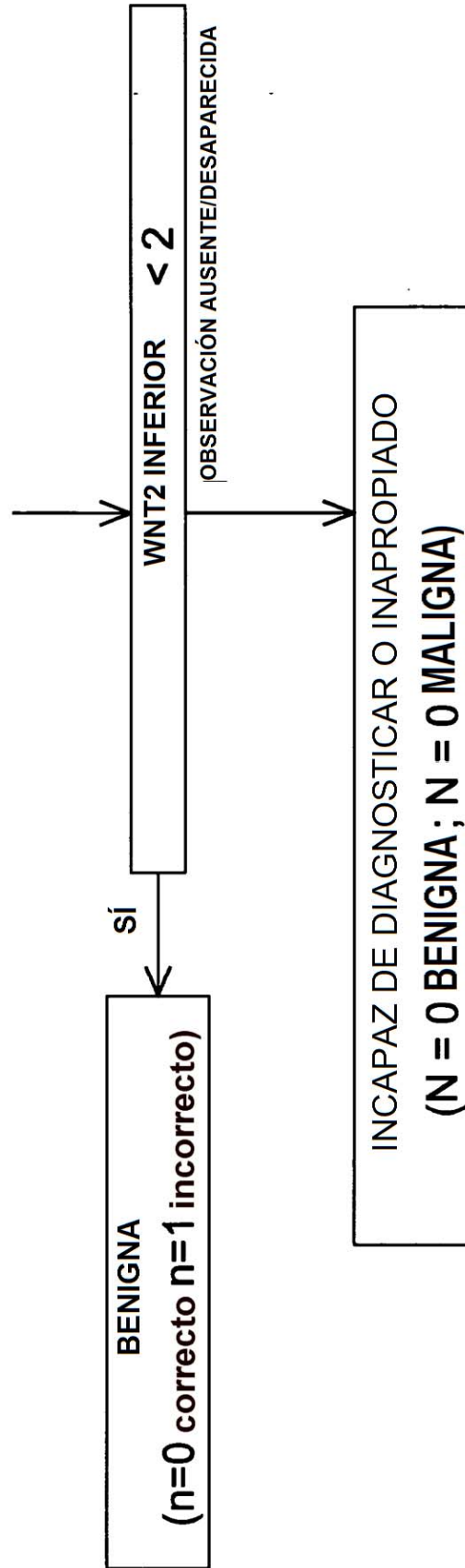


Fig. 16 hoja 6



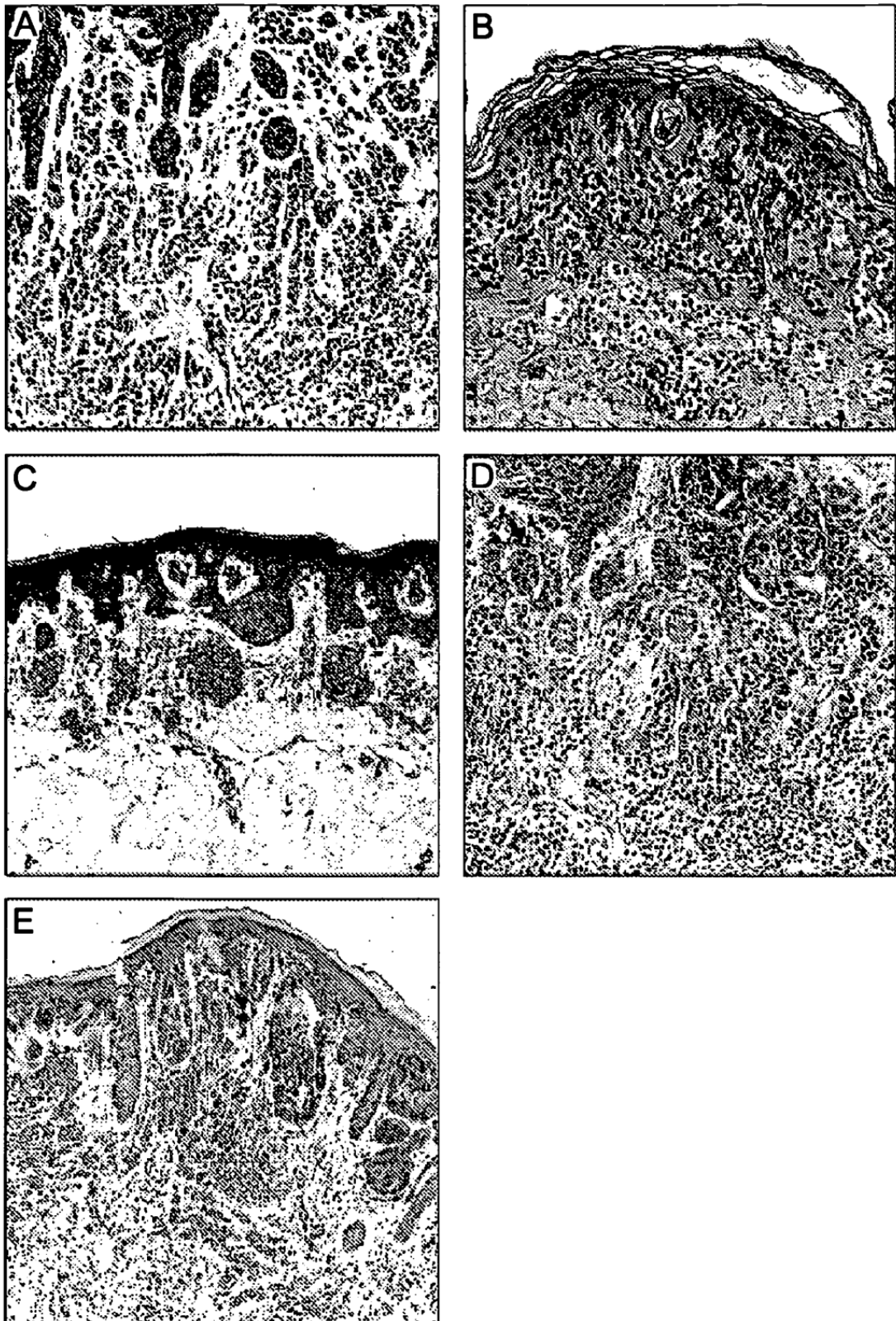


Fig. 17

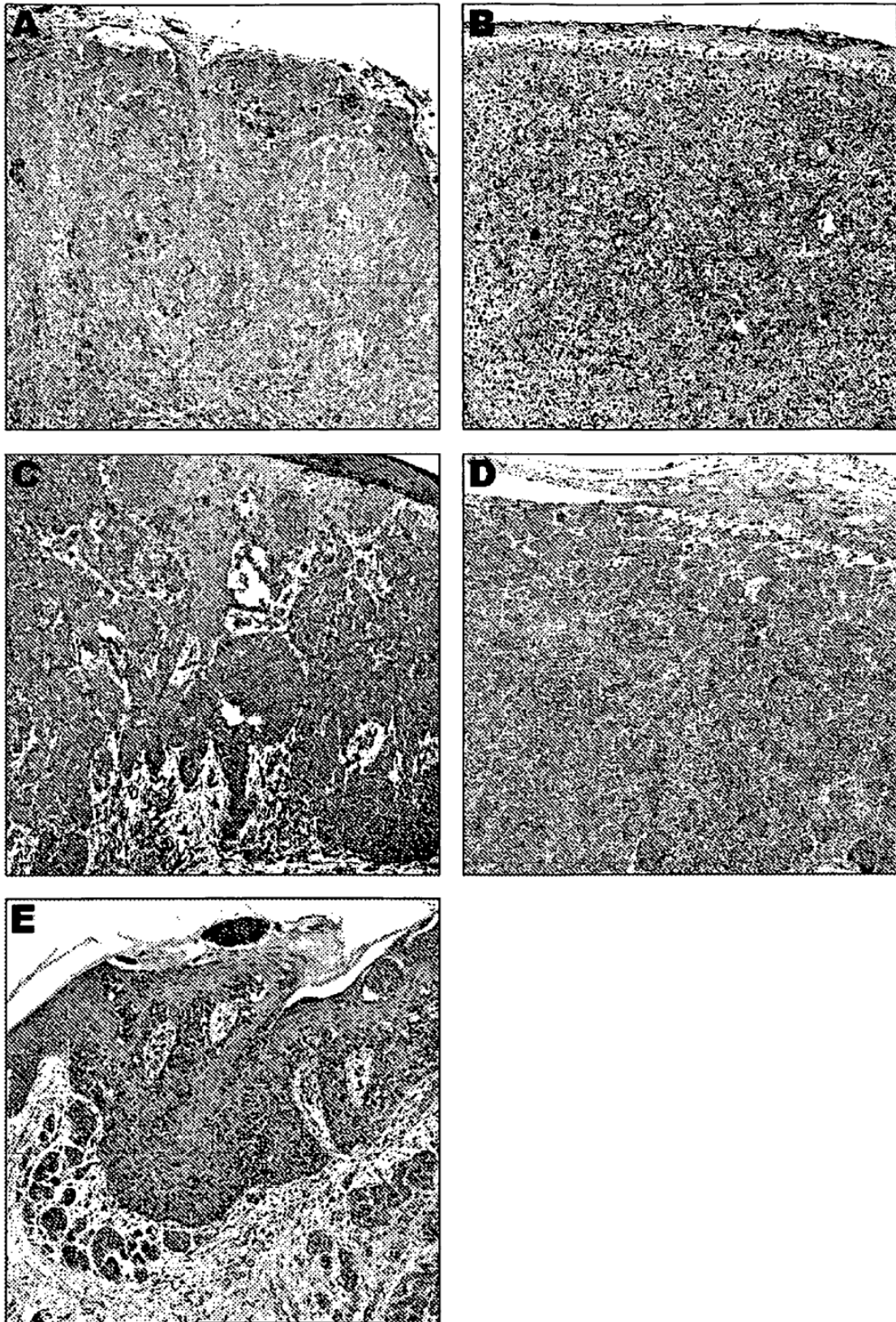


Fig. 18

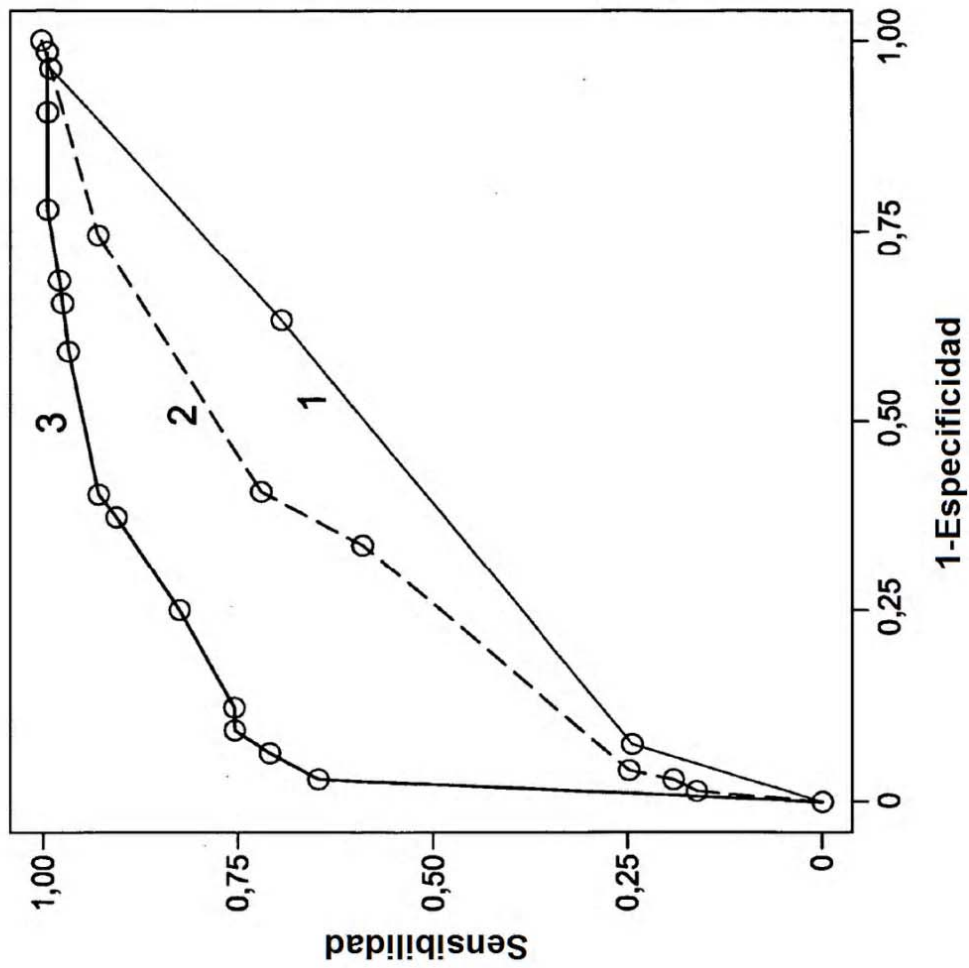


Fig. 19

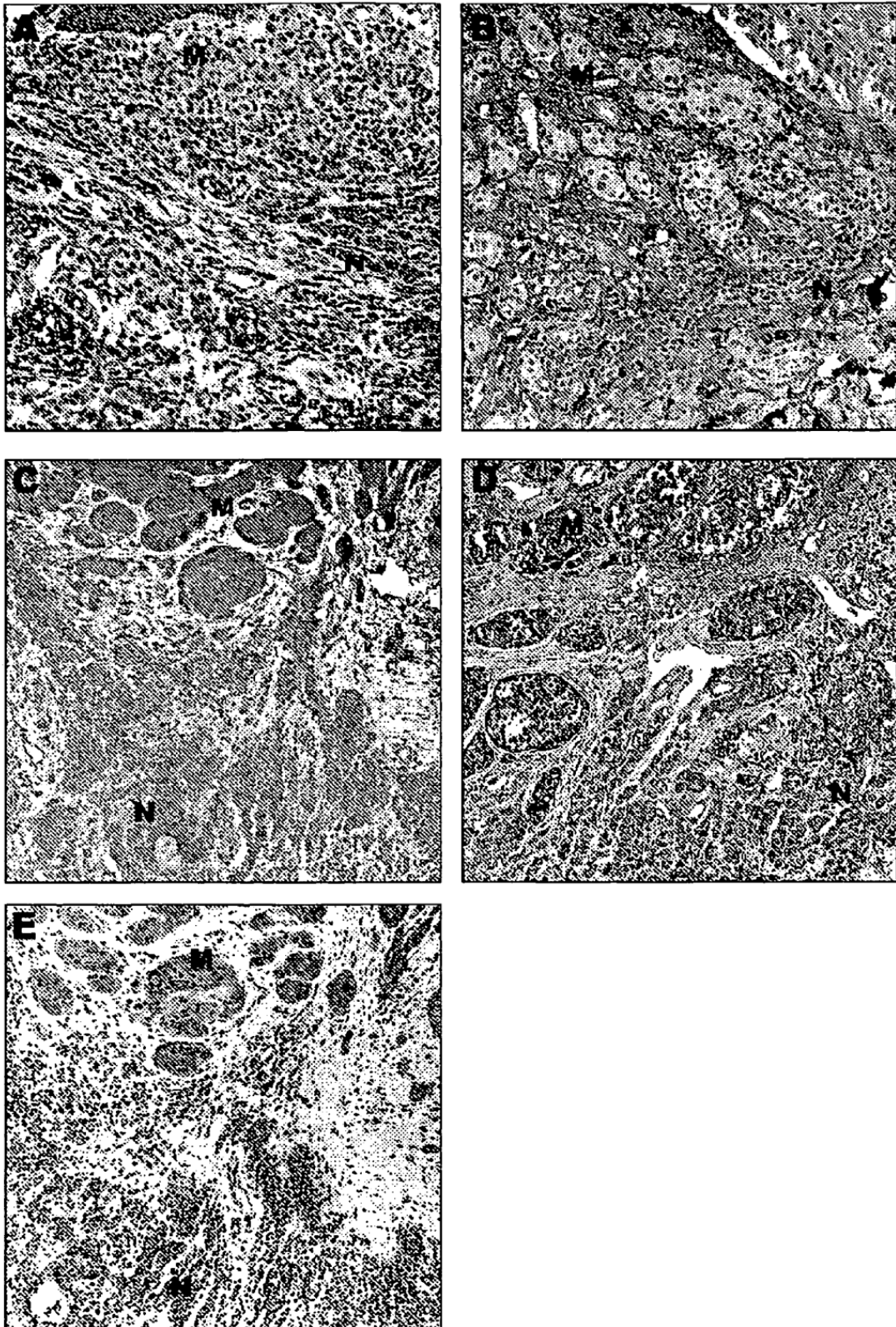


Fig. 20

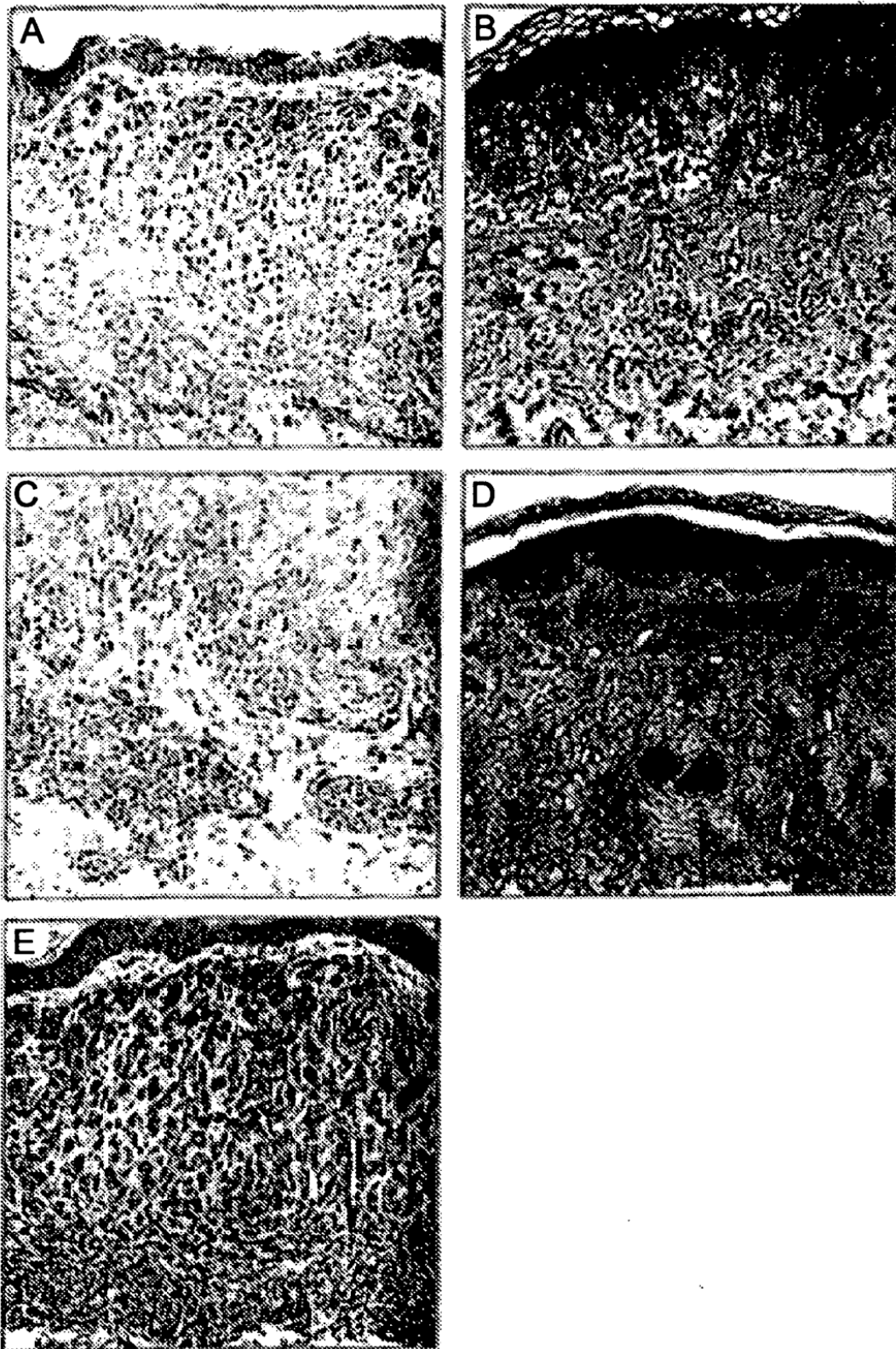


Fig. 21

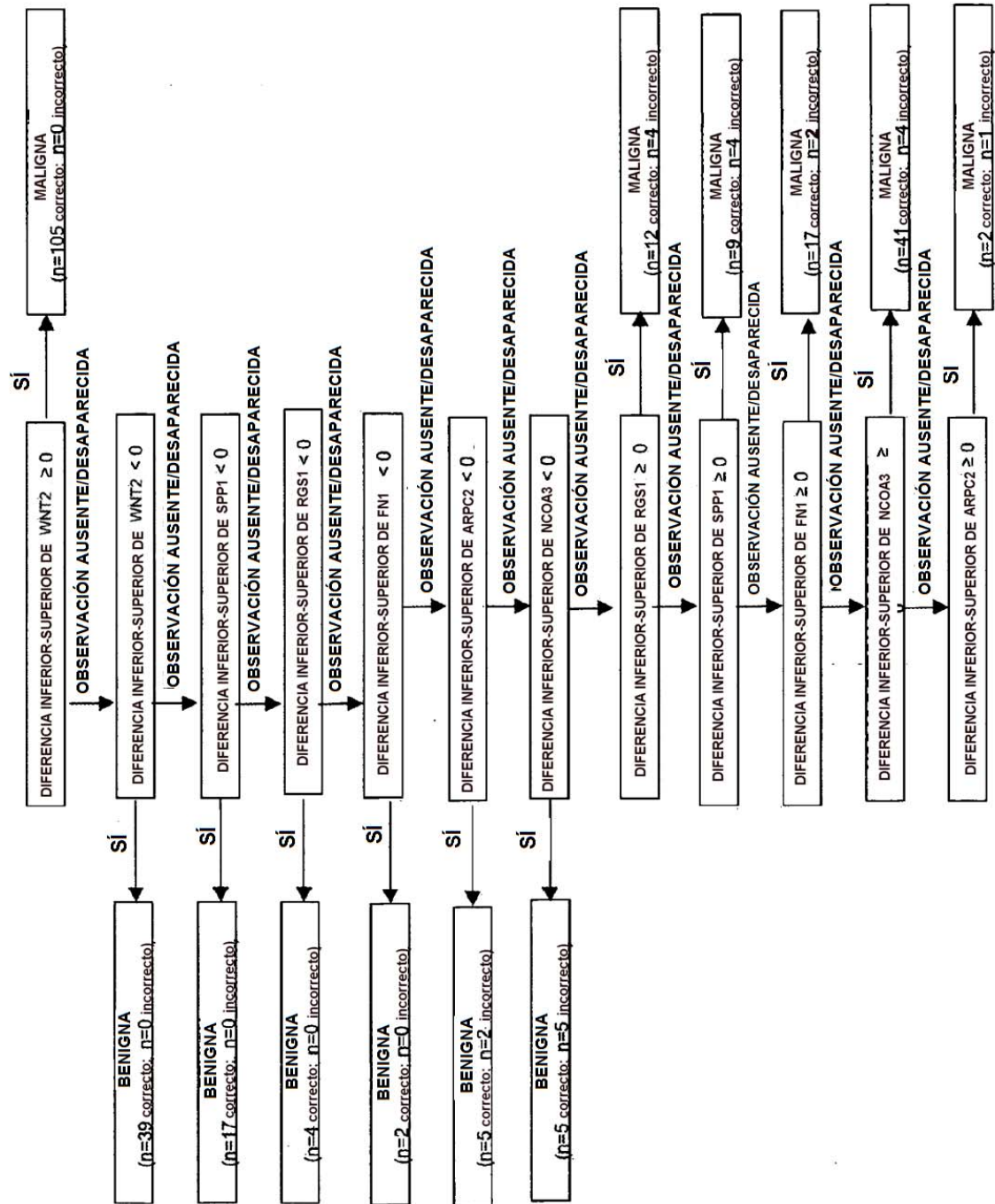


Fig. 22

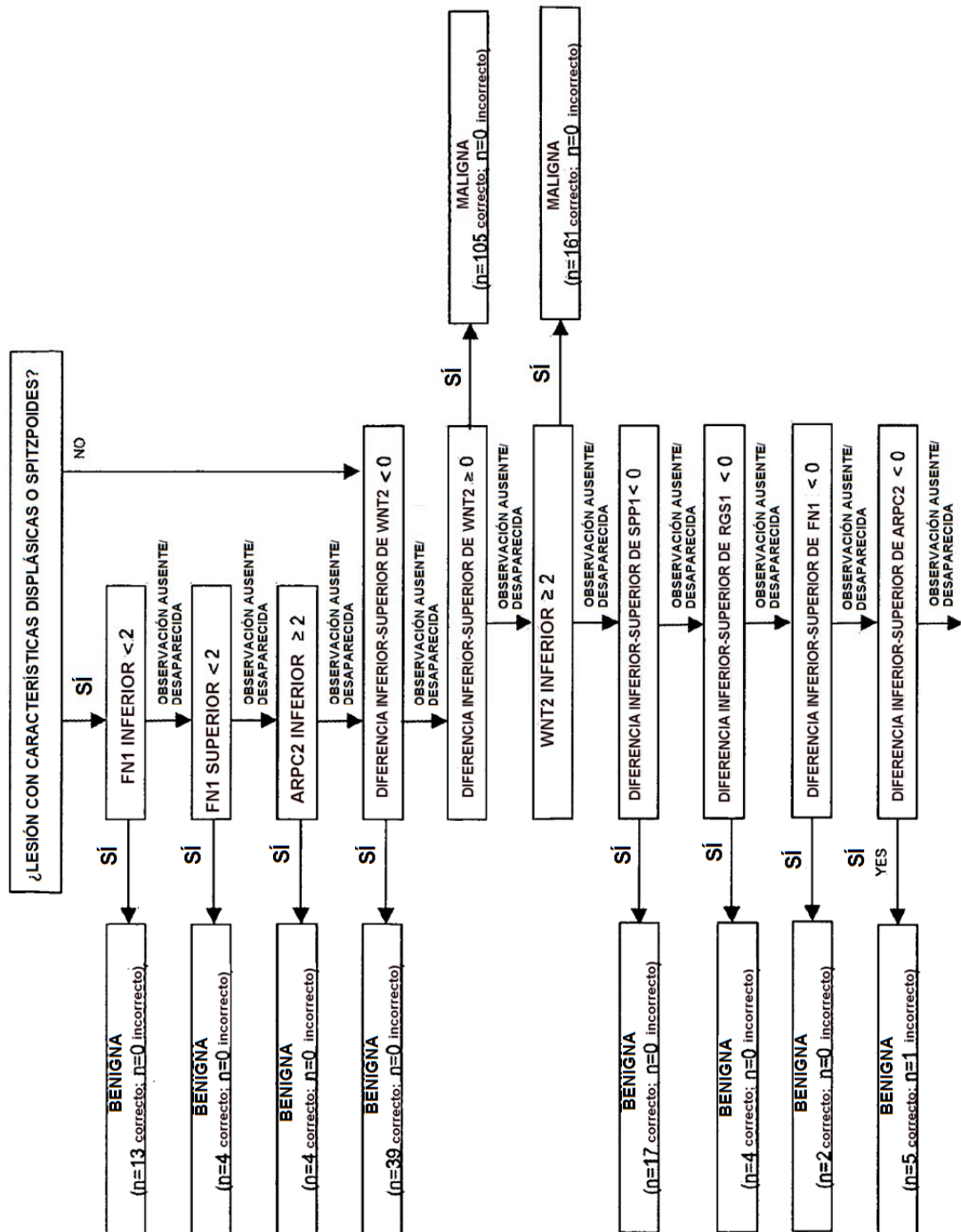


Fig. 23 hoja 1

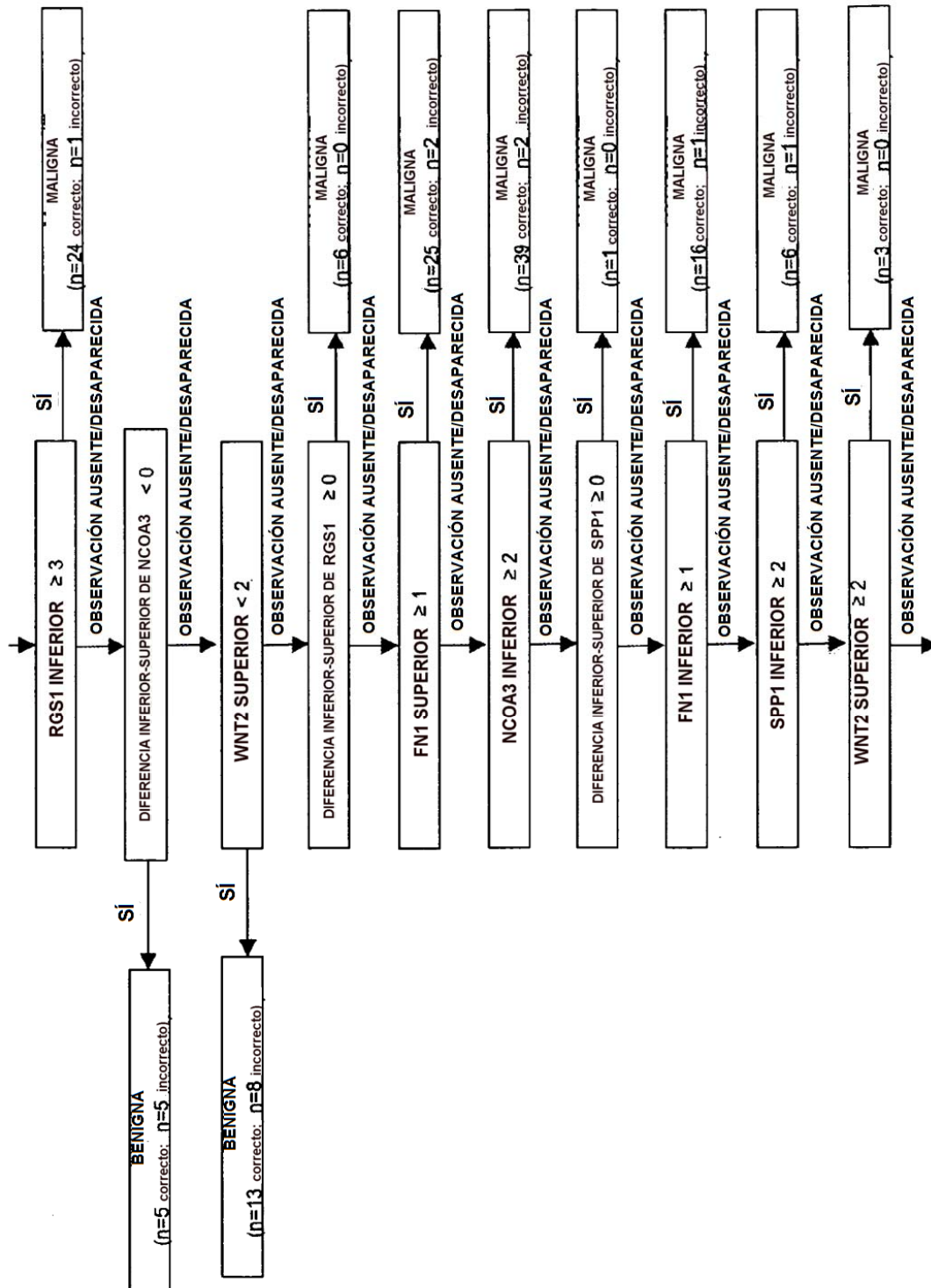


Fig. 23 hoja 2

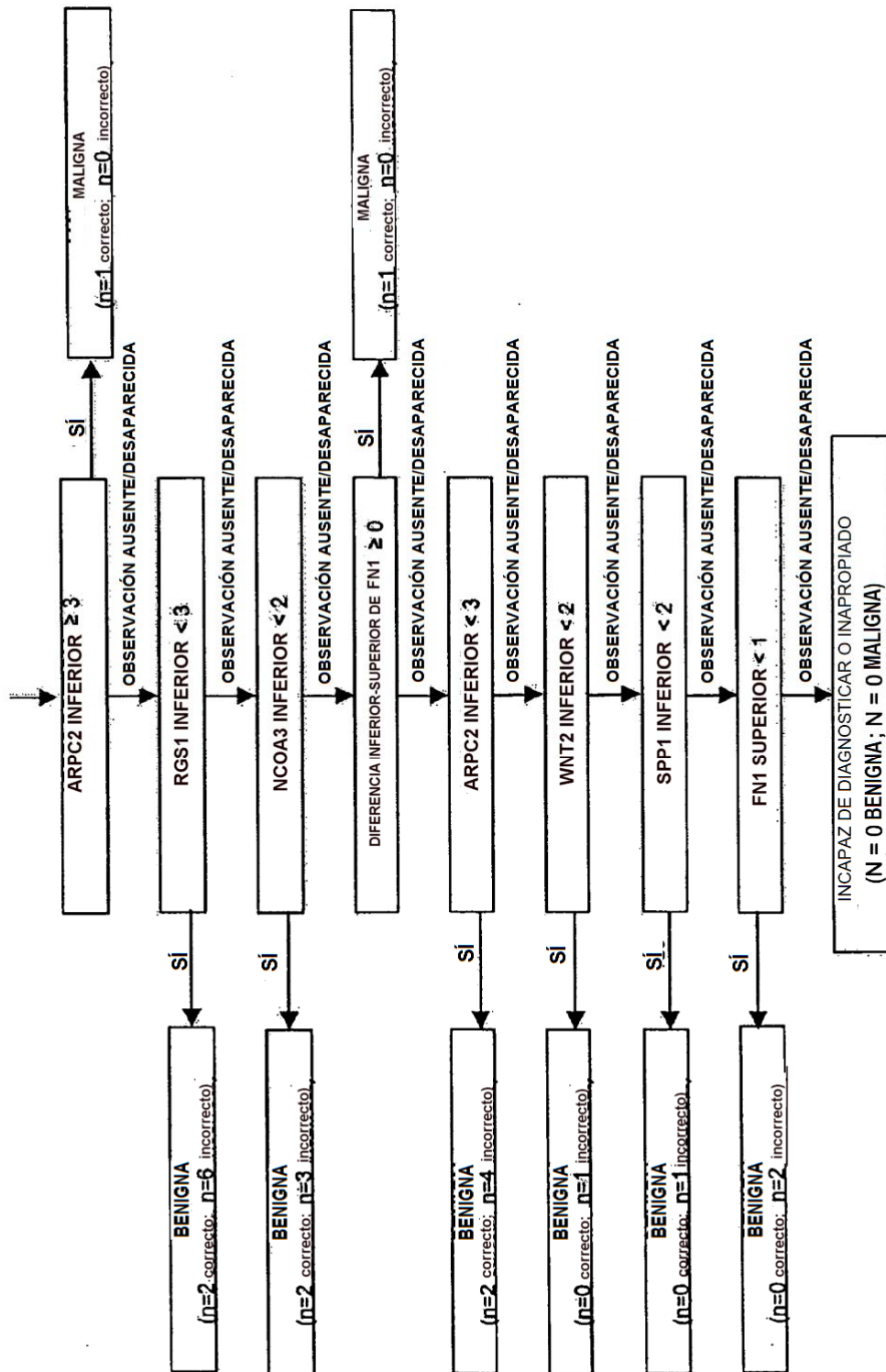


Fig.23 hoja 3