

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 142**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2007 E 07841998 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2062049**

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

30 Prioridad:

06.09.2006 US 842730 P

29.03.2007 US 908774 P

20.07.2007 US 951060 P

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

11.08.2014

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 2 484 142 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 del melanoma maligno

5 Antecedente de la invención

El melanoma es la quinta enfermedad maligna más común en Estados Unidos, cuya incidencia está aumentando más rápidamente que cualquier otra forma de cáncer. Actualmente, se espera que aproximadamente uno de setenta americanos desarrollará un melanoma durante su vida. El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos (células pigmentarias). Aunque la mayoría de los melanomas aparecen en la piel, este cáncer también puede aparecer en superficies mucosas o en otros sitios a los que migran las células de la cresta neural. Los melanomas que no se diseminan más allá de su sitio de origen son altamente curables y estas formas precoces son lesiones delgadas que no han invadido más allá de la dermis papilar. El tratamiento de tales melanomas localizados precozmente es la escisión con márgenes en proporción al microestadio de la lesión primaria. Algunos melanomas que se han diseminado a los ganglios linfáticos pueden ser curables con escisión amplia del tumor primario y extracción de los ganglios linfáticos regionales afectados. Por el contrario, las formas de melanoma más avanzadas presentan un alto riesgo de mortalidad por las metástasis. Cuando se producen las metástasis, las células cancerosas pueden diseminarse por medio de los ganglios linfáticos a sitios distantes tales como el hígado, pulmones, o cerebro. El pronóstico de los pacientes en los últimos estadios de esta enfermedad es malo con una media de supervivencia de seis a diez meses.

La capacidad de curar las formas precoces de melanoma emparejadas a su rápida conversión en una forma metastática incurable recalca la necesidad de métodos de diagnóstico más precisos tanto para la detección precoz de esta enfermedad como para tener mejores marcadores que sirvan como pronosticadores de la progresión de la enfermedad para tener al alcance estrategias médicas de tratamiento con mejor información. La resolución del problema de trazar estrategias terapéuticas apropiadas basadas en diagnósticos y pronósticos precisos es el hecho en el que los médicos han encontrado que el melanoma frecuentemente presenta un comportamiento clínico impredecible. Por ejemplo, aunque el espesor vertical del tumor primario es uno de los factores pronósticos más importantes que determinan la supervivencia, muchos pacientes con melanomas gruesos están libres de metástasis mientras que un pequeño grupo de pacientes con tumores delgados mueren de su enfermedad. Por lo tanto se necesitan marcadores mejores para mejorar los algoritmos pronósticos para diagnosticar de nuevo los pacientes con melanoma. Aunque se ha estudiado extensamente, no se utilizan factores moleculares de forma rutinaria en la evaluación diagnóstica y pronóstica de los pacientes con melanoma. Tales biomarcadores proporcionarían nuevas vías para la detección precoz del melanoma y constituirían dianas para la evaluación del riesgo del melanoma, así como dianas para el desarrollo de nuevos fármacos. Los métodos y composiciones de la presente invención proporcionan estas herramientas adicionales para la atención de los pacientes con melanoma.

Sheffield y col (2002), American Journal of Clinical Pathology, 118: 930-936 desvela la determinación de la sensibilidad y la especificidad de tres nuevos anticuerpos (factor de transcripción de microftalmia [Mitf], Melan-A, y tirosinasa) como marcadores para el melanoma en preparaciones citológicas. Estos marcadores se compararon con los marcadores utilizados habitualmente proteína S-100 y HMB-45.

Haqq y col. (2005), PNAS, 102: 6092-6097 desvela una comparación de los perfiles de expresión génica en una serie de nevos, melanomas primarios y metástasis de melanoma. Los resultados sugieren que la patogénesis del melanoma se puede entender como una serie de distintos eventos moleculares.

Carlson y col (2005), Journal of the American Academy of Dermatology, 52: 743-775 proporciona un análisis de los diagnósticos moleculares que pueden beneficiar potencialmente al paciente individual con melanoma.

50 Breve resumen de la invención

Generalmente, los métodos de esta invención tienen su uso particular en el diagnóstico de melanoma detectando Wnt-2, osteopontina (SPP1), ARPC2, RGS1 y Fibronectina 1 (FN1), que se expresan diferencialmente (regulados positivamente) en las células de melanoma y se correlacionan con la progresión del melanoma. Estos marcadores por tanto se pueden utilizar diagnósticamente para distinguir el melanoma de nevos benignos. En una realización se utilizan Wnt-2, ARPC2, SPP1, RGS1 y FN1 en un ensayo de cinco marcadores para distinguir los nevos benignos del melanoma.

También se proporcionan kits de diagnóstico que comprenden anticuerpos para la detección de los marcadores.

La invención por lo tanto proporciona un método de diagnóstico de melanoma en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con anticuerpos que se unen específicamente con un panel de marcadores que comprenden los polipéptidos RGS1, ARPC2, Fibronectina 1 (FN1), osteopontina (SPP1) y Wnt-2; y

(b) determinar si cada marcador seleccionado está o no sobre-expresado en la muestra; proporcionando de esta manera un diagnóstico de melanoma en el sujeto.

La presente invención también proporciona un kit para su uso en el diagnóstico de melanoma en un sujeto, comprendiendo el kit, anticuerpos que se unen específicamente a un panel de marcadores que comprenden los polipéptidos RGS1, ARPC2, Fibronectina 1 (FN1), osteopontina (SPP1) y Wnt-2.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Microfotografías de un melanoma primario que demuestra la ausencia de (panel A) e intensa (panel B) inmunotinción de NCOA3.

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

Figura 3: Panel superior. Inmunotinción de NCOA3 en un melanoma desmoplásico. Nótese la tinción marrón de las células escindidas. Panel inferior. Inmunotinción de NCOA3 en la metástasis en ganglios linfáticos del mismo paciente. Nótese la tinción difusa de las células tumorales en el centro.

Figura 4: Actividad antimetastática de ribozimas (Rz) y ARNsi que se dirigen contra NCOA3 murino. Se inyectaron células de melanoma B16-F10 en grupos de 10 ratones C57B1/6. Los días 3 y 10 después de la inyección se inyectaron por vía intravenosa lípidos catiónicos: complejos ADN que codifican secuencias del vector de control o dos ribozimas y ARNsi que están dirigidos a diferentes sitios del ARN NCOA3 murino. Los ratones se sacrificaron el día 25 y se analizaron para varios tumores metastáticos de pulmón. Las cuatro construcciones demostraron reducciones significativas en la carga de tumor metastático en comparación con el vector de control (4613) solo ($p < 0,05$).

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

Figura 6: Actividad anti-metastática de la ribozima 397 (Rz) que se dirige contra NCOA3 en el cáncer de mama murino. Se inyectaron células de carcinoma de mama 4T1 por vía intravenosa en grupos de 10 ratones BALB/c. Los días 3 y 10 después de la inyección se inyectaron vía intravenosa lípidos catiónicos: complejos de ADN que codifican secuencias del vector de control, Rz397, ARNsi385, y controles mutantes que contienen una mutación de base única en la ribozima (m-Rz397) o ARNsi (m-ARNsi385). Los ratones se sacrificaron el día 25 y se analizó el número de tumores metastáticos en pulmón. Los ratones tratados con Rz397 tenían significativamente menos tumores de pulmón que los ratones tratados con ARNsi685, m-Rz397, o con el vector control solo.

Figura 7: dirección contra el NCOA3 que suprime la invasión celular tumoral in vitro. Las células B16 se transfectaron con el vector solo, o con el vector que expresa Rzs397 o ARNsi385 que se dirigen contra NCOA3 murina y se determinó utilizando un ensayo en cámara de Boyden 24 h después de la transfección.

Figura 8: microfotografías de bajos aumentos (40x, panel A) y altos aumentos (100x, panel B) de inmunotinción de Wnt-2 en un nevo melanocítico compuesto, que muestra una tinción intensa en los nidos de nevo intraepidérmicos, con tinción disminuida en los nidos subepidérmicos y dérmicos.

Figura 9: microfotografías a bajos aumentos (40x, panel A) y altos aumentos (100x, panel B) de inmunotinción de Wnt-2 en un melanoma primario (4,1 mm de espesor, nivel de Clark IV) que demuestran tinción intensa de los grupos intraepidérmicos que invaden la dermis.

Figura 10: Actividad anti-metastática de una ribozima dirigida contra Wnt-2 (Mo-Wnt-2-Rz879). Las células de melanoma B16-F10 se inyectaron por vía intravenosa en grupos de 10 ratones C57B1/6. El día 7 después de la inyección se inyectaron por vía intravenosa complejos lípido catiónicos: ADN que codifican secuencias del vector de control o una ribozima dirigidos contra un ARN Wnt-2 diferente murino. Los ratones se sacrificaron el día 25 y se analizó el número de tumores metastáticos en pulmón. La ribozima anti-Wnt-2 demostraba reducciones significativas de la carga metastática en comparación con el vector de control (4613) solo ($p = 0,0006$).

Figura 11: Microfotografías de bajos aumentos (40x, panel A) y altos aumentos (100x, panel B) de inmunotinción de Wnt-2 de un melanoma primario que aparecía a partir de un nevo, que muestran un melanoma intensamente teñido (M) tanto en sus componentes de confluencia como dérmico, con ausencia de tinción en un nevo congénito dérmico subyacente (N).

Figura 12: Actividad anti-metastática de ribozimas (Rz) y ARNsi dirigidos contra PHIP murino. Se inyectaron células de melanoma B16-F10 por vía intravenosa en grupos de 10 ratones C57B1/6. Los días 3 y 10 después de la inyección, se inyectaron por vía intravenosa complejos lípido catiónicos: ADN que codificaban secuencias del vector de control o tres ribozimas y ARNsi que se dirigían a diferentes sitios del ARN PHIP murinos. Los

ratones se sacrificaron el día 25 y se analizó el número de tumores metastáticos en pulmón. Dos ribozimas (Rz122 y Rz314) y una construcción de ARNsi (ARNsi723) demostraron reducciones significativas en la carga tumoral metastática en comparación con el vector de control (4613) solo ($p < 0,05$).

Figura 13: La dirección contra PHIP suprime la invasión celular tumoral in vitro. Las células B16 se transfectaron con el vector de expresión Rz314 o ARNsi385 que se dirigían contra el PHIP murino, y se determinó la invasión utilizando un ensayo en cámara de Boyden 24 h tras la transfección. Había una supresión significativa por la Rz314 de la invasión por B16 al compararse con una ribozima mutante incapacitada (mRz314), y por ARNsi723 cuando se comparaba con varios ARNsi controles inactivos.

Figura 14: Determinación del número de copias del gen NCOA3 en el melanoma por hibridación fluorescente in situ (FISH).

Figura 15: gráfico ROC en el diagnóstico de melanoma por el ensayo multi-marcador utilizando los valores de intensidad de marcador combinado para los cinco marcadores.

Figura 16: Algoritmo diagnóstico utilizado para los grupos de entrenamiento y validación que combinan los valores de intensidad del marcador así como diferencias de arriba a abajo. Para cada etapa diagnóstica en el algoritmo se incluyen el número de observaciones correctas e incorrectas en el grupo de entrenamiento.

Figura 17A-E: Microfotografías representativas de la inmunotinción de ARPC2 (panel A), FN1 (panel B), RGS1 (panel C), SPP1 (panel D) y Wnt-2 (panel E) en nevos benignos.

Figura 18 A-E: Microfotografías representativas de inmunotinción de ARPC2 (panel A), FN1 (panel B), RGS1 (panel C), SPP1 (panel D) y Wnt-2 (panel E) en melanomas.

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

Figura 20 A-E: Microfotografías representativas de inmunotinción de ARPC2 (panel A), FN1 (panel B), RGS1 (panel C), SPP1 (panel D) y Wnt-2 (panel E) en melanomas que aparecen en asociación con nevos, donde M representa el melanoma y N representa el nevo.

Figura 21 A-E: Inmunotinción de neoplasias melanocíticas mal diagnosticadas y diagnosticadas correctamente por cada uno de los cinco marcadores. A) tinción de ARPC2 en un melanoma no ulcerado de una mujer de 44 años de edad con un grosor de 0,76 mm nivel III de Clark, diagnosticado como nevo benigno; B) tinción de FN1 en un nevo displásico en una mujer de 29 años, diagnosticado inicialmente como un melanoma de nivel II de Clark de 0,25 mm; C) Tinción de RGS1 en una mujer de 21 años con melanoma metastático estadio IV con una lesión diagnosticada inicialmente como una proliferación melanocítica intraepidérmica atípica; D (tinción de SPP1 en un varón de 46 años de edad con un melanoma desmoplásico no ulcerado de 0,8 mm, nivel Clark 4, diagnosticado inicialmente como un nevo de Spitz; E) tinción Wnt-2 en una mujer de 44 años de edad con un melanoma no ulcerado de 0,76 mm, nivel III de Clark, diagnosticado inicialmente como un nevo benigno.

Descripción detallada de la invención

INTRODUCCIÓN

A pesar de la extensa investigación, no se usa rutinariamente ningún marcador molecular para la evaluación diagnóstica y pronóstica de pacientes con melanoma. Un prerrequisito para el desarrollo de tales marcadores es el conocimiento de los genes que se expresan diferencialmente en las células de melanoma.

Los inventores determinaron que los genes Wnt-2, NCOA3, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2, G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1 alfa, Bfl1/proteína A1 relacionada con Bcl-2, Fibronectina 1, y POU5F1/Oct3/4 muestran una expresión diferencial en melanoma.

Como se detalla posteriormente, estos genes muestran patrones de expresión distintivos que son característicos de diferentes aspectos de la progresión del melanoma, y por tanto, se pueden utilizar para diagnosticar y emitir un pronóstico de los diferentes estadios del cáncer. Por ejemplo, los datos revelan que NCOA3 es un buen indicador de metástasis del melanoma a los ganglios linfáticos regionales, la recaída de la enfermedad y la muerte, mientras que Wnt-2 puede ser un marcador diagnóstico para los nevos benignos frente al melanoma maligno. Los datos también revelan que NCOA3 se puede utilizar como predictor de una subclase de melanoma desmoplásico que metastatizará a ganglios linfáticos regionales. Estos resultados revelan que los marcadores desvelados en el presente documento se pueden utilizar solos o en combinación para proporcionar herramientas más definitivas para el diagnóstico y pronóstico para el médico.

Además, las proteínas codificadas por estos genes se expresan diferencialmente en melanomas.

En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para el diagnóstico del melanoma basándose en la sobre-expresión de Wnt-2, osteopontina, ARPC2, RGS1 y Fibronectina 1 en las células de melanoma. Los marcadores se utilizan en combinación como un panel de marcadores. La invención también proporciona kits para el diagnóstico de melanoma que comprende anticuerpos para detectar los marcadores.

DEFINICIONES

El melanoma es una forma de cáncer que comienza en los melanocitos, las células que producen pigmentos. Aunque se produce frecuentemente en la piel, el melanoma se puede producir también en el ojo y raramente en las membranas de los conductos nasales, oral, mucosa faríngea, mucosa vaginal y anal. El Comité Conjunto Americano del Cáncer (AJCC) ha trazado un sistema de clasificación de melanomas en 4 estadios (con muchos subestadios) que se basa en criterios patológicos y tasas de supervivencia. El melanoma puede producirse a partir de lunares o nevos benignos en la piel y progresar a través de los estadios definidos por el sistema de estadificación del AJCC. Véase por ejemplo, Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper y col., 16ª Ed., 2005, para antecedentes adicionales.

El término "marcador" se refiere a una molécula (típicamente de proteína, ácido nucleico, hidrato de carbono, o lípido) que se expresa en las células, se expresa en la superficie de una célula cancerosa o la segregan las células cancerosas en comparación con una célula normal, y que es útil para el diagnóstico del cáncer, para proporcionar un pronóstico. Tales marcadores son moléculas que se expresan diferencialmente, por ejemplo, sobre-expresadas o bajo-expresadas en un melanoma y otra célula cancerosa en comparación con una célula normal, por ejemplo, una expresión de 1 vez más o menos, una expresión de 2 veces más o menos, una expresión de 3 veces más o menos o más 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 por una célula cancerosa, por ejemplo, una molécula que contiene eliminaciones, adiciones o mutaciones en comparación con la molécula expresada en una célula normal.

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

Como se utiliza en el presente documento, "un marcador de evaluación de un melanoma" se refiere a un marcador expresado diferencialmente en las células de melanoma y se refiere equivalentemente a un polipéptido o ácido nucleico que codifica un polipéptido o una parte del polipéptido.

Una "muestra biológica" incluye secciones de tejidos tales como una biopsia y muestras de autopsia, y secciones congeladas tomadas con fines histológicos. Tales muestras incluyen muestras de piel, muestras de superficies mucosas, sangre y partes o productos de sangre (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, heces, orina, etc. Una muestra biológica típicamente se obtiene de un organismo eucariótico, más preferentemente de un mamífero tal como un primate, por ejemplo un chimpancé o un ser humano; una vaca; un perro; gato; un roedor, por ejemplo, una cobaya, rata, ratón, conejo.

Una "biopsia" se refiere al proceso de retirar una muestra de tejido para su evaluación diagnóstica o pronóstica, y al especimen de tejido en sí mismo. Se puede aplicar cualquier técnica de biopsia conocida en la técnica para los métodos diagnósticos y pronósticos descritos en el presente documento. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido que se va a evaluar (por ejemplo, piel, superficie mucosa, etc.), el tamaño y tipo de tumor (por ejemplo, sólido o suspendido, sangre o ascitis), entre otros factores. Las técnicas de biopsia representativas incluyen, pero no se limitan a estas, biopsia escisional, biopsia incisional, biopsia por aguja, biopsia quirúrgica. Una "biopsia escisional" se refiere a retirar una masa tumoral entera con un pequeño margen de tejido normal alrededor. Una "biopsia incisional" se refiere a retirar una cuña de tejido que incluye una sección del diámetro del tumor. Un diagnóstico o pronóstico realizado por endoscopia o fluoroscopia puede requerir una "biopsia con aguja del centro" de la masa tumoral o una "biopsia por aspiración con aguja fina" que generalmente contiene una suspensión de células del interior de la masa tumoral. Las técnicas de biopsia se tratan, por ejemplo en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, y col., eds., 16ª Ed., 2005, Capítulo 70, y toda la Parte V.

Los términos "sobre-expresa", "sobre-expresión" o "sobre-expresado" de manera intercambiable se refieren a una proteína o ácido nucleico que se transcribe o traduce a un nivel detectable mayor, normalmente en una célula cancerosa, en comparación con una célula normal, un nevo, o un cáncer primario. El término incluye la sobre-expresión debido a la transcripción, un procesamiento post-transcripcional, traducción, un procesamiento post-traduccion, localización celular (por ejemplo, orgánulos, citoplasma, núcleo, superficie celular), y estabilidad de ARN y proteínas, cuando se comparan con una célula normal. La sobre-expresión se puede detectar utilizando técnicas convencionales para detectar ARNm (es decir RT-PCR, PCR, hibridación) o proteínas (es decir, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas). La sobre expresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con una célula normal. En ciertos casos, la sobre-expresión es de niveles de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces más altos de transcripción o traducción en comparación con una célula normal. La sobre-expresión puede incluir también cualquier expresión en una célula de la muestra cuando se compara con la ausencia de

expresión en una célula normal.

Los términos “bajo-expresa”, “bajo-expresión” o “bajo-expresado” de manera intercambiable se refiere a una proteína o ácido nucleico que se transcribe o traduce a un nivel detectable más bajo, normalmente en una célula cancerosa, en comparación con una célula normal, un nevo o un cáncer primario. El término incluye la bajo-expresión debido a transcripción, procesamiento post-transcripcional, traducción, procesamiento post-traducciona, localización celular (por ejemplo, orgánulos, citoplasma, núcleo, superficie celular), y estabilidad de ARN y proteína, cuando se compara con una célula normal. La bajo-expresión se puede detectar utilizando técnicas convencionales para detectar ARNm (es decir, RT-PCR, PCR, hibridación) o proteínas (es decir, ELISA, técnicas inmunohistoquímicas). La bajo-expresión puede ser del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, etc. en comparación con una célula normal. En ciertos casos, la bajo-expresión es de niveles de 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces o más bajos de transcripción o traducción en comparación con una célula normal. La bajo-expresión también puede incluir la ausencia de expresión en una célula de una muestra cuando se compara 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).

“Cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” o “cantidad o dosis suficiente” en el presente documento significa una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del objetivo del tratamiento, y será discernible para un experto en la técnica utilizando 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 de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la mismas o que tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (es decir, aproximadamente del 60% de identidad, preferentemente del 65%, 70%, 75%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 99% , o mayor identidad sobre una región especificada, cuando se comparan y se alinean para la máxima correspondencia sobre una ventana de comparación o región designada) tal como se mide utilizando un algoritmo de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos posteriormente, o por el alineamiento manual y la inspección visual (véase, por ejemplo, el sitio de internet de NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> o similares). De tales secuencias se dice entonces que son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere, o se puede aplicar, al complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que tienen eliminaciones y/o adiciones, así como las que tienen sustituciones. Como se describe posteriormente, los algoritmos preferidos pueden tener en cuenta huecos y similares. Preferentemente, la identidad existe en una región que tiene al menos 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferentemente sobre una región que tiene de 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se meten en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmos de secuencia. Preferentemente, se pueden utilizar los parámetros por defecto del programa, o se pueden fijar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencia de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación” como se utiliza en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de cualquiera cantidad de posiciones contiguas seleccionadas de entre el grupo que consiste de entre 20 a 600, normalmente aproximadamente 50 a aproximadamente 200, más normalmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en los que una secuencia se puede comparar a una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente. Los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación se conocen bien en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math- 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento 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. EE.UU 85: 2444 (1988), por aplicaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA del paquete de Software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular, Biology (Ausubel y col., eds. 1987-2005, Wiley Interscience)).

Un ejemplo preferido de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschui y col., Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1977) y Altschui y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se

utilizan, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para llevar a cabo el análisis BLAST está disponible públicamente por medio del Centro Nacional para la Información en Biotecnología (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero la identificación de los pares de secuencias con valor más alto (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que se empareja o satisface algún umbral evaluado como positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una base de datos de secuencias. T se refiere al umbral de valoración de la vecindad de una palabra (Altschui y col., supra). Estas posiciones iniciales de la vecindad de una palabra actúan como la base para iniciar las búsquedas para encontrar HSP más largas que las contengan. Los resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre y cuando se pueda acumular la valoración de alineamiento. La acumulación de valoraciones se calcula utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (valoración que se busca para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (valoración de falta para restos que no se emparejan; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos se utiliza una matriz de valoración para calcular el valor acumulativo. La extensión de las palabras clasificadas en cada dirección se para cuando: el valor acumulativo de alineamiento decae por la cantidad X desde que se alcanza su valor máximo; el valor acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de valor negativo; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST, W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para las secuencias de nucleótidos) utiliza como valores por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores por defecto una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de valoración BLOSUM62 (véase, Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 89: 10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas cadenas.

“Ácido nucleico” se refiere a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma sea de cadena sencilla o doble, y complementos de los mismos. El término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos con estructura o uniones modificados, que son sintéticos, que se producen naturalmente, y que no se producen naturalmente, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosfoamidatos, metil fosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos nucleicos péptidos (PNA).

“Molécula de ARNi” o un “ARNsi” se refiere a un ácido nucleico que forma un ARN de doble cadena, cuyo ARN de doble cadena tiene la capacidad de reducir o inhibir la expresión de un gen o un gen diana cuando se expresa el ARNsi en la misma célula que el gen o gen diana. “ARNsi” por tanto se refiere al ARN de doble cadena formado por cadenas complementarias. Las partes complementarias del ARNsi que se hibridan para formar la molécula de doble cadena típicamente tienen una identidad sustancial o idéntica. Un ARNsi se puede referir a un ácido nucleico que tiene una identidad sustancial o completa con un gen diana y forma un ARNsi de doble cadena. La secuencia de ARNsi puede corresponderse con la longitud completa del gen diana, o con una subsecuencia del mismo. Típicamente, el ARNsi tiene al menos 15-50 nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNsi tiene 15-50 nucleótidos de longitud, y el ARNsi de doble cadena tiene aproximadamente 15-50 pares de bases de longitud, preferentemente aproximadamente 20-30 bases de nucleótidos, preferentemente aproximadamente 20-25 nucleótidos de longitud, por ejemplo 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud).

Un polinucleótido “antisentido” es un polinucleótido que es sustancialmente complementario a un polinucleótido diana y que tiene la capacidad de hibridarse específicamente al polinucleótido diana.

Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la escisión específica de ARN. La composición de moléculas de ribozima incluye preferentemente una o más secuencias complementarias a un ARNm diana, y la bien conocida secuencia catalítica responsable de la escisión de ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente (véase por ejemplo la Pat. de EE. UU. N° 5.093.246). Las moléculas de ribozimas diseñadas para escindir catalíticamente transcripciones de ARNm diana también se pueden utilizar para evitar la traducción de ARNm dianas objetivos.

A menos de que se indique otra cosa, una secuencia de ácido nucleico en particular también engloba implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codón degenerado se pueden conseguir generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituyen con bases mezcladas y/o restos de desoxiinosina (Batzer y col., Nucleic Acid Res. 19: 5081 (1991); Ohtsuka y col., J. Biol. Chem. 260: 2605-2608 (1985); Rossolini y col., Mol. Cell. Probes 8: 91-98 (1994)). El término ácido nucleico se utiliza de manera intercambiable con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido, y polinucleótido.

Una secuencia de ácido nucleico particular también engloba implícitamente “variantes de empalme” y secuencias de ácidos nucleicos que codifican formas truncadas de antígenos del cáncer. De manera similar, una proteína particular que es codificada por un ácido nucleico engloba implícitamente cualquier proteína codificada por una variante de

empalme o forma truncada de ese ácido nucleico. “Variantes de empalme” como su nombre sugiere, son productos de empalme alternativo de un gen. Después de la transcripción, una transcripción de un ácido nucleico inicial se puede empalmar tal que los productos del empalme de ácido nucleico (alternativo) codifican polipéptidos diferentes. Los mecanismos para la producción de variantes empalmadas varían, pero incluyen empalmes alternos de exones.

Los polipéptidos alternativos derivados del mismo ácido nucleico por medio de lectura de la transcripción también se engloban en esta definición. Cualquier producto de la reacción de empalme, incluyendo las formas recombinantes de productos de empalme, se incluyen en esta definición. Los ácidos nucleicos se pueden truncar en el extremo 5' o en el extremo 3'. Los polipéptidos pueden truncarse en el extremo N o en el extremo C. Las versiones truncadas de las secuencias de ácido nucleico o polipéptido pueden producirse naturalmente o se crean recombinantemente.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un químico artificial mimético de un aminoácido correspondiente que se produce naturalmente, así como los polímeros de aminoácidos que se producen naturalmente y polímeros de aminoácidos que se producen no naturalmente.

El término “aminoácido” se refiere a aminoácidos que se producen naturalmente y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos que se producen naturalmente. Los aminoácidos que se producen naturalmente son los que se codifican por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se han modificado posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce naturalmente, es decir, un carbono α que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Tales análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras de péptido modificadas, pero que mantienen la misma estructura química básica que un aminoácido que se produce naturalmente. Los aminoácidos miméticos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente a la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a un aminoácido que se produce naturalmente.

Los aminoácidos se pueden designar en el presente documento mediante cualquiera de sus símbolos comúnmente conocido de tres letras o por otros símbolos de letras recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la UIPAC-IUB. Los nucleótidos, por otra parte, se pueden denominar por sus códigos comúnmente aceptados de una sola letra.

“Variantes modificadas conservadoramente” se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos en particular, las variantes modificadas conservadoramente se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, para secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican una proteína determinada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU todos codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, para cada posición donde la alanina está especificada por un codón, se puede alterar el codón con cualquiera de los codones correspondientes descritos sin que se altere el polipéptido codificado. Las variaciones de ácido nucleico son “variaciones silentes”, que son una especie de variaciones modificadas conservadoramente. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para la metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para el triptófano) se puede modificar para dar lugar a una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silente de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícitamente en cada secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no con respecto a las secuencias de la sonda actual.

Como con las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones individuales, eliminaciones o adiciones en un ácido nucleico, péptido, polipéptido, o secuencia proteica que altera, añade o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos de la secuencia codificada es una “variante modificada conservadoramente” donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora proporcionan los aminoácidos funcionalmente similares que se conocen bien en la técnica. Tales variantes modificadas conservadoramente son además de y no excluyen variantes polimórficas, homólogas interespecies y alelos que se describen en el presente documento.

Cada uno de los siguientes ocho grupos contienen aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre ellos: 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).

Una “marca” o un “resto detectable” es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, las marcas útiles incluyen ^{32}P , colorantes fluorescentes, reactivos electron-densos, enzimas (por ejemplo, como las que se utilizan comúnmente en ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que se pueden hacer detectables, por ejemplo, incorporando

una radiomarca en el péptido o que se utiliza para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el péptido.

El término “recombinante” cuando se utiliza en 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 introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o proteína, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o que expresan genes que de otra manera estarían expresados anormalmente, bajo-expresados o no expresados en absoluto.

La frase “condiciones rigurosas de hibridación” se refiere a condiciones bajo las cuales una sonda hibridará su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a altas temperaturas. Una guía extensa de la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra 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 ser aproximadamente 5-10 °C más bajas que el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica como se define por la fuerza iónica, pH. El T_m es la temperatura (bajo una determinada fuerza iónica, pH y concentración de ácidos nucleicos) a la que el 50% de las sondas complementarias a las diana se hibridan a la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es la menos dos veces la de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5x SSC, y SDS al 1%, incubando a 42 °C, o, 5x SSC, 1% SDS, incubando a 65 °C, con lavados en 0,2x SSC, y 0,1% de SDS a 65 °C.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan unos con otros bajo condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico utilizando el máximo de degeneración de codón permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos típicamente se hibridan bajo condiciones moderadamente rigurosas. Ejemplarmente “condiciones de hibridación moderadamente rigurosas” incluyen una hibridación en un tampón con un 40% de formamida, NaCl 1 M, un 1% de SDS a 37 °C, y un lavado en 1x SSC a 45 °C. Una hibridación positiva es al menos dos veces la de fondo. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que se pueden utilizar condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similares. Pautas adicionales para la determinación de los parámetros de hibridación se proporcionan en numerosas referencias, por ejemplo en *Current Protocols in Molecular Biology*, ed. Ausubel, y col., supra.

Por 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 alta rigurosidad de amplificación por PCR, es típica una temperatura de aproximadamente 62 °C, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar desde aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud del cebador y la especificidad. Condiciones de ciclo típicas para ambas rigurosidades alta y baja de amplificaciones incluyen una fase de desnaturalización de 90 °C-95 °C durante 30 seg- 2 min, una fase de hibridación que dura 30 seg-2 min, y una fase de extensión a aproximadamente 72 °C durante 1-2 min. Los protocolos y directrices para las reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad se proporcionan, por ejemplo, en Innis y col. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc, N.Y.).

“Anticuerpo” se refiere a un polipéptido que comprende una región estructural de un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo, que reconoce y se une específicamente a un antígeno. Los genes inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa, gama, delta, épsilon, y mu, así como miríadas de genes de regiones variables. Las cadenas ligeras se clasifican como o bien kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de unión al antígeno de un anticuerpo será la más crítica en la especificidad y afinidad de unión. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, derivados del suero, un hibridoma o clonado recombinantemente, y puede también ser quimérico, primatizado o humanizado.

Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ejemplar comprende un tetrámero. Cada tetrámero se compone de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena “ligera” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (de aproximadamente 50-70 kDa). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables primariamente del reconocimiento del antígeno. Las expresiones cadena variable ligera (VL) y cadena variable pesada (VH) se refieren a estas cadenas ligera y pesada respectivamente.

Los anticuerpos se encuentran, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por la digestión con varias peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo la pepsina digiere un anticuerpo bajo uniones disulfuro en la región de bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que en sí misma es una cadena ligera unida a VH-CH1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ se puede reducir bajo condiciones medias para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo de esta manera el dímero $F(ab)'_2$ en monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente el Fab con parte de la región bisagra (véase Fundamental Immunology (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque varios fragmentos de anticuerpo se definen en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar de novo sea químicamente o utilizando una metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se utiliza en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo que se produce sea por modificación de anticuerpos enteros o aquéllos sintetizados de novo utilizando metodologías de ADN recombinantes (por ejemplo, cadena Fv única) o aquellos identificados utilizando bibliotecas de fagos de presentación (véase, por ejemplo, McCafferty y col., Nature 384: 552-554 (1990)).

El anticuerpo puede estar conjugado con un resto "efector". El resto efector puede ser cualquier cantidad de moléculas incluyendo restos de marcado tales como marcas radioactivas o marcas fluorescentes.

Las secuencias de aminoácidos o de nucleótidos de los marcadores representativos descritos en el presente documento y para el uso en la presente invención están disponibles para su prueba en línea a partir de cualquier fuente adecuada, y será entendido por los expertos en la técnica en referencia a la presente divulgación. Por ejemplo, las siguientes secuencias de aminoácidos y nucleótidos están disponibles del sitio de internet de NCBI utilizando el buscador Entrez.

NCOA3 se refiere a un miembro de la familia de proteínas del co-activador del receptor esteroide en humanos. Los números de registro para los ácidos nucleicos representativos que codifican NCOA3 incluyen; NM_008679, BC092516, y BC088343, entre otros. Los números de registro para las 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 se pueden unir a los receptores de la superficie celular para activar una ruta de señalización en las células. Los números de registro para los ácidos nucleicos representativos que codifican Wnt-2 incluyen: NM_003391 y N_023653, entre otros. Los números de registro para las proteínas Wnt-2 representativas incluyen: NP_004176, NP_078613, y AAF30299, entre otros.

PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología de pleckstrina) se refiere a proteínas que se identificaron originalmente como proteínas que se unían al dominio de homología de la pleckstrina (PH) en la proteína sustrato-1 del receptor de insulina (IRS-1), que es un sustrato para la fosforilación por el receptor de insulina tirosina quinasa. Véase, por ejemplo Fahang-Fallah, J. y col., J. Biol. Chem., 275: 40492-40497 (2000). Los números de registro de las secuencias de ácido nucleico y proteína para PHIP incluyen: AAH08909, NP060404, XP999437, y NM017934, entre otros.

La osteopontina, o SPP1, se refiere a una familia de glucoproteínas fosforilada que es abundante en la matriz mineral ósea y que acelera la regeneración ósea y la remodelación. También se produce en otros tejidos y tiene un papel y la regulación y progresión de muchas enfermedades, potenciando las capacidades invasivas y proteolíticas de las células tumorales. Los números de registro para las secuencias proteicas representativas de la osteopontina incluyen: AAA62729, AAAA59974, CAA40091, y AAC28619, entre otros.

Los números de registro de las secuencias representativas para WIF1, ARPC2, G1P3/dominio inducible IFN alfa, MIP1 alfa, Bf1/Bcl-2 relacionada con la proteína A1, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct3/4 son los siguientes: WIF1: NM_0071914; ARPC2: NM_152862 y NM_005731; GIP3 aka IFI6: NM_022872, NM_002038, y NM_022873; Mip-1 alfa aka CCL3: NM_002983; Bf1-1 aka BCL2A1: NM_004049; RGS1: NM_002922; FN1 (fibronectina 1): N_212475, NM_054034, N_212476, NM_002026, N_212478M y NM_212482; y POU5F1: NM_002701 y NM_203289.

Ácidos nucleicos que codifican NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología de pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2, G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bf1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4 o sus polipéptidos codificados se refiere a todas la formas de ácidos nucleicos (por ejemplo, gen, pre-ARNm, ARNm) o proteínas, sus variantes polimórficas, alelos, mutantes y homólogos interespecies que (como se aplica a ácido nucleico o proteína): (1) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente un 60% de identidad de secuencia, un 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferentemente un 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencias de aminoácidos, preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácidos, con un polipéptido codificado por el ácido nucleico referenciado o una secuencia de aminoácidos descritos en el presente documento; (2) se unen específicamente a anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos policlonales, que se producen contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos referenciada, fragmentos inmunogénicos de los mismos, variantes modificadas conservadoramente de los mismos; (3) se hibridan específicamente bajo condiciones de hibridación rigurosas a un ácido nucleico que codifica una secuencia de

aminoácidos referenciada, y variantes modificadas conservadoramente de los mismos; (4) tienen una secuencia de ácidos nucleicos que tiene más de un 95%, preferentemente más de un 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia de nucleótidos, preferentemente sobre una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más nucleótidos de una secuencia de ácidos nucleicos de referencia. Una secuencia de polinucleótidos o polipéptido típicamente es de un mamífero que incluye, pero que no se limita a estos, primates, por ejemplo, seres humanos; roedores, por ejemplo, rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja, o cualquier mamífero. Los ácidos nucleicos y las proteínas descritas en el presente documento incluyen tanto los que se producen naturalmente o moléculas recombinantes. Se incluyen en la definición formas truncadas o empalmadas alternativamente de estos antígenos.

La frase “se une específicamente (o selectivamente)” cuando se refiere a una proteína, ácido nucleico, anticuerpo o compuesto de moléculas pequeñas, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína o ácido nucleico, particularmente NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4 a menudo en una población heterogénea de proteínas o ácidos nucleicos y otros productos biológicos. En el caso de anticuerpos, bajo condiciones de inmunoensayo determinadas, un anticuerpo especificado se puede unir a una proteína particular al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones necesita un anticuerpo que se selecciona por su especificidad a una proteína en particular. Por ejemplo, se utilizan rutinariamente inmunoensayos ELISA en fase sólida para seleccionar anticuerpos inmunorreactivos específicamente con una proteína (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)) para una descripción de los formatos de inmunoensayos y las condiciones que se pueden utilizar para determinar la inmunorreactividad específica).

La frase “efectos funcionales” en el contexto de los 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 NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, por ejemplo, un efecto químico o fenotípico tal como actividad transcripcional alterada de NCOA3 o actividad alterada de la ruta de señalización de Wnt-2 y los efectos corriente abajo de tales proteínas sobre el metabolismo y crecimiento celular. Un efecto funcional incluye por tanto la actividad de unión al ligando, la activación o represión transcripcional, la capacidad de las células para proliferar, la expresión en las células durante la progresión del melanoma, y otras características de las células del melanoma. Los “efectos funcionales” incluyen actividades *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*.

Por “determinación del efecto funcional” se quiere decir el ensayo de un compuesto que aumenta o disminuye un parámetro que está directa o indirectamente bajo la influencia de un marcador tal como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, por ejemplo midiendo los efectos físicos y químicos o fenotípicos. Tales efectos funcionales se pueden medir por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, cambios en las características espectroscópicas (por ejemplo, fluorescencia, absorbancia, índice de refracción); hidrodinámicas (por ejemplo, la forma), cromatográficas; o propiedades de solubilidad para la proteína; ensayos de unión al 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 celulares de superficie. La determinación del efecto funcional de un compuesto en la progresión celular del melanoma también se puede llevar a cabo utilizando ensayos conocidos por los expertos en la técnica tales como metástasis de las células del melanoma por inyección en la vena del rabo de células de melanoma en ratones. Los efectos funcionales se pueden evaluar por muchos medios conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, microscopía para mediciones cuantitativa o cualitativa de alteraciones en las características morfológicas, medición de cambios en el ARN o en los niveles de proteínas para otros genes que se expresan en las células de melanoma, medición de la estabilidad del ARN, identificación de expresión corriente abajo o diferida (CAT, luciferasa, β -gal, GFP y similares), por ejemplo por medio de quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, unión a anticuerpos, marcadores inducibles, etc.

Los “inhibidores”, “activadores” y “moduladores” de los marcadores se utilizan para referirse a moléculas activadoras, inhibidoras, o moduladoras identificadas utilizando ensayos *in vitro* e *in vivo* de marcadores del melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4. Los inhibidores son compuestos que, por ejemplo, se unen a, bloquean parcial o totalmente la actividad, disminuyen, evitan, retrasan la activación, inactivan, desensibilizan, o regulan negativamente la actividad o expresión de marcadores de melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, por ejemplo, antagonistas. “Activadores” son compuestos que aumentan, abren, activan, facilitan, potencian la activación, sensibiliza, agonizan, o regulan positivamente la actividad de marcadores de melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que

interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, por ejemplo agonistas. Los inhibidores, activadores, o moduladores también incluyen versiones modificadas genéticamente de marcadores de melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, versiones con actividad alterada, así como ligandos que se producen naturalmente y sintéticos., antagonistas, agonistas, anticuerpos, péptidos, péptidos cíclicos, ácidos nucleicos, moléculas antisentido, ribozimas, moléculas de ARNi, moléculas orgánicas pequeñas y similares. Tales ensayos para los inhibidores y activadores incluyen, por ejemplo, marcadores que se expresan en el melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, *in vitro*, en las células, o extractos celulares, compuestos aplicadores del supuesto modulador, y luego determinando los efectos funcionales sobre la actividad, como se ha descrito anteriormente.

Las muestras o ensayos que comprenden marcadores de melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, que están tratados con un activador, inhibidor o modulador potencial se comparan con las muestras de control sin el inhibidor, activador o modulador, para examinar la extensión de inhibición. A las muestras de control (sin tratar con inhibidores) se les asigna un valor relativo de actividad proteica del 100%. La inhibición de los marcadores de melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, se consiguen cuando el valor con respecto al control es aproximadamente del 80%, preferentemente de 50%, más preferentemente del 25-0%. La activación de los marcadores del melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, se alcanza cuando el valor de actividad con respecto al control (sin tratar con activadores) es del 110%, más preferentemente del 150%, más preferentemente del 200-500% (es decir de dos a cinco veces más altos con respecto al control), más preferentemente del 1.000-3.000% más alto.

La expresión “compuesto de ensayo” o “fármaco candidato” o “modulador” o los equivalentes gramaticales como se utilizan en el presente documento describen cualquier molécula, que se produzca naturalmente o sintética, por ejemplo, una proteína, oligopéptido (por ejemplo, desde aproximadamente 4 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud), molécula orgánica pequeña, polisacárido, péptido, péptido circular, lípido, ácido graso, ARNsi, polinucleótido, oligonucleótido, etc., que se va a ensayar para determinar la capacidad de modular directa o indirectamente los marcadores de melanoma tales como NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4. El compuesto de ensayo puede estar en forma de una biblioteca de compuestos de ensayo, tal como una biblioteca combinatoria o aleatoria que proporciona un intervalo suficiente de diversidad. Los compuestos de ensayo se unen opcionalmente a un asistente de fusión, por ejemplo, compuestos dirigidos, compuestos de rescate, compuestos de dimerización, compuestos estabilizantes, compuestos dirigibles, y otros restos funcionales. De manera convencional, se generan nuevas entidades químicas con propiedades útiles por identificación de un compuesto de ensayo (llamado un “compuesto director”) con algunas propiedades o actividades deseadas, por ejemplo, una actividad inhibidora, creación de variantes del compuesto director, y evaluando la propiedad y actividad de esos compuestos variantes. A menudo se emplean métodos de selección de alto rendimiento (HTS) para tal análisis.

Una “molécula orgánica pequeña” se refiere a una molécula orgánica, sea producida naturalmente o sintética, que tiene un peso molecular de más de aproximadamente 50 daltons y menos de aproximadamente 2.500 daltons, preferentemente menos de 2.000 daltons, preferentemente entre aproximadamente 100 a aproximadamente 1.000 daltons, más preferentemente entre aproximadamente 200 a aproximadamente 500 daltons.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

Se describen en el presente documento métodos de diagnóstico, o para proporcionar un pronóstico, para el melanoma detectando la expresión de marcadores que se expresan diferencialmente en las células de melanoma en diferentes estadios de malignidad. El diagnóstico implica la determinación del nivel de expresión de un polipéptido o ácido nucleico NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4 en un paciente o muestra de un paciente y luego comparando el nivel de expresión con una línea base o intervalo. Típicamente, el valor de la línea basal es representativo de los niveles de expresión del polipéptido o ácido nucleico de una persona sana que no padece melanoma, según se mide utilizando una muestra biológica tal como una biopsia de piel. La variación de los niveles de un polinucleótido o ácido nucleico descrito en el presente documento del intervalo de línea base (sea por encima o por debajo) indica que el paciente tiene un cáncer o está en riesgo de desarrollar un cáncer, dependiendo del marcador utilizado. En el caso de NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1,

ARPC2, G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, la sobre-expresión sería consistente con un diagnóstico de melanoma. En el caso de Wif1, la bajo-expresión sería consistente con un diagnóstico de melanoma.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, la expresión “proporcionar un pronóstico” se refiere a proporcionar una predicción del curso y resultado probable del melanoma. Los métodos pueden también utilizarse para trazar una terapia adecuada para el tratamiento de melanoma, por ejemplo, indicando si el melanoma está o no aún en estadio benigno o si el melanoma ha avanzado a un estadio en el que se necesitaría una terapia agresiva.
- 10 Los reactivos anticuerpos se pueden utilizar en ensayos para detectar los niveles de expresión de NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2, G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4 en muestras de pacientes utilizando cualquiera de varios inmunoensayos conocidos por los expertos en la técnica. Las técnicas y protocolos de inmunoensayos generalmente se describen 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. Se puede utilizar una variedad de técnicas de inmunoensayo, incluyendo inmunoensayos competitivos y no competitivos. Véase, por ejemplo, Self y col., Curr. Opin. Biotechnol., 7: 60-65 (1996). El término inmunoensayo engloba técnicas que incluyen, sin limitación, inmunoensayos enzimáticos (EIA) tales como la técnica de inmunoensayo de enzima multiplicada (EMIT), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC ELISA), e inmunoensayo de enzima micropartícula (MEIA); inmunoensayos de electroforesis capilar (CEIA); radioinmunoensayo (RIA); ensayos inmunoradiométricos (IRMA); inmunoensayos de polarización fluorescente (FPIA); y ensayos de quimioluminiscencia (CL). Si se desea, tales inmunoensayos se pueden automatizar. Los inmunoensayos también se pueden utilizar en conjunción con fluorescencia inducida por láser. Véase por ejemplo, Schmalzing y col., Electrophoresis, 18: 2184-93 (1997); Bao, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci., 699: 463-80 (1997). Los inmunoensayos con liposomas tales como inmunoensayos de liposomas en flujo-inyección e inmunosensores de liposomas, también son adecuados para su uso en la presente invención. Véase, por ejemplo, Rongen y col., J. Immunol. Methods, 204: 105-133 (1997). Además, es adecuado el uso de ensayos de nefelometría, en los que la formación de complejos proteína/anticuerpo da lugar a un incremento en la dispersión de la luz que se convierte en un pico de la señal de la tasa en función de la concentración del marcador, en los métodos de la presente invención. Los ensayos de nefelometría están disponibles comercialmente en Beckman Coulter (Brea, Ca; Kit nº 449430) y que pueden llevarse a cabo utilizando un Analizador Nefelómetro Behring (Fink y col., J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 27: 261-276 (1989)).
- 35 La unión inmunológica específica del anticuerpo a ácidos nucleicos se puede detectar directa o indirectamente. Las marcas directas incluyen marcas fluorescentes o luminiscentes, metales, colorantes, radionúclidos y similares, unidos al anticuerpo. Se puede utilizar un anticuerpo marcado con yodo-125 (¹²⁵I). Un ensayo que utiliza un anticuerpo quimioluminiscente específico para el ácido nucleico es adecuado para detección sensible, no radioactiva de niveles de proteínas. También es adecuado un anticuerpo marcado con fluorocromo. Ejemplos de fluorocromos incluyen, sin limitación, DAPI, fluoresceína, Hoechst 33258, R-ficocianina, B-ficoeritrina, R-ficoeritrina, rodamina, rojo Texas, y lisamina. Las marcas indirectas incluyen varias enzimas bien conocidas en la técnica, tales como la peroxidasa de rábano rústico (HRP), fosfatasa alcalina (AP), β-galactosidasa, ureasa, y similares. Se puede utilizar un sistema de detección de peroxidasa de rábano rústico, por ejemplo con tetrametilbenzidina (TMB), un sustrato cromogénico, que da lugar a un producto soluble en presencia de peróxido de hidrógeno que es detectable a 450 nm. Se puede utilizar un sistema de detección de fosfatasa alcalina con el sustrato cromogénico p-nitrofenil fosfato, por ejemplo, que da lugar a un producto soluble fácilmente detectable a 405 nm. De manera similar se puede utilizar un sistema de detección para la β-galactosidasa con el sustrato cromogénico o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), que da lugar a un producto soluble detectable a 410 nm. Se puede utilizar un sistema de detección de ureasa con un sustrato tal como el ureabromocresol púrpura (Sigma Inmunoquímicos; St. Louis, MO).
- 50 Se puede analizar una señal de marca directa o indirecta, por ejemplo, utilizando un espectrofotómetro para detectar el color de un sustrato cromogénico; un contador de radiación para detectar la radiación tal como un contador gamma para la detección de ¹²⁵I; o un fluorómetro para detectar la fluorescencia en presencia de luz a una cierta longitud de onda. Para la detección de anticuerpos unidos a enzimas, se puede hacer un análisis cuantitativo utilizando un espectrofotómetro tal como EMAX Microplate Reader (Molecular Devices; Menlo Park, CA) según las instrucciones del fabricante. Si se desea, los ensayos de la presente invención se pueden automatizar o llevar a cabo por medio de robots, y se puede detectar la señal de múltiples muestras simultáneamente.
- 55 Los anticuerpos se pueden inmovilizar en una variedad de soportes sólidos, tales como partículas de matriz magnética o cromatográfica, la superficie de una placa de ensayo (por ejemplo, pocillos microtiter), piezas de un sustrato de material sólido o una membrana (por ejemplo, de plástico, nylon, papel), y similares. Se puede preparar una tira de ensayo revistiendo el anticuerpo o una pluralidad de anticuerpos en una matriz sobre un soporte sólido. Esta tira puede entonces sumergirse en la muestra de ensayo y procesarse rápidamente por medio de lavados y etapas de detección para generar una señal medible, tal como una mancha coloreada.
- 65 De manera alternativa, las moléculas que se unen a ácidos nucleicos tales como las sondas, oligonucleótidos, matrices de oligonucleótidos y cebadores se pueden utilizar en ensayos para detectar la expresión de ARN

diferencial en muestras de pacientes, por ejemplo, RT-PCR. La RT-PCR puede utilizarse según los métodos de referencia conocidos en la técnica. Los ensayos PCR tales como los ensayos Taqman® disponibles en, por ejemplo, Applied Biosystems, se pueden utilizar para detectar ácidos nucleicos y variantes de los mismos. Se pueden utilizar la qPCR y las micromatrices de ácidos nucleicos para detectar ácidos nucleicos. Se pueden preparar reactivos que se unen a biomarcadores de cáncer seleccionados de acuerdo con los métodos conocidos por los expertos en la técnica o adquirirse comercialmente.

Los análisis de ácidos nucleicos se pueden conseguir utilizando técnicas de rutina utilizando análisis de Southern, reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR), o cualquier otro método que se basa en la hibridación de una secuencia de ácido nucleico que es complementaria con una porción de la secuencia del marcador codificada (por ejemplo hibridación de transferencia por ranuras). Las técnicas de amplificación por PCR aplicables se describen, por ejemplo, en Ausubel y col. e Innis y col., supra. Los métodos de hibridación de ácidos grasos generales se describen en Anderson, "Nucleic Acid Hybridization", BIOS Scientific Publishers, 1999. También se puede llevar a cabo la amplificación o hibridación de una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN genómico, ARNm, o ADNc) a partir de secuencias de ARNm o ADNc ordenadas en una micromatriz. Los métodos de micromatrices se describen generalmente en Hardiman, "Microarrays Methods y Applications; Nuts y Bolts", DNA Press, 2003; y Baldi y col., "DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling", Cambridge University Press, 2002.

Los análisis de los ácidos nucleicos marcadores y sus variantes se pueden llevar a cabo utilizando técnicas conocidas en la técnica incluyendo, sin limitación, micromatrices, análisis basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), análisis de secuencias, y análisis electroforético. Un ejemplo sin limitación de un análisis basado en PCR incluye un ensayo de discriminación alélico Taqman® disponible en Applied Biosystems. Ejemplos no limitantes de análisis de secuencia incluyen secuenciación de Maxam-Gilbert, secuenciación de Sanger, secuenciación de matriz capilar de ADN, secuenciación de ciclo térmico (Sears y col., Biotechniques, 13: 626-633 (1992)), secuenciación en fase sólida (Zimmerman y col., Methods Mol. Cell Biol., 3: 39-42 (1992)), secuenciación con espectrometría de masas tal como espectrometría de desorción/ionización con láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (MALDI-TOF/MS; Fu y col., Nat- Biotechnol., 16: 381-384 (1998)), y secuenciación por hibridación. Chee y col., Science, 274: 610-614 (1996); Drmanac y col., Science, 260: 1649-1652 (1993); Drmanac y col., Nat. Biotechnol. 16: 54-58 (1998). Ejemplos no limitantes de análisis electroforético incluyen electroforesis en gel en placas tal como electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida, electroforesis de capilaridad, y electroforesis en gel en gradiente de desnaturalización. Otros métodos para detectar variantes de ácido nucleico incluyen, por ejemplo, el ensayo INVADER® de Third Wave Technologies, Inc., análisis del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), hibridación de oligonucleótidos específicos de alelos, un ensayo de movilidad heterodúplex, análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP), extensión de cebador de nucleótido único (SNUPE) y pirosecuenciación.

Un resto detectable se puede utilizar en los ensayos descritos en el presente documento. Se puede utilizar una amplia variedad de restos detectables, con la elección de la marca dependiendo de la sensibilidad necesaria, fácil de conjugar con el anticuerpo, necesidades de estabilidad, e instrumentación disponible y provisiones disponibles. Los restos detectables adecuados, pero sin limitarse a estos, son radionúclidos, colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), Oreon Green™, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetrahodimina (TRITC) Cy3, Cy5, etc.), marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP) ficoeritrina, etc.), compuestos fluorescentes autoextinguibles que se activan por proteasas asociadas al tumor, enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina, y similares.

Los formatos físicos útiles comprenden superficies que tienen una pluralidad de localizaciones dirigibles, específicas para la detección de una pluralidad de diferentes marcadores. Tales formatos incluyen micromatrices y ciertos dispositivos capilares. Véase, por ejemplo, Ng y col., J. Cell Mol. Med., 6: 329-340 (2002); Pat. EE. UU. N° 6.019.944. En estas realizaciones, cada localización de superficie específica comprende una o más partículas específicas (por ejemplo, micropartículas o nanopartículas) inmovilizadas en localizaciones específicas de una superficie, donde las micropartículas comprenden anticuerpos para inmovilizar uno o más de los marcadores para la detección.

Se pueden llevar a cabo análisis en una variedad de formatos físicos. Por ejemplo se podrían utilizar placas microtiter o automatismos para facilitar el procesamiento de un gran número de muestras de ensayo. De manera alternativa, los formatos de una muestra se podrían desarrollar para facilitar el diagnóstico o pronóstico de una manera puntual.

De manera alternativa, los anticuerpos de la invención o las sondas de ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden aplicar a secciones de biopsias de pacientes inmovilizadas en portaobjetos de microscopio. La tinción del anticuerpo resultante o el patrón de hibridación in situ se puede visualizar utilizando cualquiera de una variedad de métodos de microscopía de luz o fluorescente conocidos en la técnica.

El melanoma en un paciente se puede diagnosticar o de otra manera evaluar visualizando la expresión *in situ* de una o más de las secuencias de genéticas o de polipéptidos desvelados en el presente documento. Los expertos en la técnica de visualización de la presencia o expresión de moléculas incluyendo los ácidos nucleicos, polipéptidos y otros productos bioquímicos en pacientes vivos apreciarán que la información de la expresión genética descrita en el presente documento se puede utilizar en el contexto de una variedad de métodos de visualización. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a estos, tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT) y métodos de tomografía de emisión de positrones (PET). Véase, 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, in press.

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

Los genes expresados diferencialmente desvelados en el presente documento, o sus péptidos codificados, o fragmentos de los mismos, se pueden utilizar en el contexto de aplicaciones de imagen PET y SPECT. Después de la modificación con restos indicadores apropiados para aplicaciones PET y SPECT, moléculas que interactúan o se unen con los ácidos nucleicos marcadores o con cualquiera de los polipéptidos codificados por las transcripciones se pueden utilizar para visualizar los patrones de expresión génica y facilitar el diagnóstico y el pronóstico como se describe en el presente documento. De manera similar, si los polipéptidos codificados codifican enzimas, las moléculas marcadas que interactúan con los productos de la catálisis por la enzima se puede utilizar para la técnica de imagen *in vivo* y la aplicación diagnóstica descrita en el presente documento.

COMPOSICIONES Y KITS

También se proporcionan composiciones y kits para practicar los ensayos descritos en el presente documento utilizando anticuerpos específicos para los polipéptidos o ácidos nucleicos específicos para los polinucleótidos.

Los kits para llevar a cabo los ensayos diagnósticos descritos en el presente documento incluyen típicamente, en un medio de envase adecuado, una sonda que comprende un anticuerpo o secuencia de ácido nucleico que se une específicamente a los polipéptidos o polinucleótidos marcadores, y una marca para detectar la presencia de la sonda. Los kits pueden incluir varios anticuerpos o secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos descritos en el presente documento, por ejemplo, un primer anticuerpo y/o un segundo y/o un tercero y/o anticuerpos adicionales que reconocen NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4.

La forma de envasado de los kits generalmente incluyen al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa y/u otro envase en el que un primer anticuerpo específico de uno de los polipéptidos o un primer ácido nucleico específico de uno de los polinucleótidos descritos en el presente documento se pueden colocar y/o disponer en alícuotas adecuadamente. Donde se proporciona un segundo y/o tercer y/o componente adicional, el kit también contendrá generalmente un segundo, tercer y/u otro envase adicional en el que se coloca este componente. De manera alternativa, un envase puede contener una mezcla de más de un anticuerpo o reactivo de ácido nucleico, cada reactivo se une específicamente a un marcador diferente de acuerdo con la presente invención. Los kits incluirán también típicamente medios para contener el anticuerpo o las sondas de ácido nucleico en un confinamiento estrecho para la venta comercial. Tales envases pueden incluir envases plásticos moldeados por inyección o soplado en los que se disponen los viales deseados.

Los kits pueden comprender además controles negativos o positivos, así como instrucciones para el uso de los componentes del kit contenidos en él, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento.

FORMACIÓN DE IMÁGENES IN VIVO

Los varios marcadores descritos en el presente documento también proporcionan reactivos para formación de imágenes *in vivo*, por ejemplo, la formación de imágenes de metástasis de melanoma a los ganglios linfáticos utilizando reactivos marcados que detectan proteínas o ácidos nucleicos NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4. Se pueden utilizar técnicas de información de imágenes, por ejemplo, como guías para la resección quirúrgica o para detectar la diseminación

distante del melanoma. Con fines de formación de imágenes in vivo, los reactivos que detectan la presencia de NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4, tales como anticuerpos, se pueden marcar con un isótopo emisor de positrones (por ejemplo, ^{18}F) para la tomografía de emisión de positrones (PET), isótopos de rayos gamma (por ejemplo, $^{99\text{m}}\text{Tc}$) para tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), una molécula paramagnética o nanopartícula (por ejemplo Gd^{3+} quelado o una nanopartícula revestida de magnetita) para la formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), un fluoróforo cercano a los infrarrojos para la formación de imágenes cerca de infrarrojos (near-IR), una luciferasa (de luciérnaga, bacteriana, o celentéreos) u otra molécula luminiscente para la formación de imágenes bioluminiscentes, o una vesícula llenada con perfluorocarbono para ultrasonidos.

Además, tales reactivos pueden incluir un resto fluorescente, tal como una proteína fluorescente, un péptido, o una molécula coloreada fluorescente. Las clases comunes de colorantes fluorescentes incluyen, pero no se limitan a estos, xantenos, tales como las rodaminas, rhodoles, y fluoresceínas, y sus derivados; bimanos; cumarinas y sus derivados tales como la umbeliferona y aminometil cumarinas; aminas aromáticas tales como dansil; colorantes de escuarato; benzofuranos; cianinas fluorescentes; carbazoles; dicianometilen piranos, polimetina, oxabenzantrano, xanteno, pirilium, carbostil, perileno, acridona, quinacridona, rubreno, antraceno, coroneno, fenantreceno, pireno, butadieno, estilbeno, complejos metálicos quelados de lantánido, complejos metálicos quelados de tierras raras, y derivados de tales colorantes. Los colorantes fluorescentes se tratan, por ejemplo, en la Pat. de EE. UU. N° 4.452.720, Pat. EE. UU. N° 5.227.487, y Pat. EE. UU. N° 5.543.295.

Otras marcas fluorescentes adecuadas para su uso incluyen un colorante fluorescente. Los colorantes fluorescentes típicos incluyen, pero no se limitan a estos, 5-carboxifluoresceína, fluoresceína-5-isotiocianato y 6-carboxifluoresceína; ejemplos de otros colorantes fluorescentes se pueden encontrar, por ejemplo, en la Pat. EE. UU. N° 6.008.379, Pat. EE. UU. N° 5.750.409, Pat. EE. UU. N° 5.066.580, y Pat. EE. UU. N° 4.439.356. Una parte C de carga puede incluir un colorante de rodamina, tal como, por ejemplo, tetrametilrodamina-5-isotiocianato, 5-carboxitetrametilrodamina, derivados de g-carboxi rhodol, tetrametil y tetraetil rodamina, difenildimetil y difenildietil rodamina, dinaftil rodamina, cloruro de sulfonil rodamina 101 (comercializado bajo la marca registrada de ROJO TEXAS®), y otros colorantes de rodamina. Se pueden encontrar otros colorantes de rodamina, por ejemplo en Pat. EE. UU. N° 6.080.852, Pat. EE. UU. N° 6.025.505, Pat. EE. UU. N° 5.936.087, Pat. EE. UU. N° 5.750.409. Una parte C de carga puede incluir un colorante de cianina tal como, por ejemplo Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy 5.5, Cy7. También se pueden utilizar compuestos fosforescentes que incluyen porfirinas, ftalocianinas, compuestos poliaromáticos tales como los pirenos, antracenos y acenaftenos, y otros.

Reactivos tales como los anticuerpos pueden incluir un resto radioactivo, por ejemplo, un isótopo radioactivo tales como ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , isótopos radioactivos de Lu, y otros.

MÉTODOS PARA IDENTIFICAR COMPUESTOS

Se puede utilizar una variedad de métodos para identificar compuestos que evitan o tratan la progresión del melanoma. Típicamente un ensayo que proporciona un parámetro fácilmente medible se adapta para llevarse a cabo en los pocillos de placas multipocillo con el fin de facilitar la exploración de miembros de una biblioteca de compuestos de ensayo como se describe en el presente documento. Por lo tanto, en un escenario, se puede colocar en placas un número apropiado de células en las celdas de una placa multipocillo, y se puede determinar el efecto de un compuesto de ensayo sobre la expresión de NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4.

Los compuestos que se van a ensayar pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una macromolécula, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Típicamente, los compuestos de ensayo serán moléculas químicas pequeñas y péptidos. Esencialmente cualquier compuesto químico se puede utilizar como un compuesto de ensayo, aunque más a menudo se utilizan los compuestos que se pueden disolver en soluciones acuosas u orgánicas (especialmente basadas en DMSO). Los ensayos se diseñan para explorar grandes bibliotecas químicas automatizando las etapas de ensayo y proporcionando compuestos a partir de cualquier fuente conveniente para los ensayos, que típicamente funcionan en paralelo (por ejemplo, en formatos microtiter sobre placas microtiter en ensayos robotizados). Se apreciará que hay muchos suministradores de compuestos químicos, incluyendo Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Suiza) y similares.

Se pueden utilizar métodos de formación de imágenes de alto rendimiento que implican proporcionar una biblioteca química o peptídica combinatoria que contiene un gran número de compuestos potenciales terapéuticos. Tales "bibliotecas combinatorias químicas" o "bibliotecas de ligandos" se exploran en uno o más ensayos, como se describe en el presente documento, para identificar los miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. En este caso, tales compuestos se seleccionan por su capacidad para reducir la expresión de NCOA2, Wnt-2, PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina), osteopontina, WIF1, ARPC2. G1P3/proteína inducible IFN alfa, MIP1, Bfl1/proteína A

relacionada con Bcl-2, RGS1, Fibronectina 1, o POU5F1/Oct 3/4.

Una biblioteca química combinatoria es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o biológica, combinando un número de "bloques de construcción" químicos tales como reactivos. Por ejemplo una biblioteca química combinatoria tal como una biblioteca de polipéptidos se forma combinando un grupo de bloques de construcción química (aminoácidos) en cada forma posible para un compuesto de una longitud determinada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipéptido). Se pueden sintetizar millones de compuestos químicos por medio de tal mezcla combinatoria de bloques de construcción química.

La preparación y selección de bibliotecas químicas combinatorias son bien conocidas por los expertos en la técnica. Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero no se limitan a estos, bibliotecas de péptidos (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. 5.010.175, Furka, Intg, J. Pept. Prot. Res., 37: 487-493 (1991) y Houghton y col., Nature, 354: 84-88 (1991)). También se pueden utilizar otros procesos químicos para generar bibliotecas de diversidad química. Tales productos químicos incluyen, pero no se limitan a estos; peptoides (por ejemplo la publicación PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (por ejemplo, publicación PCT N° 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (por ejemplo, Publicación PCT N° WO 92/00091), benzodiazepinas (por ejemplo Patente de EE. UU. N° 5.288.514) diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs y col, PNAS EE. UU. 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara y col, J. Amer. Chem. Soc., 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con armazón de glucosa (Hirschman y col., J. Amer. Chem. Soc., 114: 9217-9218 (1992)), síntesis de análogos orgánicos de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen y col., J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho y col., Science, 261: 1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell y col. J. Org. Chem., 59: 658 (1994)), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, Ausubel, Berger y Sambrook, todos supra), bibliotecas de ácidos nucleicos péptidos (véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. N° 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn, y col., Nature Biotechnology, 14 (3): 309-314 (1996) y PCT/US96/10287), bibliotecas de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Liang y col., Science, 274: 1520-1522 (1996) y Patente de EE. UU. N° 5.593.853), bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum C&EN, 18 Enero, página 33 (1993); isoprenoides, Patente de EE. UU. N° 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanona, Patente de EE. UU. N° 5.549.974; pirrolidinas, Patente de EE. UU. N° 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de EE. UU. N° 5.506.337; benzodiazepinas, 5.288.514, y similares).

Los dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias están disponibles comercialmente (véase por ejemplo, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem. Tech., Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA). Además numerosas bibliotecas combinatorias están también disponibles comercialmente (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, N.J., Asinez, Moscow; Ru, Tripos, Inc., St. Louis, MO, ChemStar, Ltd., Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, etc.).

En los ensayos de alto rendimiento descritos en el presente documento, es posible explorar hasta varios cientos diferentes de moduladores y ligandos en un solo día. En particular, cada pocillo de una placa microtiter se puede utilizar para llevar a cabo un ensayo separado contra un modulador potencial seleccionado, o, si los efectos de la concentración o del tiempo de incubación son para observarse, se puede ensayar un modulador cada 5-10 pocillos. Por tanto, una placa microtiter única puede ensayar aproximadamente 96 moduladores. Si se utilizan placas de 1536 pocillos, una sola placa puede ensayar fácilmente desde aproximadamente 10 a aproximadamente 1500 compuestos diferentes. Es posible ensayar muchas placas por día; es posible realizar exploraciones de ensayo para aproximadamente 6.000, 20.000, 50.000 o 100.000 o más compuestos diferentes utilizando los sistemas integrados descritos en el presente documento.

MÉTODOS PARA INHIBIR LA EXPRESIÓN DE MARCADORES PROTEICOS UTILIZANDO ÁCIDOS NUCLEICOS

Se puede utilizar una variedad de ácidos nucleicos, tales como ácidos nucleicos antisentido, ARNs i o ribozimas, para inhibir la función de los marcadores descritos en el presente documento. Las ribozimas que escinden el ARNm en las secuencias de reconocimiento del sitio específico se pueden utilizar para destruir los ARNm diana, particularmente por medio del uso de ribozimas cabeza de martillo. Las ribozimas cabeza de martillo escinden ARNm en las localizaciones dictadas por las regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarias con el ARNm diana. Preferentemente, el ARNm diana tiene la siguiente secuencia de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas cabeza de martillo son bien conocidas en la técnica.

Las ribozimas que se dirigen a genes necesariamente cuentan con una región de hibridación complementaria con dos regiones, cada una de ellas de al menos 5 y preferiblemente cada una de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos contiguos de longitud de un ARNm diana. Además, las ribozimas poseen una actividad endorribonucleasa altamente específica, que escinde autocatalíticamente el ARNm diana en sentido.

Con respecto al antisentido, se pueden utilizar oligonucleótidos de ARNs i o ribozimas, oligonucleótidos fosforotioato. Las modificaciones en las uniones fosfodiéster así como del heterociclo o el azúcar pueden proporcionar un aumento en la eficacia. El fosforotioato se utiliza para modificar el enlace fosfodiéster. Una unión fosforoamidato N3'-P5' se ha descrito como estabilizantes de oligonucleótidos para las nucleasas e incrementan la unión al ARN. La

unión de ácido nucleico péptido (PNA) es una sustitución completa de la ribosa y la estructura fosfodiéster y es estable frente a las nucleasas, aumenta la afinidad de unión al AR, y no permite la escisión por la ARNasa H. Su estructura básica es responsable de modificaciones que puede permitir su optimización como un componente antisentido. Con respecto a las modificaciones del heterociclo, ciertas modificaciones del heterociclo han probado

que aumentan los efectos antisentido sin interferir con la actividad de la ARNasa H. Un ejemplo de tal modificación es la modificación de C-5 tiazol. Finalmente, se tiene que considerar también la modificación del azúcar. Las modificaciones 2'-O-propil y 2'- metoxietoxi ribosa estabilizan los oligonucleótidos frente a las nucleasas en cultivos celulares e *in vivo*.

Los oligonucleótidos inhibidores pueden suministrarse a una célula por transfección directa o transfección y expresión por medio de un vector de expresión. Los vectores de expresión adecuados incluyen los vectores de expresión de mamíferos, los vectores víricos, en los cuales se ha clonado un oligonucleótido inhibidor con las secuencias reguladores apropiadas incluyendo un promotor para resultar en la expresión de un ARN antisentido en una célula huésped. Los promotores adecuados pueden ser constitutivos o promotores específicos del desarrollo. El suministro de la transfección se puede conseguir por reactivos de transfección liposómica, conocidos en la técnica (por ejemplo, reactivo de transfección Xtreme, Roche, Alameda, CA; formulaciones de lipofectamina, Invitrogen, Carlsbad, CA). Son eficaces el suministro mediado por liposomas catiónicos, por vectores retrovíricos y el suministro directo. Otro modo de suministro posible es la dirección utilizando anticuerpos contra marcadores de superficie celular en las células diana.

Para la transfección, una composición que comprende una o más moléculas de ácido nucleico (con o sin vectores) puede comprender un vehículo de suministro, incluyendo liposomas, para la administración a un sujeto, excipientes y diluyentes y sus sales, y/o puede estar presente en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Los métodos para suministrar moléculas de ácido nucleico se describen por ejemplo en Gilmore, y col., Curr Drug Delivery (2006) 3:147-5 y Patil, y col., AAPS Journal (2005) 7:E61-E77. El suministro de moléculas de ARNsi también se describe en varias Publicaciones de Patente de EE. UU., incluyendo por ejemplo, 2006/0019912; 2006/0014289; 2005/0239687; 2005/0222064; y 2004/0204377. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a las células por una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin restringirse a estos, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, por electroporación, o por incorporación en otros vehículos, incluyendo polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas (véase, por ejemplo, Gonzalez y col., 1999, Bioconjugate Chem., 10, 1068-1074; Wang y col., publicaciones Internacionales PCT N^{os} WO 03/47518 y WO 03/46185), ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) y microsferas PLGA (Véase, por ejemplo, Pat. EE. UU. N° 6.447.796 y Publicación de Patente de EE. UU. N° 2002/130430), nanocápsulas biodegradables, y microsferas bioadhesivas, o por vectores proteináceos (O'Hare y Normand, Publicación Internacional PCT N° WO 00/53722). Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento se pueden también formular o formar complejos con polietilénimina y derivados de las mismas, tales como los derivados polietilénimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilénimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-triGAL).

Ejemplos de reactivos de transfección liposómica incluyen por ejemplo: formulación de liposoma CellFectin, 1:1.5(M/M) del lípido catiónico N,N,N,N-tetrametil-N,N,N,N-tetrapalmit-il-espermina y dioleoil fosfatidil etanolamina (DOPE) (GIBCO BRL); formulación de liposoma Cytofectin GSV, 2:1 (M/M) de un lípido catiónico y DOPE (Glen Research); DOTAP (N-[1-(2,3-dioleoiloxi)-N,N,N-tri-metil-amoniometilsulfato] (Boehringer Mannheim); la formulación de liposomas Lipofectamine, 3:1 (M/M) del lípido policationico DOSPA y el lípido neutro DOPE (GIBCO BRL); y (5) siPORT (Ambion); HiPerfect (Qiagen); X-treme GENE (Roche); RNAicARRIER (Epoch Biolabs) y TransPass (New England Biolabs).

Las secuencias antisentido, ARNsi, o de ribozimas se pueden suministrar a las células por medio de un vector de expresión de mamífero. Por ejemplo, vectores de expresión de mamíferos adecuados para la expresión de ARNsi están disponibles comercialmente, por ejemplo en Ambion (por ejemplo, vectores pSilencer), Austin, TX; Promega (por ejemplo, GeneClip, siSTRIKE, SiLentGene), Madison, WI; Invitrogen, Carlsbad, CA; InvivoGen, San Diego, CA; e Imgenex, San Diego, CA. Típicamente, los vectores de expresión para transcribir moléculas de ARNsi tendrán un promotor U6.

Las secuencias antisentido, ARNsi, o de ribozimas se pueden suministrar a las células por medio de vectores de expresión víricos. Los vectores víricos adecuados para suministrar tales moléculas a las células incluyen vectores adenovíricos, vectores adeno-asociados y vectores retrovíricos (incluyendo vectores lentivíricos). Por ejemplo, los vectores víricos desarrollados para el suministro y expresión de ARNsi, oligonucleótidos están disponibles comercialmente en, por ejemplo, GeneDetect, Bradenton, FL; Ambion, Austin, TX; Invitrogen, Carlsbad, CA; Open BioSystems, Huntsville, AL; e Imgenex, San Diego, CA.

Ejemplos

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

EJEMPLO 1. Correlación de la sobre-expresión de NCOA3 con el resultado del melanoma

La expresión de NCOA3 se evaluó utilizando el análisis inmunohistoquímico de una micromatriz de tejido de melanoma (TMA) que contenía melanomas primarios de 343 pacientes con una histología y seguimiento definidos.

5 El impacto de la presencia o ausencia de varios factores pronósticos sobre la supervivencia libre de recaídas (RFS) y supervivencia específica de la enfermedad (DSS) en pacientes con melanoma se evaluó utilizando el análisis de regresión de Cox y de Kaplan-Meier. El impacto de la presencia o ausencia de varios factores de metástasis en los ganglios linfáticos centinelas (SLN) se evaluó utilizando el análisis de regresión logístico.

10 Como los resultados demuestran a continuación, el grado aumentado de la expresión de NCOA3 era significativamente predictiva de metástasis en los SLN ($p = 0,017$). El análisis de regresión multivariado de Cox mostraba un impacto independiente de la sobre-expresión de NCOA3 y la reducción de RFS ($p = 0,021$) y DSS ($p = 0,030$). El análisis de regresión logística revelaba que el aumento del grado de expresión de NCOA3 predecía el estado de los SLN ($p = 0,017$). El análisis de regresión multivariada de Cox mostraba un impacto independiente de la expresión de NCOA3 sobre RFS ($p = 0,0095$) y DSS ($p = 0,021$). El NCOA3 era el factor de predicción más potente para DSS, superando el grosor y la ulceración. Por lo tanto, estos resultados identifican el NCOA3 como un marcador nuevo, independiente del resultado del melanoma, con un impacto significativo en la metástasis en los SLN, la RFS y la DSS.

20 Caracterización y Construcción de TMA de melanoma

Los inventores construyeron una TMA de 343 melanomas primarios con al menos dos años de seguimiento, recaídas documentadas, o que se han sometido a biopsia de SLN. El análisis demográfico de la cohorte aparece en la Tabla 1. De los 343 pacientes, 259 se sometieron a biopsia de SLN, proporcionando de esta manera información con respecto al estado de los SLN. Los criterios para someterse a biopsia de SLN incluye los siguientes: melanoma de $\geq 1,0$ mm de espesor, o la presencia de cualquiera de los siguientes factores en melanomas por debajo de 1,0 mm de espesor: nivel de Clark IV o V, ulceración, implicación vascular, microsatélites, regresión extensiva (cubriendo más del 50% del diámetro del tumor), o biopsia inadecuada (biopsia parcial que muestra el melanoma transectado en la base). El seguimiento medio de esta cohorte fue 49 meses, con un seguimiento medio de 45 meses. Las TMA se construyeron como se ha descrito previamente tomando centros de tejido de 1,0 mm del bloque de parafina (véase, Kashani-Sabet M. y col., J Clin Oncol, 22:617-623, 2004; Kononen J. y col., Nat Med 4: 844-847, 1998).

Tabla 1: Resumen de demografía de los pacientes

Variable Demográfica	Número (% , si es aplicable)
Edad (Media)	53
Género Masculino	227 (66,2)
Localización Anatómica	
Cabeza y Cuello	60 (17,5)
Tronco	137 (39,9)
Extremidades	146 (42,6)
Tipo Histológico del tumor	
Melanoma con Diseminación superficial	159 (46,4)
Melanoma Nodular	121 (35,3)
Melanoma Acral	19 (5,5)
Melanoma Lentigo maligno	11 (3,2)
Melanoma Desmoplásico	9 (2,6)
Melanoma no clasificado de otra manera	24 (7,0)
Espesor del Tumor	
T1 ($\leq 1,0$ mm)	22 (6,4)
T2 (1,01-2,0 mm)	110 (32,1)
T3 (2,01-4,0 mm)	97 (28,3)
T4(> 4,0mm)	114(33,2)

35 Inmunohistoquímica

Las preparaciones se desparafinaron y se rehidrataron en xileno, luego se pusieron en el microondas en tampón citrato 10 mM. Se bloqueó la actividad de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%, y se incubaron las preparaciones secuencialmente con los agentes bloqueantes Avidina y Biotina. Se añadió entonces el anticuerpo primario IgG monoclonal de ratón anti-COA3 (Abcam nº ab14139) a una dilución 1:10 y se incubó durante 60 min a

temperatura ambiente. Se utilizó como anticuerpo secundario el anticuerpo IgG biotinilado de caballo anti ratón (Vector Laboratories, Burlingame, CA), para la amplificación, seguida por la incubación con ABC-HRP (Vector Laboratories) durante 30 min, y solución de DAB/solución de peróxido de hidrógeno (Sigma).

5 Evaluación de la tinción inmunohistoquímica

Las regiones de tinción más intensa se puntuaron para cada matriz de centro de tejido. Se graduó la expresión de proteína NCOA3 utilizando la siguiente escala: sin tinción (0), tinción débil (1), tinción moderada (2), tinción intensa (3). Las matrices fueron puntuadas por un patólogo que desconocía la identidad de los casos, y cada puntuación se replicó por un ensayo de puntuación separado, independiente. Se determinó una puntuación consensuada para los pocos casos con puntuación discrepante en los ensayos replicados. Los controles de especificidad para la tinción de NCOA3 incluían, tumor de mama, líneas celulares de melanoma (LOX y FEM) y secciones de tejido de melanoma. Los controles positivos incluían secciones de tumor de mama, así como células LOX y FEM, mientras que los controles negativos incluían tejido de amígdalas y la línea celular T47D de carcinoma de mama. El control negativo que se utilizó para la inmunohistoquímica incluía el uso de solución salina tamponada de fosfato en vez del anticuerpo primario, manteniendo todas las otras condiciones experimentales constantes.

Análisis estadísticos

Los métodos estadísticos utilizados para evaluar el significado de varios factores pronósticos en el resultado del melanoma han sido descritos anteriormente (véase Kashani-Sabet M. y col., J Clin Oncol, 22:617-623, 2004; Kashani-Sabet M. y col., J Clin Oncol, 20:1826-1831,2002; Kashani-Sabet, M. y col., 137:1169-1173,2001). Tanto para RFS como para DSS, la definición de altas puntuaciones de NCOA3 (definidos como puntuaciones de 2 o 3) se seleccionaban basándose originalmente en los mejores puntos de corte por los valores predictivos de DSS en el análisis de Kaplan-Meier, y los mismos puntos de corte se utilizaron uniforme y consistentemente en todos los análisis univariados y multivariados posteriores de RFS y DSS. La asociación entre la alta expresión de NCOA3 y RFS o DSS se evaluaron utilizando el ensayo exacto de Fisher y tanto la regresión de Cox univariada y multivariada. Para el estado de los SLN, los mejores puntos de corte se determinaron como que tenían unas puntuaciones de 0 frente a 1 o 2 frente a 3 basándose en los resultados del análisis de regresión logística univariada, y los mismos puntos de corte se utilizaron uniforme y consistentemente para todos los análisis posteriores que examinaban el estado de los SLN. La asociación entre el aumento de expresión de NCOA3 y la metástasis en SLN se evaluó utilizando el análisis Chi cuadrado y la regresión logística tanto univariada como multivariada. La asociación entre el aumento de expresión de NCOA3 y el recuento medio de SLN se evaluó utilizando el análisis de varianza (ANOVA) y el ensayo Le direccional. Con la excepción de este análisis direccional, todos los valores de p comunicados eran de dos lados. Además de los factores pronósticos analizados por el AJCC, se incluyeron los siguientes factores en el grupo de datos: tasa mitótica, vascularización del tumor, presencia o ausencia de microsatélites, implicación vascular, y regresión. El código para los atributos clínicos o patológicos se llevó a cabo como se había descrito anteriormente (véase Kashani-Sabet M. y col., J Clin Oncol, 22:617-623,2004).

40 Resultados

Dados los resultados de micromatrices de ADN que sugieren una expresión diferencial del gen NCOA3 en melanomas metastáticos cuando se compraran con tumores primarios no relacionados, los inventores pretenden examinar el impacto sobre el pronóstico de la expresión de NCOA3 a nivel proteico en una TMA que contiene 343 centros de melanoma primario. La expresión de NCOA3 se analizó utilizando un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente que se dirige contra el NCOA3 humano (IgG anti-NCOA3 monoclonal de ratón (Abeam nº ab14139)), y fue puntuada por un observador que desconocía los resultados de los pacientes.

La expresión de NCOA3 era ausente en 20 (8%, Fig. 1 A) e intensa (valor de 3) en 111 (32,4%, Fig. 1 B) de los 343 centros examinados. La expresión de NCOA3 no se correlacionaba significativamente con el subtipo histológico de melanoma (datos no mostrados), con la posible excepción de los melanomas desmoplásicos, en los que solamente un tumor primario mostraba una tinción intensa. Además, la expresión de NCOA3 no se correlacionaba con varios factores histológicos de pronóstico conocidos para el melanoma, tales como espesor del tumor, ulceración, nivel Clark, tasa de mitosis, implicación vascular, microsatélites, o vascularización del tumor (datos no mostrados).

Primero, los inventores analizaron la asociación entre la expresión de NCOA3 y el resultado del melanoma por un análisis univariado. La alta expresión de NCOA3 (definida con un valor de 2 o 3) aumenta significativamente la recidiva del melanoma (52,2% frente al 35,9%, $p = 0,010$, ensayo exacto de Fisher) y reducía la RFS de los pacientes de melanoma en esta cohorte cuando se analizó por el análisis de Kaplan-Meier ($p = 0,021$, ensayo Log-Rank, Fig. 2 A). La alta expresión de NCOA3 se asociaba con riesgo aumentado de muerte debido a melanoma (31,9% frente al 18,5%, $p = 0,021$, ensayo exacto de Fisher) y reducía la DSS por el análisis de Kaplan-Meier ($p = 0,030$, ensayo Log-rank, Fig. 2B).

Además del riesgo de recaída y muerte, la expresión de NCOA3 se correlaciona significativamente con el estado de SLN positivos, una medición de micrometástasis en los ganglios regionales receptores, por análisis de regresión logística ($p = 0,013$). Los pacientes con una valoración de tinción de NCOA3 de 0 tenían un 7,1% de prevalencia de

positividad en SLN, que se incrementó al 27,4% en pacientes con un valor de 1 o 2, y un 38,3% en pacientes con un valor de 3 ($p = 0,036$, ensayo Chi cuadrado). Curiosamente, el nivel de expresión de NCOA3 también se correlacionaba con la carga tumoral en SLN al medirse por el número medio de SLN implicados. Por tanto, en los pacientes con un valor de tinción de NCOA3 de 0, el número medio de ganglios implicados era de 0,07. Esto aumentaba a 0,47 ganglios en pacientes con un valor de 1 o 2, y de 0,57 ganglios en pacientes con un valor de 3 ($p = 0,004$ ANOVA, $p = 0,030$ ensayo direccional Le).

Después, los inventores examinaron el impacto de la expresión de NCOA3 en el resultado del melanoma por el análisis multivariado. El análisis de regresión Cox multivariado se llevó a cabo, incluyendo el estado NCOA3 y seis factores pronósticos histológicos clínicos evaluados por la estadificación AJCC del comité para el melanoma, incluyendo el espesor y la ulceración del tumor, factores que se utilizan actualmente en la estadificación AJCC para clasificar el melanoma cutáneo (véase Balch CM y col., J Clin Oncol, 19:3622-3634,2001; Balch CM y col., J Clin Oncol, 19:3635-3648,2001). Estos análisis revelaron que el estado de NCOA3 predice independientemente tanto RFS (Tabla 2) como DSS (Tabla 3). En el análisis de regresión de Cox de DSS, el NCOA3 aparecía como el factor determinante más potente de la supervivencia, sobrepasando tanto al grosor como a la ulceración. Posteriormente, el análisis de regresión logística multivariado demostraba que la expresión de NCOA3 predice independientemente el estado de los SLN cuando se incluyeron los otros seis factores pronósticos en el modelo (Tabla 4).

Finalmente, los inventores pretenden evaluar el valor predictivo de varios factores pronósticos cuando los 12 factores incluidos en el grupo de datos (y disponibles para el análisis) se metieron en los modelos multivariados. Además de los siete factores mencionados previamente, este análisis incluía la tasa mitótica, el grado de vascularización del tumor, así como la presencia o ausencia de implicación vascular, microsatélites, y regresión. La sobre-expresión seguía prediciendo DSS y estado de los SLN (datos no mostrados), cuando los 12 factores se incluyeron en modelos multivariados.

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

Factor pronóstico	Relación de Riesgo	Chi-cuadrado	valor de P (de dos colas)
Nivel Clark	2,22	16,77	< 0,00005
Ulceración	1,94	13,86	0,0002
Nivel NCOA3 (2, 3 vs, 0, 1)	1,69	6,72	0,0095
Espesor del Tumor	1,27	5,28	0,022
Sitio	1,39	3,61	0,057
Edad	1,03	0,22	0,64
Sexo	1,04	0,04	0,85

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

Factor pronóstico	Relación de Riesgo	Chi-cuadrado	valor de P (de dos colas)
Nivel NCOA3 (2, 3 vs, 0, 1)	1,91	5,29	0,021
Espesor del Tumor	1,34	4,69	0,030
Ulceración	1,65	4,89	0,027
Nivel 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 de Cox del impacto de factores clínicos, histológicos y moleculares sobre la metástasis a SLN

Factor pronóstico	Chi-cuadrado	valor de P (de dos colas)
Disminución de edad	12,92	0,0003
Espesor del Tumor	8,10	0,0044
Nivel Clark	5,14	0,023
Nivel de expresión NCOA3 (2, 3 vs, 0, 1)	5,70	0,017
Sexo	1,43	0,23
Ulceración	0,79	0,37
Sitio	0,09	0,76

Conclusiones

Estos resultados muestran que la sobre-expresión de NCOA3 en melanomas primarios cutáneos se correlaciona significativamente con la recidiva del melanoma y la muerte específica de la enfermedad. La expresión de NCOA3 predecía significativamente la RFS y DSS de esta cohorte cuando los seis factores pronósticos por el comité de estadificación de AJCC analizados se incluyeron en los modelos multivariados. De manera importante, la expresión de NCOA3 supera el espesor tumoral en cada uno de estos análisis, y aparece como el factor más poderoso de predicción de DSS. Según la publicación de la clasificación de estadificación AJCC para el melanoma (véase Balch CM y col., J Clin Oncol, 19:3635-3648, 2001), unos cuantos factores pronósticos moleculares han demostrado tener una significación pronóstica independiente cuando los seis factores analizados por el comité de estadificación AJCC se incluyen en los modelos multivariados, subrayando la potencial significación de los hallazgos que correlacionan la expresión de NCOA3 y el resultado asociado con el melanoma.

Además, el estado de NCOA3 seguía proporcionando una información pronóstica independiente con respecto a DSS y estado de los SLN cuando los 12 factores pronósticos disponibles se incluyeron en el modelo. Este análisis incluía factores tales como la tasa de mitosis y la implicación vascular, que habían demostrado en varios análisis ser más potentes que la ulceración (véase Kashani-Sabet M. y col., J Clin Oncol, 20:1826-1831, 2002; Azzola M.F. y col., Cancer, 97:1488-1498, 2003). En conjunto, estos resultados demuestran la utilidad de NCOA3 como un marcador molecular nuevo, independiente del resultado del melanoma, con un impacto significativo sobre las medidas importantes para el resultado para el melanoma.

De manera interesante, las metástasis examinadas en el estudio del perfil de expresión génica que sobre-expresa NCOA3 eran metástasis primariamente a los ganglios linfáticos, indicando la importancia potencial de la expresión de NCOA3 para la metástasis a los ganglios linfáticos. No solo la alta expresión de NCOA3 se correlaciona con un aumento significativo del riesgo de metástasis a los SLN.

En consonancia con la fuerte correlación entre la expresión de NCOA3 y el estado de los SLN, se observaba que la alta expresión de NCOA3 se veía escasamente en el pequeño subgrupo de melanomas desmoplásicos incluidos en este análisis. Los inventores también llevaron a cabo inmunohistoquímica en un paciente con melanoma desmoplásico con biopsia de ganglios linfáticos centinelas. El análisis demuestra positividad en tanto el tumor primario así como en la metástasis positiva centinela (Figura 3). Esto sugiere la utilidad de la inmunotinción de NCOA3 para identificar casos de melanoma desmoplásico que tienen metástasis en los ganglios linfáticos centinelas.

Dada la predominancia de los pacientes sometidos a biopsia de SLN en este grupo de datos, es posible que algunos de los resultados comunicados en el presente documento puedan estar sesgados por una selección tendenciosa. Aún existe una controversia sobre la selección de pacientes sometidos a la biopsia de SLN de tumores finos (< 1,0 mm) y gruesos (> 1,0 mm), y subtipos histológicos particulares, tales como el melanoma desmoplásico. Por lo tanto, los criterios de selección utilizados para recomendar la biopsia de SLN pueden haber influenciado en los datos del resultado que se ha comunicado. Como resultado, la significación de la sobre-expresión de NCOA3 puede ser más relevante para pacientes que se someten a biopsia de SLN.

Finalmente, esos resultados revelan la significación con una base robusta de NCOA3 como un marcador pronóstico del cáncer dada su importancia en enfermedades malignas sensibles a hormonas e independientes de hormonas.

En conclusión, los resultados de los inventores muestran una correlación significativa entre la sobre-expresión de NCOA3 y el aumento del riesgo de recaída y reducción de la supervivencia asociada al melanoma. Además, revelan que la expresión de NCOA3 predice de manera independiente varias mediciones del resultado del melanoma, incluyendo DSS, RFS, y estado de los SLN, revelando que el NCOA3 es un nuevo marcador pronóstico para el melanoma cutáneo primario.

EJEMPLO 2: La Inhibición de NCOA3 suprime la progresión metastática del melanoma en los modelos murinos

Este ejemplo muestra que la expresión del gen NCOA3 es importante para el mantenimiento del fenotipo metastático en el melanoma. Los inventores utilizaron una ribozima sistémica no vírica (Kashani-Sabet, 2002) y el suministro génico basado en ARNsi con el fin de dirigirse al gen NCOA3. Se clonaron ribozimas cabeza de martillo y ARNsi dirigidos contra NCOA3 murino en el plásmido de expresión de los inventores, y los ratones que tenían el tumor se trataron con el control o con vectores de supresión de NCOA3 el día 3 y 10 después de la inoculación de células del tumor. Los análisis de la carga tumoral metastática en el pulmón (como evidencia el número de tumores pulmonares) demostraron un descenso significativo en animales tratados con la ribozima anti-NCOA3 o con ARNsi frente al vector control (Figura 4). El análisis de los pesos de los pulmones, otra medición de la carga tumoral metastática, reveló el Rz397 como la única construcción que suprimía significativamente los pesos de los pulmones de los ratones C57B1/6 (Figura 5). Estos estudios demostraron claramente la utilidad del perfil de expresión genética en la identificación de marcadores funcionales, como moleculares, de progresión del melanoma. Además, indican que los marcadores identificados por análisis de micromatriz de ADNc pueden representar dianas para la terapia del melanoma metastático.

De manera interesante, la administración de ribozima anti-NCOA3 que se dirige contra el nucleótido 397 también suprimía la progresión metastática de células de carcinoma de mama 4T1 en ratones BALB/c (Figura 6). En el modelo 4T1, la ribozima era superior en sus efectos antitumorales en comparación con el ARNsi que se dirige a la misma región de NCOA3, así como con el vector de control y la ribozima mutante incapacitada y ARNsi controles.

Finalmente, la transfección transitoria in vitro de Rz397 o ARNsi385 en células B16 de melanoma reducía la invasión de las células tumorales en matrigel, sugiriendo un mecanismo potencial por el que la dirección contra NCOA3 suprime la metástasis tumoral (Figura 7).

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

Los inventores llevaron a cabo análisis inmunohistoquímicos de la expresión de Wnt-2 en un grupo de ensayo de micromatrices de tejido de 40 nevos benignos y 376 melanomas primarios, y en un grupo de validación de 34 secciones de tejido de melanoma primario que aparecían en asociación con un nevo. Los nevos benignos mostraban una fuerte tinción para Wnt-2 en la zona de confluencia del nevo, con casi una pérdida total de expresión en la base del nevo. Por el contrario, los melanomas primarios mostraban un patrón de tinción más uniforme, sin una variación aparente en la tinción a lo largo de la fase de crecimiento vertical. La inmunotinción de Wnt-2 en la base de los melanomas primarios era significativamente más alta en todos los casos en comparación con la base del mismo nevo. Además, los valores de Wnt-2 para los melanomas primarios eran significativamente más altos en todos los casos cuando se comparaban con sus controles coincidentes en la base del nevo. Estos resultados presentados posteriormente validan la importancia de la ruta de activación WNT en la progresión del melanoma y revelan que Wnt-2 es un nuevo marcador para el melanoma.

Selección de nevos y melanomas para su incorporación en el grupo de datos

Se construyeron dos grupos de datos con el análisis llevado a cabo en este estudio: (i) un grupo de ensayo que consistía en una micromatriz de tejido de 138 nevos benignos y 376 melanomas primarios, y (ii) un grupo de validación de 34 secciones de tejido de melanomas primarios que aparecen a partir de un nevo. De los 138 nevos incluidos en las matrices de nevo, 40 tenían una porción incluida de epidermis en el centro para permitir el análisis preciso de la tinción de Wnt-2 en la zona de confluencia del nevo frente a la base del nevo. La composición de los 40 nevos en las micromatrices estudiadas es la siguiente: 5 compuestos de nevos adquiridos, 9 compuestos de nevos congénitos, 7 nevos adquiridos intradérmicos, 17 nevos congénitos intradérmicos, 1 nevo displásico adquirido, y 1 nevo de confluencia. Los subtipos histológicos del melanoma primario incluidos en las micromatrices de melanoma son los siguientes: 176 melanomas con diseminación superficial, 132 melanomas nodulares, 14 melanomas lentigo maligno, 22 melanomas acrales, 10 melanomas desmoplásicos, y 22 melanomas no clasificados de otra manera. En el grupo de validación, los inventores crearon secciones de tejidos de 34 casos de melanomas primarios que aparecen a partir de un nevo. De los 34 casos, 28 tenían un nevo con componentes tanto de confluencia como dérmicos, mientras que 31 tenían tanto nevo dérmico como melanoma invasivo. A continuación el análisis de los subtipos de nevo y melanoma es: 22 nevos congénitos, 8 nevos adquiridos, 1 nevo displásico, 19 melanomas de dispersión superficial, 7 melanomas nodulares, y 5 melanomas sin otra clasificación.

Matrices de tejido

Se crearon la micromatrices de tejido como se ha descrito anteriormente tomando centros de tejido de 1,0 mm de diámetro utilizando el instrumento de matrizado Beeche (véase Kononen, J. y col., Nat Med, 1998,4: 844-847; Kashani-Sabet M. y col., J Clin Oncol, 2004, 22: 617-623). Después de la construcción del bloque, se cortaron secciones 5 µm utilizando un microtomo de tejidos y se colocó en portaobjetos cargados. Se fabricaron un total de 16 matrices de melanoma y un total de 4 matrices de nevo con una media de aproximadamente 40 tejidos por matriz. Las matrices de melanoma incluían un total de 673 centros de tejido (457 melanomas primarios con centros duplicados de 150 pacientes). Las matrices de nevo incluían un total de 138 centros de tejido. De los 457 melanomas primarios en la micromatriz de tejido, 376 eran interpretables por tinción de Wnt-2.

Inmunohistoquímica

Los portaobjetos se hornearon a 60 °C durante 30 minutos antes de la tinción, y se desparafinaron y rehidrataron por enjuagues con xileno. Los portaobjetos entonces se metieron en el microondas con tampón citrato 10 mM. Se bloqueó la actividad de la 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 luego se lavaron con PBS. El anticuerpo primario IgG anti- Wnt-2 policlonal de cabra (Biovision) se añadió entonces con una dilución de 1:5 y se incubó durante una noche a 4 °C. Se utilizó como anticuerpo secundario un anticuerpo IgG anti-conejo de cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) para la amplificación, y a continuación se incubó con ABC-HRP (Vector Laboratories) durante 30 minutos y solución DAB/peróxido de hidrógeno (Sigma). Los portaobjetos se contrastaron con hematoxilinas y se montaron con Permount. Se utilizó el mismo protocolo de tinción inmunohistoquímica para las preparaciones de matrices de tejido

y secciones de rutina.

Evaluación de la tinción inmunohistoquímica

- 5 Las regiones de tinción más intensa se valoraron para cada matriz de centros de tejido y sección de tejido. La expresión de la proteína Wnt-2 se graduó utilizando la siguiente escala: sin tinción (0), tinción débil (1+), tinción moderada (2+), y tinción intensa (3+). Los especímenes con melanoma no invasivo o nevo o los especímenes que no eran interpretables se excluyeron del análisis. Las matrices y las secciones fueron valoradas por un patólogo sin conocimiento de la identidad de los casos con dos puntuaciones separadas y una puntuación de consenso para las
- 10 puntuaciones discrepantes. Los controles de especificidad para la tinción de Wnt-2 incluían tumor de mama, líneas celulares de melanoma (LOX y FEM) y secciones de tejido de melanoma.

Análisis estadístico

- 15 Los métodos estadísticos utilizados para valorar la significación de varios factores pronósticos sobre el resultado asociado con el melanoma eran los siguientes: en las micromatrices de tejido, la diferencia potencial entre la inmunotinción de Wnt-2 en la zona de confluencia del nevo y la base del nevo se ensayó utilizando un ensayo binómico de señal y el ensayo de rangos con signo de pares coincidentes de Wilcoxon. La diferencia potencial entre
- 20 la inmunotinción de Wnt-2 en la base del nevo y la base del melanoma se ensayó utilizando el ensayo de Mann-Whitney. En las secciones de tejidos de melanoma primario que aparece a partir de un nevo, la diferencia potencial entre la inmunotinción en la zona de confluencia del nevo y la base del nevo se ensayó utilizando el ensayo binómico de señal y el ensayo de rangos con signo de pares coincidentes de Wilcoxon. La diferencia potencial entre
- 25 inmunotinción de Wnt-2 en la base del nevo y en la base del melanoma se ensayó utilizando el ensayo binómico de señal y el ensayo de rangos firmados de parejas coincidentes de Wilcoxon.

Resultados

- 30 Según los resultados de matrices de ADNc de los inventores que muestran la expresión diferencial de la ruta WNT en melanomas cuando se comparan con nevos, pretendieron probar la expresión diferencial de Wnt-2 en una gran cohorte independiente de neoplasias melanocíticas. En este momento, los inventores construyeron un grupo de ensayo que contenía micromatrices de tejido con 138 nevos melanocíticos y 376 melanomas primarios, y un grupo de validación de 34 secciones de tejido que contenían melanomas primarios con un nevo pre-existente. La expresión de Wnt-2 se analizó utilizando un anticuerpo monoclonal disponible comercialmente que se dirige contra Wnt-2 humano. En el proceso de optimización de la tinción inmunohistoquímica para Wnt-2, los inventores han encontrado un curioso patrón de tinción para Wnt-2 en nevos benignos. Los nevos benignos mostraban una fuerte tinción para Wnt-2 en la zona de confluencia del nevo, con casi pérdida total de expresión en la base del nevo (Figura 8).

- 40 Como resultado de estos hallazgos, los inventores restringieron sus análisis de expresión de Wnt-2 en las micromatrices de tejido de nevos a aquellos centros de nevo que contenían una pieza de epidermis, tal que fuera posible la comparación de la inmunotinción entre la zona de confluencia del nevo y la zona de la base del nevo. Esto redujo el grupo de matrices de nevo eficaces a 40 casos. En cada uno de los 40 casos examinados, la inmunotinción de Wnt-2 era mayor en la zona de confluencia del nevo, cuando se comparaba con su correspondiente base, un hallazgo que era altamente significativo ($p < 0,00005$, ensayo binómico de señal). La pérdida de inmunotinción de
- 45 Wnt-2 en la base del nevo era aún significativa cuando se dividieron en dos subtipos de nevo para los dos subtipos histológicos más comunes de nevo presentes en las matrices, a saber nevos intradérmicos y compuestos melanocíticos ($p < 0,001$, ensayo binómico de señal).

- 50 Después, los inventores examinaron la inmunotinción de Wnt-2 en una matriz de tejido que tenía 376 centros de melanomas primarios. Al contrario que con los nevos, los melanomas primarios demostraron un patrón de tinción más uniforme, sin disminución de la tinción a lo largo de la fase de crecimiento vertical (Figura 9). La gran mayoría de los melanomas primarios analizados demostraron alguna expresión de Wnt-2, ya que la tinción estaba ausente en solo 8 casos (3,8%). Además, la fuerza de la expresión de Wnt-2 estaba presente uniformemente a lo largo de los diferentes subtipos histológicos de melanoma (Tabla 5). No había una correlación significativa entre la expresión de
- 55 Wnt-2 y varios marcadores de pronóstico bien conocidos para el melanoma, incluyendo el espesor del tumor, el nivel Clark, ulceración, tasa mitótica, microsátélites, y la implicación vascular (datos no mostrados).

Tabla 5. Grado de expresión de Wnt-2 a lo largo de diferentes subtipos histológicos de melanoma primario

Subtipo Histórico	Puntuación de Wnt-2			
Número 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)

Subtipo Histórico	Puntuación de Wnt-2			
Número de casos (%)	0	1	2	3
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 con diseminación superficial; NM, melanoma nodular; LMM, melanoma lentigo maligno; AM, melanoma acral; DM, melanoma desmoplásico; NOC, melanoma no clasificado de otra manera.

Los inventores compararon entonces la inmunotinción de Wnt-2 en los melanomas primarios con los observados en los nevos. Dado el patrón de la expresión de Wnt-2 en los nevos, los inventores compararon la puntuación de Wnt-2 en la base del nevo con la observada en la base del melanoma. La puntuación media en la base de los melanomas (1,88) era significativamente mayor que la puntuación media en la base de los nevos (0,57, $p < 0,00005$, ensayo T sin par).

Con el fin de examinar más la expresión diferencial de Wnt-2 entre los nevos y los melanomas primarios observados en las micromatrices de tejido, los inventores razonaron que un agrupamiento óptimo en el que evaluar las diferencias potenciales eran los casos de melanoma con nevos pre-existentes, para los cuales muchos factores confusos potenciales (edad, género, localización anatómica, y subtipos histológicos potencialmente irrelevantes de nevo y melanomas, entre otros) se controlan automáticamente creando de esta manera un análisis de pares coincidentes de-facto. Por lo tanto, los inventores reunieron un grupo de validación de 34 casos de melanoma primario en asociación con un nevo, y llevaron a cabo la tinción inmunohistoquímica de Wnt-2 en 5 μ M secciones de tejido.

Inicialmente, los inventores analizaron la expresión de Wnt-2 en la zona de confluencia del nevo frente a la base del nevo. De los 34 casos, 28 tenían zonas tanto de confluencia como de base del nevo presentes en la sección. En cada uno de los 28 casos, la inmunotinción de Wnt-2 en la zona de confluencia del nevo era mayor que en su base correspondiente, un hallazgo que era altamente significativa ($p < 0,00005$, ensayo binómico de señal y ensayo de rangos con signo, parejas coincidentes de Wilcoxon). El drástico descenso de la expresión de Wnt-2 en la base del nevo se corroboró analizando el porcentaje de casos con puntuaciones altas de Wnt-2 frente a las bajas. Así, el 90,6% de las zonas de confluencia puntuaban 2 o 3, mientras el 94,1% de la base de nevos puntuaban un 0 o un 1 (Tabla 6). De manera interesante no había ausencia de tinción (puntuación de 0) en la zona de confluencia de ningún nevo y no había tinción fuerte (puntuación 3) en la base de los nevos examinados, ilustrando más esta dicotomía.

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

Puntuación Wnt-2	Zona de confluencia del Nevo	Base del Nevo
	(% de casos que expresan la puntuación)	
0/1 +	9.4%	94.1%
2/3+	90.6%	5.9%

Finalmente, los inventores compararon el patrón de expresión de Wnt-2 en la base del melanoma con el de la base de su nevo asociado en los especímenes teñidos. De los 34 casos, 31 tenían tanto bases de melanoma como bases de nevo para compararse. En 29 casos, la inmunotinción de Wnt-2 era significativamente mayor en el melanoma cuando se comparaba con su correspondiente base del nevo (como se muestra en la Figura 11), con dos casos que mostraban idénticas puntuaciones de Wnt-2 ($p < 0,00005$, ensayo binómico de señal y pares coincidentes de Wilcoxon, ensayo de rangos de señal). En ningún caso la expresión de Wnt-2 era mayor en la base del nevo cuando se comparaba con el melanoma. Una vez más, este fenómeno se reflejó en la fuerza de la tinción de Wnt-2 en los nevos y melanomas. Así, el 100% de los melanomas tenían una puntuación de Wnt-2 mayor de 0, al compararse con el 32,4% de los nevos (Tabla 7). Ninguno de los melanomas tenía expresión de Wnt-2 ausente (puntuación 0), y ninguno de los nevos mostraron una tinción fuerte (puntuación de 3) en su base.

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

Puntuación Wnt-2	Base del Melanoma	Base del Nevo
0 (% casos que expresan puntuación)	0%	67,6%
>0 (%casos que expresan puntuación)	100%	32,4%

Los inventores también llevaron a cabo la inmunotinción de Wnt-2 sobre tres cohortes adicionales, (i) nevos displásicos, (ii) nevos de Spitz, y (iii) neoplasias melanocíticas mal diagnosticadas. Los análisis revelaron que la expresión de Wnt-2 diferencial observada en las cohortes de nevos se podían extender específicamente a los nevos displásicos ($p < 0,05$) y nevos de Spitz ($p = 0,004$), subtipos de nevos que se destacan por la dificultad para

distinguirlos del melanoma a nivel histopatológico. En cada uno de los casos, la inmunotinción de Wnt-2 era mayor en la zona de confluencia del nevo que en la zona de la base del nevo, hallazgos que eran ambos estadísticamente significativos. Finalmente, los inventores analizaron 7 casos en los que se diagnosticó erróneamente una neoplasia melanocítica ambigua basándose en la recurrencia posterior de la enfermedad (5 casos que se diagnosticaron de nevo se probó que fue incorrectamente) o tras una revisión por patólogos expertos (2 casos donde se anuló el diagnóstico de melanoma). En 6 de los 7 casos, el patrón de inmunotinción de Wnt-2 apuntaba al diagnóstico correcto eventual, incluyendo los cinco casos mal diagnosticados inicialmente como nevos. Estos resultados muestran la capacidad de la inmunotinción de Wnt-2 para ayudar en el diagnóstico de neoplasias melanocíticas ambiguas debido a su capacidad de diagnosticar correctamente el 85,7% de tales casos.

Conclusiones

En este estudio, los inventores proporcionan pruebas convincentes de la expresión diferencial de Wnt-2 a nivel proteico en la progresión del melanoma. Los resultados indican claramente que el Wnt-2 se expresa diferencialmente en melanomas cuando se comparan con nevos melanocíticos, tanto en el análisis de micromatrices de tejido así como en el análisis de pares coincidentes, en los que cada melanoma se emparejaba con su nevo pre-existente. En este último análisis, se encontraba que los melanomas solamente expresaban altamente Wnt-2 en su base, y solo los nevos mostraban tener ausencia de expresión de Wnt-2 en su base.

Además, se observó un patrón interesante de la expresión de Wnt-2 en los nevos melanocíticos. En cada caso examinado la expresión de Wnt-2 era significativamente menor en la base del nevo que en su zona de confluencia. Además, la inmunotinción de Wnt-2 estaba ausente en la base de un porcentaje significativo (55%) de los nevos examinados con ambos estudios de matrices y el análisis del melanoma que aparecía a partir de un nevo.

Las diferencias significativas en el patrón de tinción de Wnt-2 en nevos frente a melanomas muestra la utilidad de la inmunotinción de Wnt-2 en el diagnóstico molecular de las neoplasias melanocíticas ambiguas. Los resultados de las matrices de tejido de melanoma y nevos muestran una especificidad del 98% para la alta tinción de Wnt-2 en el diagnóstico del melanoma, con una especificidad del 70%. Los datos distinguen entre nevos y melanomas basándose en el nivel de expresión de Wnt-2. Las lesiones melanocíticas que se teñían intensamente en la base (puntuación de 2 o 3+) tenían alta probabilidad de que fueran melanomas (99,6%). Las lesiones que mostraban poca tinción en su base (puntuación de 0 a 1) eran melanomas en el 30% de las veces, dando lugar a la sensibilidad observada. Sin embargo, estas lesiones serían analizadas entonces en su zona de confluencia, donde los nevos demostraban descenso de la tinción en las partes más profundas en virtualmente cada caso, mientras que los melanomas demostraban una tinción uniforme entre las zonas de confluencia y la más profunda. Hasta la fecha, mientras que los marcadores de proliferación de células tumorales (tales como Ki-67, véase Smolle, J. y col., Am J Dermatopathol, 1989,11:301-307; Rieger, E. y col., J Cutan Pathol, 1993,20:229-236; Kaleem, Z. y col., Mod Pathol, 2000,13:217-222) se han analizado por su papel en este dilema diagnóstico diferencial, no se ha visto ningún marcador que muestre una fuerte diferencia en la expresión entre nevos y melanomas para que sea clínicamente útil.

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

Los resultados de la micromatriz de ADNc descritos en la presente invención también permiten distinguir entre marcadores de diagnóstico y de pronóstico en melanoma. El perfil de expresión genética revelaba que distintas firmas de expresión genéticas caracterizaban la transición de nevo a melanoma primario así como de melanoma primario a melanoma metastático (véase Haqq C. y col., Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 6092-6097). En consecuencia, los marcadores que se expresaban diferencialmente en el nevo en transición a melanoma pueden ser más útiles como marcadores diagnósticos, mientras que los marcadores identificados en la transición de primario a metástasis pueden ser más útiles como marcadores pronósticos. Esto está refrendado por los resultados de la inmunotinción de Wnt-2 que sugieren su mayor utilidad como marcador diagnóstico que como marcador pronóstico. Aunque había una diferencia significativa entre la inmunotinción de Wnt-2 de nevos y melanoma, no había una asociación significativa entre la expresión de Wnt-2 y varios marcadores pronósticos conocidos de melanoma.

Con el fin de analizar el beneficio terapéutico potencial de la dirección contra Wnt-2 de la progresión metastática, los inventores analizaron la eficacia antitumoral del suministro sistémico de ribozimas cabeza de martillo que se dirigen contra el Wnt-2 murino en el melanoma B16. Se inyectaron células B16 por vía intravenosa en ratones C57B1/6, y se trataron los ratones bien con un vector control vacío, o con un vector plásmido que expresaba la ribozima anti-

Wnt-2 7 días después de la inyección de células tumorales. La carga metastática se evaluó por el número de tumores pulmonares en el sacrificio. Como se muestra en la Figura 10, una sola inyección de ribozima anti-Wnt-2 que expresaba la construcción daba como resultado una supresión significativa de los tumores grandes (> 2 mm) de pulmón dependientes angiogénicos. Estos estudios apoyan el papel de la dirección contra el Wnt-2 en la supresión de la progresión metastática.

En conjunto, estos resultados muestran la importancia de Wnt-2 para la transformación de melanocitos. Aunque la activación de la ruta WNT parece que se produce precozmente en el desarrollo del melanoma, los datos de los estudios tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que la expresión de Wnt-2 es necesaria para el mantenimiento de la supervivencia y la proliferación de las células de melanoma. La dirección contra Wnt-2 con bases tanto de anticuerpos como de ARNsi resultaba en la inducción de apoptosis en varias líneas celulares de melanoma, *in vitro*, y en una significativa supresión del crecimiento de xenoinjertos *in vivo*. Los estudios preliminares obtenidos en el laboratorio de los inventores también sugieren la necesidad de la expresión de Wnt-2 para la progresión metastática del melanoma en modelos murinos (véase la Figura 10, posteriormente). Por lo tanto, estos resultados sugieren la utilidad terapéutica potencial de la dirección contra Wnt-2 como una estrategia terapéutica racional para el melanoma. Y el ensayo de inmunotinción que se utiliza en el presente documento puede ayudar a la identificación de una cohorte de pacientes elegible para una estrategia terapéutica dirigida con inhibidores específicos de Wnt-2.

En conclusión, los estudios de los inventores demuestran la expresión diferencial de la ruta WNT en los melanomas frente a los nevos, confirmando los resultados obtenidos previamente del perfil de expresión genética de neoplasias melanocíticas. Además, confirman la importancia de la activación de Wnt-2 en la progresión del melanoma. Finalmente, enseñan la utilidad de Wnt-2 como un nuevo biomarcador del melanoma y como una diana potencial para la terapia.

EJEMPLO 4: Papel de la PHIP en el melanoma

Los inventores han evaluado el papel del gen de la PHIP (proteína que interactúa con el dominio de homología pleckstrina) en el fenotipo invasivo y metastático del melanoma. Los inventores diseñaron varias ribozimas e inhibidores de ARNsi del PHIP murino, y se clonaron en un plásmido de expresión. El suministro sistémico de las ribozimas basadas en el plásmido, y los ARNsi dirigidos contra PHIP en ratones C57B1/6 que tenían un melanoma B16, daba como resultado la supresión significativa de la progresión metastática (como se prueba por el número de tumores de pulmón) cuando se inyectaban los días 3 y 10 después de la inoculación de las células tumorales. Además, los inventores examinaron los mecanismos por los que la PHIP contribuye a la progresión del melanoma (Figura 12). Llevaron a cabo transfecciones transitorias de células B16 con plásmidos que expresaban bien la ribozima activa o los ARNsi descritos anteriormente, o las ribozimas incapacitadas o ARNsi de control, y se examinaron estas células transfectadas para ver la invasión en el ensayo de matrigel. Estos resultados revelaban la supresión significativa de la invasión por los ARNsi y ribozimas anti-PHIP (Figura 13). En conjunto, estos resultados identifican un nuevo fenotipo pro-invasivo y metastático de PHIP en el melanoma, apuntando a la PHIP como una diana racional para la terapia de la metástasis del melanoma.

EJEMPLO 5: Papel de la osteopontina en el melanoma

Los inventores también han examinado el papel pronóstico de la expresión de osteopontina en el melanoma. Los inventores evaluaron la inmunotinción de OPN en una micromatriz de tejido que contenía 350 especímenes de melanoma primario sometidos a biopsia de ganglios linfáticos centinela, con dos años de seguimiento, o que tuvieron una recaída documentada. La expresión de OPN se registraba como 0 (ausente), 1 (débil), 2 (moderada), y 3 (intensa). Según el análisis univariado, el aumento de la expresión de OPN se correlacionaba con el riesgo de metástasis en SLN (como se determinaba por regresión logística), así como reducía la supervivencia libre de recaídas (RFS) y la supervivencia total (OS), como se determinó por análisis de Kaplan-Meier. Según el análisis de regresión logística multivariado, el aumento de la expresión de OPN (definida como puntuación de 0 frente a 1, 2 y 3) predecía independientemente la metástasis en SLN con la inclusión de otros 6 marcadores de melanoma conocidos. Según el análisis de regresión multivariado de Cox, la alta expresión de OPN (definida como la puntuación de 0 y 1 frente a 2 y 3) predecía independientemente la reducción de la supervivencia libre de recaídas y la supervivencia total (véase las Tablas 8 y 9, a continuación). Estos resultados identifican la OPN como un marcador independiente y nuevo para el pronóstico del melanoma dado su papel en la predicción del estado de los SLN, la RFS, y la OS.

Tabla 8. Análisis de regresión logística del impacto de los factores clínicos, histológicos y moleculares sobre la metástasis a los SLN

Factor pronóstico	Chi-cuadrado	Valor de P
Edad descendente	15,35	< ,001
Espesor del tumor	10,70	,001
Expresión OPN (1,2,3 vs. 0)	7,60	,006
Nivel Clark	1,82	,18

Factor pronóstico	Chi-cuadrado	Valor de P
Sexo	1,81	,18
Sitio	0,80	,37
Ulceración	0,43	,51

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

Factor pronóstico	Relación de riesgo	Chi-cuadrado	Valor de P
Nivel OPN (2,3 vs. 0,1)	1,60	6,37	,012
Nivel Clark	1,68	5,84	,016
Ulceración	1,55	5,77	,016
Espesor Tumoral	1,29	5,03	,025
Sitio	1,44	3,53	,06
Edad	1,06	1,29	,26
Sexo	1,065	,10	,75

EJEMPLO 6: Número de copias de NCOA3 en el melanoma

Los inventores también han determinado el número de copias de NCOA3 en el melanoma por hibridación de fluorescencia in situ (FISH). Desarrollaron un ensayo FISH para detectar la expresión de NCOA3 y analizaron 4 casos de melanoma que mostraban sobre-expresión de NCOA3 (Figura 14). Esta es la primera demostración de que la elevación del número de copias del gen NCOA3 está presente en el melanoma.

EJEMPLO 7: Expresión de RGS 1 en el melanoma

El impacto pronóstico de la expresión de RGS1 sobre el resultado del melanoma se examinó en una micromatriz de tejido de 301 pacientes. La expresión de RGS1 se determinó utilizando el análisis inmunohistoquímico de especímenes tumorales de melanoma primarios archivados, y fue puntuada con una escala de 4 puntos (0-3) basándose en la intensidad de tinción por un patólogo que desconocía el resultado de los pacientes.

La alta expresión de RGS1 se correlacionaba con el aumento del espesor del tumor. En los tumores con un valor de RGS1 de 1 o 0, la media de espesor tumoral era de 2,2 mm, con aumentos de 4,09 mm en tumores con un valor de más de 0 ($p < 0,00005$, ensayo T). Además, el aumento de la expresión de RGS1 se correlacionaba con el aumento de la vascularización tumoral ($p = 0,045$). El aumento de la expresión de RGS1 se correlacionaba significativamente con el estado de los SLN según el análisis de regresión logística univariado ($p = 0,04$, estadística Chi cuadrado 4.12). La expresión aumentada de RGS1 también se correlacionaba con el aumento de la carga de los SLN, como se determinó por el número medio de SLN positivos. Por tanto, en pacientes con un valor de RGS1 de 0, el número medio de SLN positivos era 0,118, que aumentaba a 0,415 en los casos con un valor de 1 o 2 y 0,723 en los casos con un valor de 3 ($p = 0,0055$ por ANOVA). Según el análisis de Kaplan-Meier, la alta expresión de RGS1 (definida como un valor de 2 o 3) se asociaba con un empeoramiento significativo de la supervivencia específica de la enfermedad (DSS) cuando se comparaba con los casos con baja expresión de RGS1 (valor de 0 o 1) ($p = 0,018$, ensayo log-rank).

El análisis de regresión multivariado de Cox mostraba que el RGS1 predecía significativa e independientemente el resultado asociado con el melanoma como se determina por los análisis de supervivencia libre de recaída (Tabla 10), supervivencia total (Tabla 11), y supervivencia específica de la enfermedad (Tabla 12). Según la regresión paso a paso de Cox, el nivel Clark, la ulceración, el sitio y la expresión de RGS1 seguían prediciendo significativamente la OS. Por la regresión paso a paso de Cox, el espesor y expresión de RGS1 seguían prediciendo significativamente la DSS. Con la inclusión de 12 factores histológicos o clínicos de pronóstico, la expresión de RGS1 predecía independientemente la RFS ($p = 0,04$), OS ($p = 0,036$) y DSS ($p = 0,01$) según el análisis de regresión paso a paso de Cox. Estos resultados establecen que RGS1 es un factor pronóstico nuevo e independiente para el melanoma.

Tabla 10. Análisis de regresión de Cox del impacto de varios factores sobre la supervivencia libre de recaída (RFS) de la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	RELACIÓN DE RIESGO	CHI-CUADRADO	VALOR DE P
Nivel Clark	1,97	22,9	< ,00005
Ulceración	2,01	14,2	,0002
Nivel RGS (0,1,2,3)	1,30	6,65	,0099
Sitio	1,29	2,01	,16
Edad	,94	1,25	,26

FACTOR PRONÓSTICO	RELACIÓN DE RIESGO	CHI-CUADRADO	VALOR DE P
Sexo	1,22	1,12	,29
Espesor Tumoral	1,12	,87	,35

Tabla 11. Análisis de regresión de Cox del impacto de varios factores sobre la supervivencia total en la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	RELACIÓN DE RIESGO	CHI-CUADRADO	VALOR DE P
Nivel Clark	1,43	5,25	,022
Ulceración	1,72	6,98	,0083
Nivel RGS (0,1,2,3)	1,34	6,63	,01
Sitio	1,49	3,71	,054
Edad	1,06	,98	,32
Espesor Tumoral	1,24	2,69	,10
Sexo	1,31	1,54	,22

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

FACTOR PRONÓSTICO	RELACIÓN DE RIESGO	CHI-CUADRADO	VALOR DE P
Nivel RGS (0,1,2,3)	1,43	7,09	,0077
Nivel Clark	1,52	5,47	,019
Ulceración	1,54	3,30	,069
Espesor Tumoral	1,29	2,74	,098
Sitio	1,29	1,22	,27
Sexo	1,23	,71	,40
Edad	,98	,05	,82

EJEMPLO 8: Ensayo con dos y tres marcadores para el pronóstico

- 5 Los inventores analizaron el impacto de la expresión combinada de marcadores sobre el resultado del melanoma. Para empezar, los inventores examinaron la positividad de los SLN en 309 muestras de melanomas primarios en los 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 basándose en los puntos de corte establecidos por medio de regresión logística.
- 10 La expresión alta de NCOA3 se definió como un valor de 2 y 3, mientras que la expresión alta de SPP1 se definía como una valoración de más de 0. En los casos con bajos valores de ambos marcadores, la positividad se producía el 0% de las veces; esto aumentaba al 12,5% en casos con baja SPP1 y alta NCOA3, al 26,7% en casos con baja NCOA3 y alta SPP1, y al 37,0% en casos con altas valoraciones de ambos marcadores. El impacto del aumento de la expresión de los marcadores sobre el estado de los SLN era altamente significativo (valor de p 0,0007 de dos
- 15 colas). Además, el aumento del número de marcadores sobre-expresados predecía significativamente el estado de los SLN como se determinaba por el análisis de regresión logística univariado (estadística de Chi-cuadrado 14.7, p = 0,0001). Un análisis de regresión logística univariado que analizaba el número de marcadores expresados altamente (0, 1, o 2) mostraba un impacto significativo sobre el estado de los SLN con aumento de la sobre-expresión del marcador (p = 0,0004). Luego, los inventores examinaron el impacto de la expresión combinada de marcadores
- 20 sobre la carga tumoral de los SLN, según se determinó por el número medio de SLN positivos. En los casos con bajos valores de ambos marcadores, el número medio de SLN positivos era 0; esto aumentaba al 0,25% en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, del 0,38 en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y del 0,63 en casos con altos valores para ambos marcadores. El impacto del aumento de la expresión de marcadores sobre la carga tumoral de los SLN era también significativo (ensayo direccional de Kruskal-Wallis, 0,01, ensayo de significación direccional Le, 0,0066).
- 25 Después, se examinó el impacto de la expresión combinada de marcadores sobre la supervivencia libre de recaídas (RFS) del melanoma en esta cohorte. En los casos con bajos valores de ambos marcadores, la media de RFS era de 0,45 años; esto aumentaba a 0,50 en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, de 0,55 en los casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y de 0,56 en casos con altas valoraciones para ambos marcadores (ensayo de significación direccional Le, 0,0091). Además, el número en aumento de marcadores sobre-expresados predecía significativamente la RFS
- 30 como se determinó por el análisis de regresión de Cox univariado (p = 0,017). De forma similar, había un impacto sobre la supervivencia total (OS) cuando los datos del marcador se combinaban. En los casos con bajas valoraciones para ambos marcadores, la media de OS era de 0,47 años, esto aumentaba a 0,51 en los casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, 0,55 en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y 0,57 en casos de altas valoraciones en
- 35 ambos marcadores (ensayo de significación direccional de Le 0,018). Finalmente, había un impacto sobre la supervivencia específica de la enfermedad (DSS) cuando las puntuaciones de la expresión del marcador se combinaban. Así, en los casos con bajas puntuaciones de ambos marcadores la media de DSS era de 0,47 años, esto aumentaba a 0,52 en casos con bajo SPP1 y alto NCOA3, 0,52 en casos con bajo NCOA3 y alto SPP1, y 0,50

en casos con altas puntuaciones para ambos marcadores (valor de p 0,04 ANOVA, ensayo de significación direccional de Le, 0,0069). Además el aumento del número de marcadores sobre-expresados predecía significativamente la DSS según se determinó por el análisis de regresión de Cox univariado ($p = 0,013$).

- 5 Finalmente, el impacto de las puntuaciones de expresión de marcadores combinados se analizó utilizando análisis multivariados. El impacto de los datos de la expresión combinada del marcador sobre el estado de los SLN se analizó utilizando regresión logística. Estos análisis mostraban que el estado de NCOA3/SPP1 combinados era el factor máximo determinante del estado de los SLN, superando los marcadores histológicos de rutina. (Tabla 13, a continuación) Según los análisis de regresión paso a paso, solamente el estado de NCOA3/SPP1 ($p = 0,0013$),
 10 espesor del tumor ($p = 0,016$) y la implicación vascular ($p = 0,039$) predecían significativamente el estado de los SLN.

- 15 Cuando se utilizan múltiples marcadores, los reactivos para estos marcadores pueden aplicarse y examinarse simultáneamente, o secuencialmente, o ambos. Cuando se utilizan múltiples marcadores, la etapa de determinar la cantidad de expresión puede efectuarse por medio de los marcadores simultáneamente, secuencialmente o ambos.

Tabla 13. Análisis de regresión de Cox del impacto de varios factores sobre los SLN en la cohorte de melanoma

FACTOR PRONÓSTICO	CHI-CUADRADO	VALOR DE P (DOBLE COLA)
Nivel Combinado de NCOA3/SPP1	9,08	,0026
Implicación Vascular	6,05	,014
Espesor del tumor	3,95	,047
Nivel Clark	2,89	,089
Regresión	2,71	,10
Microsatélites	1,38	,24
Ulceración	,36	,55
Tasa Mitótica	,34	,56
Vascularización Tumoral	,0024	,96

- 20 El impacto de la puntuación combinada de expresión de marcadores, sobre la RFS se examinó utilizando la regresión de Cox multivariada. Por el análisis de regresión paso a paso, el estado combinado de NCOA3/SPP1 ($p = 0,02$), nivel Clark ($p = 0,0002$), ulceración ($p < 0,00005$), tasa mitótica ($p = 0,0003$) y microsatélites ($p < 0,00005$) predecían significativamente el estado de los SLN.

- 25 Finalmente, el impacto de la puntuación de expresión combinada del marcador sobre la DSS se examinó también utilizando la regresión de Cox multivariada. Este análisis mostraba que el estado de NCOA3/SPP1 combinados era un factor independiente que determinaba la DSS cuando se incluían 9 factores histológicos en el modelo (Tabla 14, a continuación). Por el análisis de regresión de Cox paso a paso, los microsatélites ($p = 0,0001$), tasa mitótica ($p = 0,0002$), ulceración ($p = 0,0066$), y el estado combinado NCOA3/SPP1 ($p = 0,029$) seguían prediciendo significativamente la DSS. Estos resultados establecen la significación del impacto pronóstico de las puntuaciones combinadas de expresión de marcadores, y demuestra la utilidad de un ensayo pronóstico multi-marcadores para el
 30 melanoma dado su impacto independiente sobre el estado de SLN, RFS, y DSS. El RGS1 también se ensayó en un ensayo de tres marcadores con NCOA3/SPP1, con resultados preliminares que mostraban un impacto significativo sobre la DSS (Tabla 15).

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

FACTOR PRONÓSTICO	RELACIÓN DE RIESGO	CHI-CUADRADO	VALOR DE P (DOS COLAS)
Microsatélites	3,77	14,2	,0002
Tasa Mitótica	1,89	5,68	,017
Nivel combinado NCOA3/SPP1	1,69	4,32	,038
Nivel Clark	1,69	2,80	,09
Implicación Vascular	1,25	,60	,44
Regresión	,44	2,35	,44
Ulceración	1,22	,45	,50
Espesor del Tumor	1,10	,36	,55
Vascularización del Tumor	1,18	,33	,57

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

FACTOR PRONÓSTICO	RELACIÓN DE RIESGO	CHI-CUADRADO	VALOR DE P (DOS COLAS)
Nivel combinado NCOA3/SPP1/RGS1	3.33	7.48	.0062
Estado de SLN	1.80	3.93	.047
Espesor del Tumor	1.50	3.34	.068
Nivel 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 8: Ensayo multi-marcador para distinguir nevos benignos de melanomas malignos**5 Introducción**

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

10

Métodos

Pacientes de estudio: Se construyeron varios grupos de datos, compuestos por 699 neoplasias melanocíticas, para los análisis que se llevaron a cabo en este estudio: un grupo de entrenamiento, que consistía en una micromatriz de tejido (TMA) de 119 nevos benignos y 421 melanomas primarios, y cuatro grupos de validación: secciones de tejido de 38 melanomas que aparecían a partir de un nevo (que resultaron en 75 neoplasias melanocíticas evaluables); 39 nevos displásicos; 21 nevos de Spitz; y 24 neoplasias melanocíticas mal diagnosticada inicialmente. La composición del grupo de 119 nevos en el estudio de TMA es el 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 sin clasificar. Los subtipos histológicos de los 421 melanomas primarios incluidos en la TMA de entrenamiento eran los siguientes: 202 melanomas diseminados superficiales; 135 melanomas nodulares; 23 melanomas acrales; 18 melanomas lentigo malignos; 16 melanomas desmoplásicos; y 27 melanomas no clasificados de otra manera. En el grupo de tejidos que contenía melanomas primarios que aparecían en asociación con un nevo, el análisis del subtipo histológico para el nevo y el melanoma era el siguiente: 22 nevos congénitos; 1 nevo compuesto congénito; 1 nevo intradérmico congénito; 23 melanomas diseminados superficiales; 7 melanomas nodulares; y 7 melanomas no clasificados de otra manera.

Matrices de tejido: Las micromatrices de tejido se generaron de acuerdo con el método descrito por Kononen J, y col., Nat Med, 1998, 4:844-7; y Kashani-Sabet M, y col., J Clin Oncol, 2004, 22:617-23. Se hicieron un total de 16 matrices de melanoma y un total de 4 matrices de nevo con una media de aproximadamente 40 centros de tejido por matriz. Las matrices de melanoma incluían un total de 673 centros de tejido (457 melanomas primarios con centros duplicados para 150 de los pacientes). Las matrices de nevos incluían un total de 138 centros de tejido.

Inmunohistoquímica: Los portaobjetos se hornearon a 60 °C durante 30 min antes de la tinción, y se desparafinaron y se rehidrataron por enjuagues con xileno. Los portaobjetos entonces se metieron en el microondas en tampón citrato 10 mM. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3%. En el caso de Wnt-2, después de lavar con PBS, los portaobjetos se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos con suero de conejo normal para reducir la tinción de fondo no específica y luego se lavó con PBS. En el caso de FN1, los portaobjetos se incubaron secuencialmente con los reactivos de bloqueo Avidina y Biotina. Entonces, se añadió el anticuerpo primario [IgG anti-Wnt-2 policlonal de cabra (Biovision, dilución 1:5); IgG anti-SPP1 policlonal de conejo (Abeam, dilución 1:200) IgG anti-FN1 policlonal de conejo (Dako, dilución 1:400); IgG anti-ARPC2 policlonal de conejo (Upstate, dilución 1:50); e IgG anti-RGS1 de pollo (GeneTex, dilución 1:100 para TMA y dilución 1:50 para secciones de tejido)] y se incubó una noche a 4 °C. Se utilizó como anticuerpo secundario para la amplificación anti-conejo de cabra biotinilado, anticuerpo IgG anti-pollo o de conejo anti-cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y a continuación se incubó con ABC-HRP (Vector Laboratories) durante 30 min, y DAB/solución de peróxido de hidrógeno. Los portaobjetos se positivaron con hematoxilina y se montaron con permount. Excepto donde se ha indicado, se utilizó el mismo protocolo de tinción inmunohistoquímica para los portaobjetos de matrices de tejido y de secciones de rutina.

Evaluación de la tinción inmunohistoquímica: Las regiones de tinción más intensa se puntuaron para cada centro de tejido de la matriz y sección de tejido. La expresión de las proteínas marcadoras se graduaron sobre la intensidad celular utilizando la siguiente escala: sin tinción (0), tinción débil (1), tinción moderada (2), y tinción intensa (3). La intensidad de expresión del marcador se puntuó tanto en la confluencia entre la epidermis y la dermis (zona de

confluencia, o “arriba”) de la neoplasia así como en su base (“abajo”). Las localizaciones de “arriba” y “abajo” en términos de tumor se refieren a la parte de arriba del crecimiento vertical (invasivo) del tumor y el área más profunda de la invasión tumoral, respectivamente. En términos del nevo asociado, se identificaron y registraron tres tipos de referencia de nevos (véase, por ejemplo, Sagebiel RW., J Invest Dermatol, 1993; 100:3225-3255 para la clasificación). En el patrón congénito de nevos, la parte de arriba se registró en la región confluencia dérmica y/o papilar y la de abajo en la parte más oscura del nevo identificado en la dermis reticular. En el patrón de nevos adquiridos, la parte de arriba fue registrada en la región de confluencia y la de abajo en la parte más profunda identificada como nevo en la dermis papilar. De manera similar, en los nevos displásicos, el crecimiento lateral adyacente al nevo precursor caracteriza la atipia aleatoria y los cambios arquitecturales de displasia, y la parte de arriba se registró en la región de confluencia y la de abajo en la parte más profunda identificada del nevo en la dermis papilar y/o dermis reticular. Los especímenes sin melanoma ni nevo se excluyeron del análisis. Los especímenes que no eran interpretables debido a una tinción insuficiente o a la falta de características estructurales se trataron como falta de observación. Las matrices y secciones fueron puntuadas por un patólogo que desconocía la identidad de las lesiones con dos puntuaciones por separado y se determinó una puntuación de consenso en las puntuaciones discrepantes para todos los marcadores. La especificidad externa de los controles positivos para varios anticuerpos eran las siguientes: tumor de mama (Wnt-2, SPP1); líneas celulares de melanoma LOX y FEM (Wnt-2, ARPC2, SPP1); secciones de tejido de melanoma (Wnt-2, FN1, ARPC2, RGS1 SPP1); riñón normal (FN1); timo (RGS1) y linfoma no Hodgkin (RGS1). El control negativo técnico utilizado por inmunohistoquímica incluía el uso de solución salina tamponada de fosfato en vez de anticuerpo primario, manteniendo todas las otras condiciones iguales.

Análisis estadístico: Se evaluó la eficacia del diagnóstico de cada intensidad de marcador (en la base de la neoplasia melanocítica) por regresión logística univariada. La eficacia del diagnóstico de la intensidad de la combinación de los cinco marcadores se evaluó por regresión logística multivariada. Por el ensayo multi-marcador, la eficacia del diagnóstico se analizó utilizando las curvas de características operativas de receptor (ROC) y se calculó el área bajo la curva. Las proporciones de especificidad y sensibilidad se calcularon y se analizaron utilizando 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 utilizando el ensayo Mann-Whitney. Se ensayó la diferencia entre la intensidad de la inmunotinción del marcador en la lesión de la zona de confluencia y la lesión en la base también para cada marcador utilizando el ensayo de Mann-Whitney. Todos los valores de p comunicadas son de dos lados.

Para evaluar la fiabilidad de las puntuaciones de expresión de marcadores, se compararon las puntuaciones de intensidad de Wnt-2 con la media de intensidad densitométrica (derivada del análisis por imagen cuantitativa) para cada caso del grupo de entrenamiento. Inicialmente, se identificaron cuatro intervalos secuenciales de media de intensidad densitométrica que correspondían más estrechamente con la escala de expresión del marcador de 0-3. Luego la coincidencia entre las puntuaciones de expresión del marcador Wnt-2 y su media de intensidad densitométrica (cuando ambas estaban disponibles) se definió como el porcentaje de lesiones en las que ambas, la intensidad de la expresión del marcador y la media de intensidad densitométrica, equivalentes de manera diagnóstica. Se definió la concordancia de porcentajes similares para las puntuaciones Wnt-2 y se computó para hallar las diferencias entre las puntuaciones de expresión “de arriba a abajo”.

Basándose en los datos de 540 lesiones en el grupo de entrenamiento, se obtuvieron los algoritmos de diagnóstico de MDMS (Surprise, AZ). Estos algoritmos confirmaron primero una lesión con características displásicas o Spitzoides que era o bien un nevo displásico o de Spitz, y luego se diagnosticaron todas las lesiones no confirmadas bien como un tipo diferente de nevo benigno o como un melanoma. Se obtuvieron algoritmos de diagnóstico separados para las puntuaciones de la diferencia “de arriba a abajo”, por sí mismas, y para la diferencia de puntuaciones para “de arriba a abajo” combinadas con las puntuaciones de las intensidades de expresión. El algoritmo diagnóstico final que englobaba cada uno de estos algoritmos aparece en la Figura 2. Este algoritmo diagnóstico final se aplicó a las lesiones de los cuatro grupos de validación.

Resultados

Los inventores confirmaron a continuación la expresión diferencial de proteínas de varias de las transcripciones correspondientes identificadas en su estudio anterior y examinaron la utilidad de un ensayo diagnóstico con multi-marcadores para melanoma en una gran cohorte independiente de neoplasias melanocíticas. En este punto, los inventores reunieron un grupo de tejidos de 699 neoplasias melanocíticas, que comprendían un grupo de entrenamiento de TMA con 540 melanomas primarios, y nevos melanocíticos, y cuatro grupos de validación que comprendían secciones de tejidos y 159 neoplasias melanocíticas relevantes para el diagnóstico diferencial de nevo frente a melanoma. Se analizó la expresión de cinco marcadores seleccionados (ARC2, FN1, RGS1, SPP1 y Wnt-2) inicialmente en el grupo de entrenamiento utilizando anticuerpos disponibles comercialmente dirigidos contra las proteínas mencionadas anteriormente. Cada marcador se puntuó en una escala de cuatro puntos según la intensidad de tinción.

En el proceso de optimización de la tinción inmunohistoquímica de los marcadores, se observó un curioso patrón de tinción en los nevos benignos. Los nevos benignos mostraban sistemáticamente una tinción más fuerte en la zona

de confluencia del nevo, con pérdida de expresión en la base del nevo. Por el contrario, la expresión de los marcadores era más uniforme en las partes invasivas de los melanomas en comparación con la de entre la zona lesional de confluencia y la base. Como resultado, los inventores puntuaron las TMA según la intensidad de expresión tanto en la zona de confluencia ("arriba") así como en la base ("abajo") de cada neoplasia melanocítica en la que la orientación de la lesión era claramente demostrable en el centro del espécimen representado en las matrices.

Inicialmente, cada uno de los cinco marcadores se evaluó individualmente para determinar su capacidad para diagnosticar un melanoma frente a un nevo, utilizando la escala de intensidad de cuatro puntos aplicada a la base de cada lesión. Se identificó la mejor forma de partición entre cada escala de cuatro puntos de los marcadores (mostrado en la Tabla 16). El mejor método de partición de la escala se definió como el que maximizaba el resultado del valor Chi-cuadrado asociado con su análisis de regresión logística univariado. Se evaluó también la capacidad de cada marcador particionado óptimamente para discriminar entre nevos y melanomas de acuerdo con sus proporciones de sensibilidad y especificidad diagnósticas. Se demostró que cada uno de los cinco marcadores moleculares estaba sobre-expresado significativamente en melanomas al compararse con los nevos (Tabla 16).

Se llevaron a cabo varios análisis para examinar si la combinación de marcadores era útil en su capacidad para diagnosticar el melanoma. Específicamente, los inventores examinaron un análisis enfocado en la puntuación de intensidad de expresión de abajo sola, otro enfocando la diferencia de expresión entre la lesión en la zona de confluencia y la base (análisis de "arriba a abajo"), y un tercer análisis que englobaba ambos tipos de datos.

Para empezar, los inventores llevaron a cabo un análisis examinando las puntuaciones de intensidad de expresión asignadas a la base de cada lesión de los cinco marcadores combinados. Se combinaron las puntuaciones de expresión del marcador particionado óptimamente por medio de regresión logística múltiple, y se le asignó una probabilidad de ser maligno a cada una de las lesiones para las que estaban disponibles los datos completos. Las probabilidades asignadas se particionaban entonces en su punto óptimo de separación, alcanzando una especificidad del 93,6% y una sensibilidad del 75,8% ($p < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher). Además, se construyó una curva de característica operativa del receptor (ROC) por este análisis multi-marcador y se muestra en la Figura 1, con un área bajo la curva asociada (AUC) de 0,9105.

Con fines ilustrativos, los inventores replicaron este análisis para cada uno de los marcadores individualmente, y para las combinaciones de 3 marcadores. Los análisis de un solo marcador (por ejemplo, FN1) mostraba el AUC más pequeño de 0,5622, que aumentaba a un nivel intermedio de 0,7036, cuando se incluyeron dos marcadores adicionales (ARPC2 y SPP1), culminando en un AUC de 0,9105, cuando los cinco marcadores se incluyeron en el modelo.

En segundo lugar, los inventores llevaron a cabo un análisis utilizando solo las diferencias en la expresión del marcador "de arriba a abajo" para los cinco marcadores. El análisis de la expresión del marcador en la zona de confluencia de la lesión frente a la base mostraba que los nevos perdían expresión de forma consistente para cada uno de los cinco marcadores cuando se comparaban con melanomas, en la que la inmunotinción del marcador era mucho más uniforme. Este patrón de expresión de marcador de "arriba a abajo" notablemente diferente entre nevos y melanomas se replicó para cada uno de los cinco marcadores, cuando se analizó por el ensayo de Mann Whitney (datos no mostrados), con una especificidad y sensibilidad para cada marcador indicada en la Tabla 17. De hecho, en el caso de un marcador, el Wnt-2, había una separación perfecta de las dos distribuciones de puntuación de la diferencia de "arriba a abajo" entre nevos y melanomas en las 144 lesiones analizadas. Así, cada nevo analizado iba perdiendo expresión desde su zona de confluencia hasta su base, mientras que cada melanoma tenía una expresión uniforme desde la zona de confluencia hasta su base. Esta discriminación perfecta entre el nevo y el melanoma en el caso de Wnt-2 hacía imposible confiar en la regresión logística como única herramienta analítica. El procedimiento de estimación de regresión logística no produce la máxima probabilidad estimada de los coeficientes de regresión en vista de tal discriminación perfecta. Así, con el fin de analizar la validez del diagnóstico del patrón de la expresión del marcador, cuando los cinco marcadores se combinaban, se obtuvo un algoritmo diagnóstico que consistía en 14 criterios discriminatorios. Los primeros cuatro criterios enfocados para la confirmación (o no) de si una lesión con características displásicas realmente era un nevo displásico. Los diez criterios restantes enfocados a la diferencia en las puntuaciones de expresión vertical de lesiones no displásicas determinaron ser consistentes direccionalmente con los ensayos de Mann Whitney mencionados anteriormente. La aplicación de estos algoritmos de diagnóstico a las 540 lesiones en el grupo de entrenamiento dio lugar a una especificidad del 84,6% y una sensibilidad del 98,7% ($p < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher).

Con el fin de abordar la fiabilidad de la puntuación de expresión y las diferencias "de arriba a abajo", se llevó a cabo un análisis cuantitativo por imagen. Las lesiones con tinción de Wnt-2 en el grupo de entrenamiento se escanearon digitalmente y se calculó la media de la intensidad densitométrica para cada lesión. La concordancia entre la escala de intensidad del marcador y la media de la intensidad densitométrica era del 90,3% cuando se calculaba como el porcentaje de lesiones diagnosticadas idénticamente, utilizando los puntos de corte correspondientes para el diagnóstico de melanoma ($p < 0,00005$, ensayo Mann Whitney). Los inventores también evaluaron la concordancia en las diferencias entre las puntuaciones de la expresión "de arriba a abajo", y observaron un acuerdo del 98,4% entre las puntuaciones de intensidad del marcador y el análisis de media densitométrica ($p < 0,00005$, ensayo Mann

Whitney) El análisis de regresión logística de la puntuación de la media de intensidad densitométrica sola reproducía la precisión diagnóstica de Wnt-2 ($p < 0,00005$) identificada por las puntuaciones de intensidad del marcador. Además, un análisis "de arriba a abajo" de las puntuaciones de la intensidad media densitométrica de Wnt-2 mostraba una especificidad del 97,1%, con una sensibilidad del 96,6%, reproduciendo los resultados encontrados por las puntuaciones de la expresión del marcador.

Finalmente, los inventores pretendieron explorar la utilidad del ensayo multi-marcador para diagnosticar el melanoma utilizando tanto las puntuaciones de expresión del marcador así como las diferencias "de arriba a abajo". Una vez más, se daba la separación perfecta en las puntuaciones de expresión vertical para Wnt-2, los inventores no fueron capaces de usar la regresión logística. Por tanto, se obtuvo un algoritmo utilizando tanto los datos de las puntuaciones de la intensidad de expresión como la expresión diferencial entre la lesión de la zona de confluencia frente a la base (mostrado en la Figura 2) para discriminar entre nevo y melanoma. Curiosamente, cuando la expresión del marcador se examinaba en los nevos, todos los 21 nevos displásicos incluidos en el grupo de entrenamiento eran identificables justo en la base por sus puntuaciones de intensidad de la expresión de ARPC2 y FN1. Se desarrolló entonces un algoritmo separado, para confirmar como efectivamente displásicos todos los nevos con características displásicas. Este algoritmo de confirmación contenía cuatro criterios de discriminación basados en la intensidad de expresión de ARPC2 y FN1. El algoritmo para nevos displásicos se combinó entonces con un algoritmo basado en las diferencias "de arriba a abajo" así como las puntuaciones de expresión del marcador. La aplicación de este algoritmo final de diagnóstico al grupo de entrenamiento alcanzaba una especificidad del 94,9% y una sensibilidad del 90,6% en el diagnóstico del melanoma ($p < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher). Se llevaron a cabo análisis adicionales utilizando este algoritmo de diagnóstico solo.

Para validar el ensayo multi-marcador desarrollado en el grupo de entrenamiento, los inventores examinaron tanto la intensidad como el patrón de expresión de los cinco marcadores por su expresión en cuatro grupos de validación distintos con mayor relevancia para la distinción histológica entre nevo y melanoma. En las TMA los inventores pretendían reunir una gran cohorte de neoplasias melanocíticas, para validar la expresión diferencial de los marcadores derivados del análisis de la micromatriz de ADNc, así como examinar la utilidad de su ensayo multi-marcador. Aunque, ciertos subtipos de nevos no presentaban un dilema diagnóstico diferencial, y ciertos subtipos de melanoma no aparecían de nevos pre-existentes.

Con el fin de validar los resultados del grupo de entrenamiento, un agrupamiento óptimo para evaluar diferencias potenciales en la expresión consistía en los casos de melanoma que aparecían en asociación con nevos pre-existentes, para los que se controlaron automáticamente los muchos factores que producen confusión (edad, género, localización anatómica, y subtipos histológicos potencialmente irrelevantes de nevo y melanoma, entre otros). Por tanto, los inventores agruparon un grupo de validación de 38 casos de melanoma primario en asociación con un nevo, que resultaba en 75 neoplasias melanocíticas evaluables. Además, los inventores reunieron dos grupos adicionales de validación directamente relevantes para su diagnóstico histológico diferencial: 21 casos de nevos de Spitz; y 39 casos de nevos displásicos. Estos son dos de los subtipos de nevo más problemáticos comúnmente en el diagnóstico histológico diferencial de nevo frente a melanoma. Finalmente, los inventores examinaron la expresión del marcador en un grupo de datos de 24 lesiones mal diagnosticadas anteriormente, incluyendo 6 lesiones diagnosticadas inicialmente como melanomas que fueron diagnosticados posteriormente como nevos por revisión dermatopatológica de consenso, y 18 lesiones inicialmente diagnosticadas como nevos que posteriormente habían recurrido localmente y/o habían metastatizado y que se diagnosticaron retrospectivamente como melanomas. En todos los grupos de validación, en vista de la importancia de la expresión del marcador en la zona de confluencia frente a la base del nevo, los inventores examinaron la expresión del marcador utilizando el análisis inmunohistoquímico en secciones de tejido de 5 μM .

Utilizando los algoritmos con ambos, la puntuación de la intensidad de la expresión del marcador así como las diferencias en las puntuaciones de expresión "de arriba a abajo", el ensayo multi-marcador alcanzaba una especificidad del 94,7% y una sensibilidad del 97,3% en el diagnóstico de melanoma en los 75 melanomas que aparecían a partir de un nevo (Figura Suplementaria xx). Además, el algoritmo desarrollado del análisis de nevos displásicos en la TMA identificaba correctamente el 94,9% (37/39) de secciones de nevos displásicos y el 95,2% (20/21) de nevos de Spitz. Finalmente, el ensayo multi-marcador diagnosticaba correctamente 18/24 (un 75,0%) de las lesiones mal diagnosticadas previamente. Cuando los distintos grupos de entrenamiento y de validación de neoplasias melanocíticas se combinaban, el ensayo multi-marcador daba una especificidad del 85,1% y una sensibilidad del 90,5% ($p < 0,00005$, ensayo exacto de Fisher). Una comparación de la sensibilidad, especificidad y AUC del ensayo multi-marcador en los distintos grupos de datos y que utilizan varios algoritmos diagnósticos se presentan en la Tabla 18.

Conclusiones

Este ejemplo desvela un ensayo molecular multi-marcador para distinguir el melanoma del nevo benigno utilizando cinco biomarcadores que fueron sugeridos por un reciente análisis de micromatrices de ADNc. En esos análisis, un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado separaba correctamente nevos de melanomas en un pequeño número de neoplasias melanocíticas disponibles recientemente basándose en los perfiles de expresión genética, y demostró un gran grupo de genes que se expresaban diferencialmente en melanomas frente a nevos (véase Haqq

C. y col. Proc Natl Acad Sci USA, 2005; 102:6092-7). En este ejemplo, los inventores validaron la expresión diferencial de cinco de los genes sugeridos por ese análisis, y ensayaron la utilidad de un ensayo multi-marcador para diagnosticar melanomas frente a nevos. Este ensayo inmunohistoquímico multi-marcador mostraba una especificidad del 94,9% y una sensibilidad del 90,6% en un grupo de entrenamiento comprendido por una TMA que contenía un gran número de nevos y melanomas primarios. En base a este análisis, el ensayo de diagnóstico multi-marcador se sometió entonces a cuatro grupos de validación diferentes con relevancia directa para el diagnóstico diferencial de nevo frente a melanoma, y era capaz de diagnosticar con precisión un alto porcentaje de melanomas que aparecían a partir de un nevo, nevos de Spitz y displásicos, así como neoplasias melanocíticas mal diagnosticadas previamente. En el grupo de datos combinados, el ensayo de multi-marcador daba una especificidad del 95,1% y una sensibilidad del 90,5% en el diagnóstico de melanoma.

Los resultados demuestran que un ensayo multi-marcador que comprende niveles de expresión proteica de ARPC2, FN1, RGS1, SPP1 y Wnt-2 puede ser útil en el diagnóstico diferencial de nevo frente a melanoma, lo que representa una de las tareas más desalentadoras en patología. El presente estudio es el mayor hasta la fecha que analiza la utilidad de marcadores moleculares en el diagnóstico del melanoma y único en utilizar el grupo completo de tejidos que es necesario debido a la heterogeneidad histológica de nevos como de melanomas. El ensayo multi-marcador corregía las tres cuartas partes de los casos en los que se había dado un diagnóstico patológico incorrecto, incluyendo los melanomas mal diagnosticados inicialmente como un nevo, en los que el comportamiento clínico de la lesión había iniciado una revisión del informe patológico anterior. Por lo tanto, el ensayo multi-marcador descrito en el presente documento se puede utilizar para ayudar en el diagnóstico histológico de melanoma, proporcionando de esta manera nueva información a los patólogos y otros médicos responsables de la atención a los pacientes que tienen neoplasias melanocíticas ambiguas.

Una ventaja importante de esta invención es que se pueden evitar los errores en el diagnóstico de melanoma. Tales errores causan que muchos pacientes no se sometan a la terapia apropiada. Además, los errores diagnósticos de melanoma es la segunda razón más común de las reclamaciones por mala praxis en Estados Unidos, solamente superada por los errores en el diagnóstico de cáncer de mama (véase Troxel D.B., Am J Surg Pathol, 2003; 27: 1278-83). Los pacientes diagnosticados erróneamente de un melanoma tienen un miedo permanente de recaer y no son capaces de obtener un seguro de vida, mientras que a los pacientes diagnosticados erróneamente con un nevo se les priva de la terapia adecuada para su enfermedad maligna, lo que incluye potencialmente la biopsia de ganglios linfáticos centinelas y la terapia sistémica adyuvante. Los resultados demuestran que el ensayo multi-marcador puede revertir (y por lo tanto evitar potencialmente) un alto porcentaje de errores causados por los análisis histológicos de rutina de las neoplasias melanocíticas.

La expresión diferencial de los marcadores sugeridos por el análisis de micromatriz de ADNc no era uniforme en los análisis inmunohistoquímico del nevo, ya que la zona de confluencia del nevo frecuentemente expresa los marcadores a un nivel mayor que la base del nevo. Esto es completamente lo contrario que con la mayoría de los melanomas, que mostraban una uniformidad en el análisis "de arriba a abajo" de la expresión del marcador. Como resultado, el patrón de la expresión proteica era un discriminador significativo entre nevo y melanoma y, en general, superior a los valores absolutos de expresión de las transcripciones. Mientras los resultados confirman la expresión diferencial de los genes identificados primero por el análisis de transcriptoma, refinan la información conseguida por ese análisis demostrando que la mayor diferencia en la expresión génica radica en la base de la neoplasia melanocítica.

Una de las razones por las que los inventores seleccionaron la inmunohistoquímica para validar los resultados de la matriz de ADNc en oposición a otros ensayos, potencialmente más cuantitativos, tales como la PCR cuantitativa, era la capacidad de la inmunohistoquímica para proporcionar in situ análisis de la expresión genética para la lesión en cuestión. Los resultados describen la utilidad de un ensayo molecular que se podría desarrollar como adjunto al análisis histopatológico de nevos y melanomas.

Aunque el análisis inmunohistoquímico es naturalmente semi-cuantitativo, los inventores evaluaron la fiabilidad de las puntuaciones de intensidad del marcador observadas utilizando análisis cuantitativos por imagen. Los inventores encontraron una alta tasa de concordancia (> 90%) entre la precisión diagnóstica de las puntuaciones de la intensidad del marcador observadas y la media de intensidad densitométrica determinada a partir del análisis cuantitativo, y una tasa de concordancia aún mayor (98%) en las diferencias de las puntuaciones de expresión "de arriba a abajo". Dado que un algoritmo de diagnóstico se enfoca solamente en las puntuaciones de la zona de confluencia de la lesión frente a las de la base se producía una especificidad del 84,6% y una sensibilidad del 98,7% en el grupo de entrenamiento, los datos sugerían la facilidad potencial con la que los análisis de estos marcadores podrían aplicarse al diagnóstico de neoplasias melanocíticas en el entorno clínico.

Aunque se ha observado un descenso vertical de la inmunotinción con otros varios marcadores, incluyendo S100A6, Melan-A, y HMB-45, estos marcadores no tienen valor para distinguir entre nevos y melanomas primarios, debido a que no se expresan diferencialmente en nevos frente a melanomas (véase Busam K.J., y col., Am J Surg Pathol., 1998, 22:976-82; Fullen D.R., y col., J Cutan Pathol, 2001;28:393-9; Kucher C, y col., Am J Dermatopathol, 2004;26:452-7; Haqq C. y col., Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:6092-7). Además, en algunos de estos estudios, los nevos intradérmicos eran el tipo de nevo dominante que se examinó. Los nevos intradérmicos se conocen por

sufrir una “maduración” significativa en su base. En este estudio, la regulación negativa de la inmunotinción del marcador se observó en la base de nevos intradérmicos, nevos compuestos, así como en nevos de Spitz y displásicos. Esto indica la mayor utilidad de este ensayo multi-marcador con una base amplia como marcador diagnóstico molecular para el melanoma.

5

En este ejemplo, los inventores describen un ensayo inmunohistoquímico multi-marcador que puede diagnosticar neoplasias melanocíticas con un alto grado de precisión, ayudando de esta manera en este difícil diagnóstico patológico diferencial.

Tabla 16. Discriminación entre melanoma y nevo con el uso solo de puntuaciones de expresión de un único marcador

Marcador	Partición Óptima de Escala	Chi-cuadrado	Valor de p
ARPC2	0 vs. 1, 2 vs. 3	24,2	<,00005
FN1	0 vs. 1, 2 vs. 3	4,75	,0294
RGS1	0, 1, 2 vs. 3	8,98	,0027
SPP1	0,1 vs. 2, 3	11,1	,0009
WNT2	0, 1, 2, 3 (escala entera)	86,6	<,00005

10

Tabla 17. Precisión diagnóstica para el melanoma utilizando la puntuación de la zona de confluencia de lesión frente a la lesión en la base (“de arriba a abajo”) en los datos de entrenamiento para cada marcador individual.

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

Tabla 18. Comparación de la sensibilidad, especificidad y AUC de ensayo multi-marcador para el diagnóstico de melanoma en varios grupos de tejidos y utilizando diferentes algoritmos* de diagnóstico

Grupo de datos	Algoritmo Diagnóstico	Especificidad (%)	Sensibilidad (%)	AUC
Entrenamiento	Intensidad del marcador solo	93,6	75,8	,9105
Entrenamiento	Expresión Vertical sola	84,6	98,7	,9165
Entrenamiento	Puntuaciones de Expresión Combinada	94,9	90,6	,9277
Entrenamiento y Validación	Puntuaciones de Expresión Combinada	95,1	90,5	,9275

* valor de p para cada análisis < ,00005 (ensayo exacto de Fisher)

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar un melanoma en un sujeto, comprendiendo el método las etapas de:
 - 5 (a) poner en contacto una muestra biológica del sujeto con anticuerpos que se unen específicamente a un panel de marcadores que comprenden los polipéptidos RGS1, ARPC2, Fibronectina 1 (FN1), osteopontina (SSP1) y Wnt-2; y
 - 10 (b) determinar si cada marcador seleccionado se sobre-expresa o no en la muestra; proporcionando de esta manera un diagnóstico de melanoma en el sujeto.
2. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - 15 (a) la etapa de determinación comprende la correlación del aumento de la expresión de cada marcador con un fenotipo metastásico para las células de la muestra; o
 - 20 (b) el diagnóstico distingue entre nevos benignos frente al melanoma maligno.
3. El método de la reivindicación 1, donde la muestra es una biopsia de piel.
4. Un kit para su uso en el diagnóstico del melanoma en un sujeto, comprendiendo el kit anticuerpos que se unen específicamente a un panel de marcadores que comprenden los polipéptidos RGS1, ARPC2, Fibronectina 1 (FN1), osteopontina (SSP1) y Wnt-2

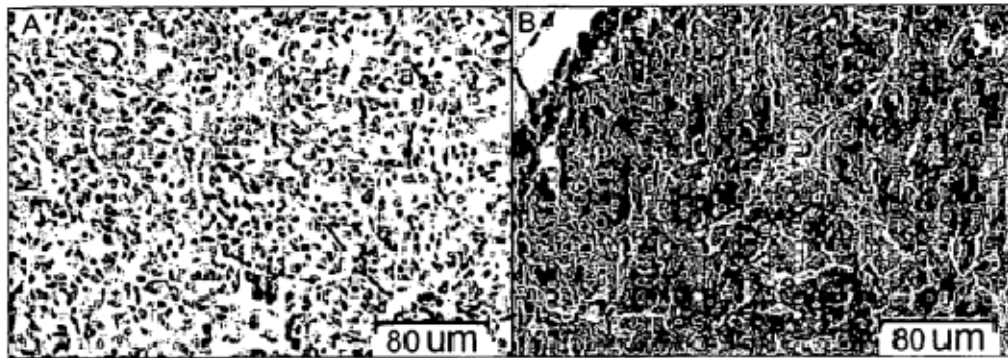


Fig. 1

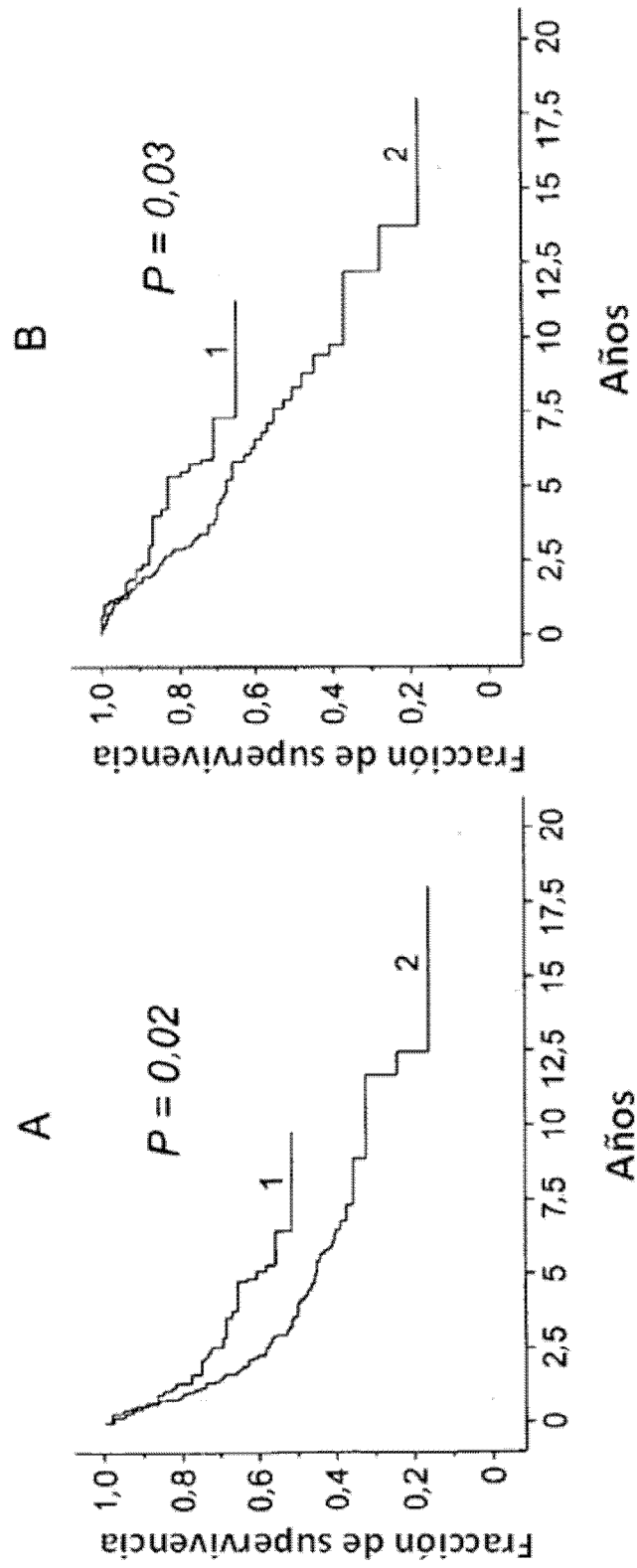


Fig. 2

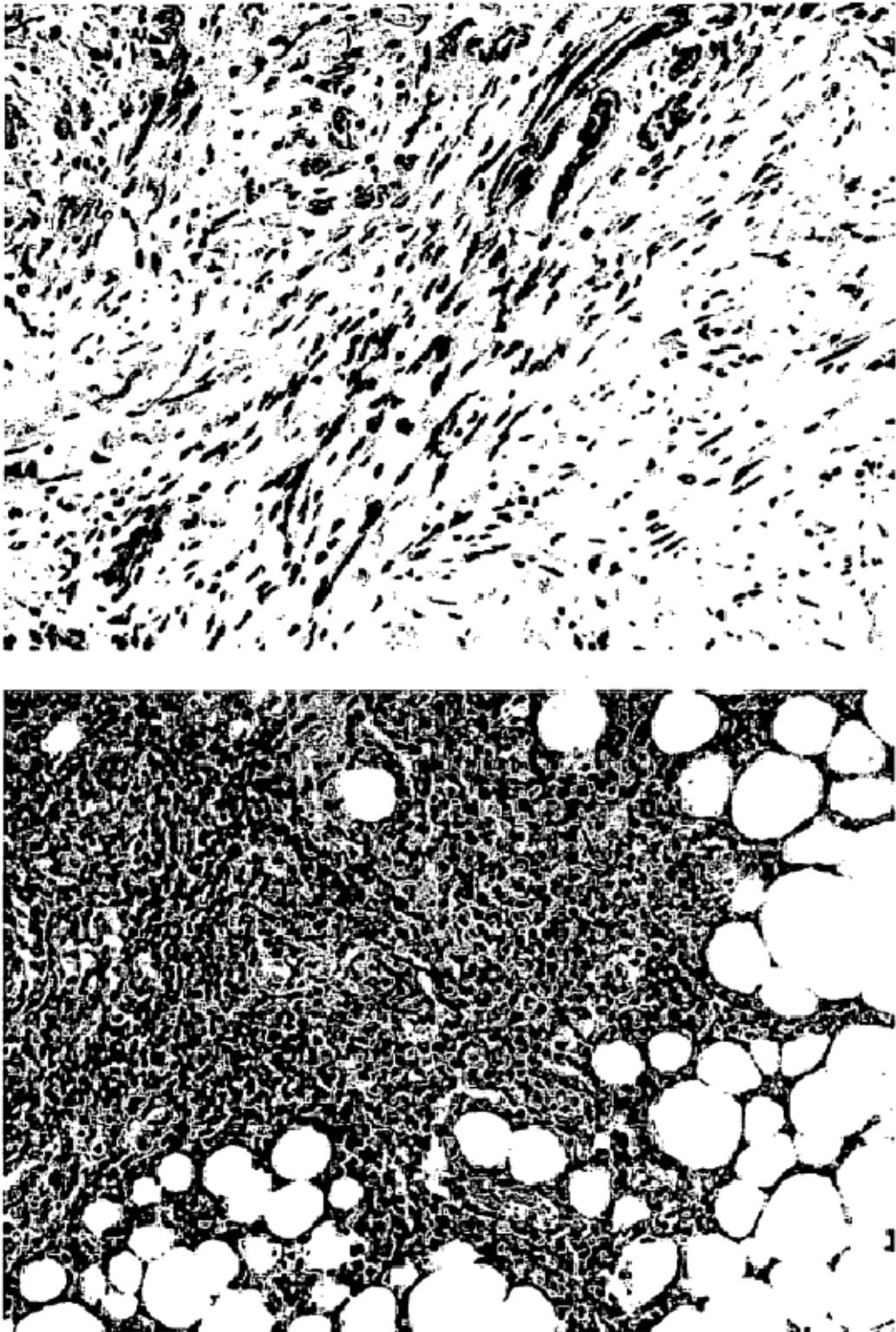


Fig. 3

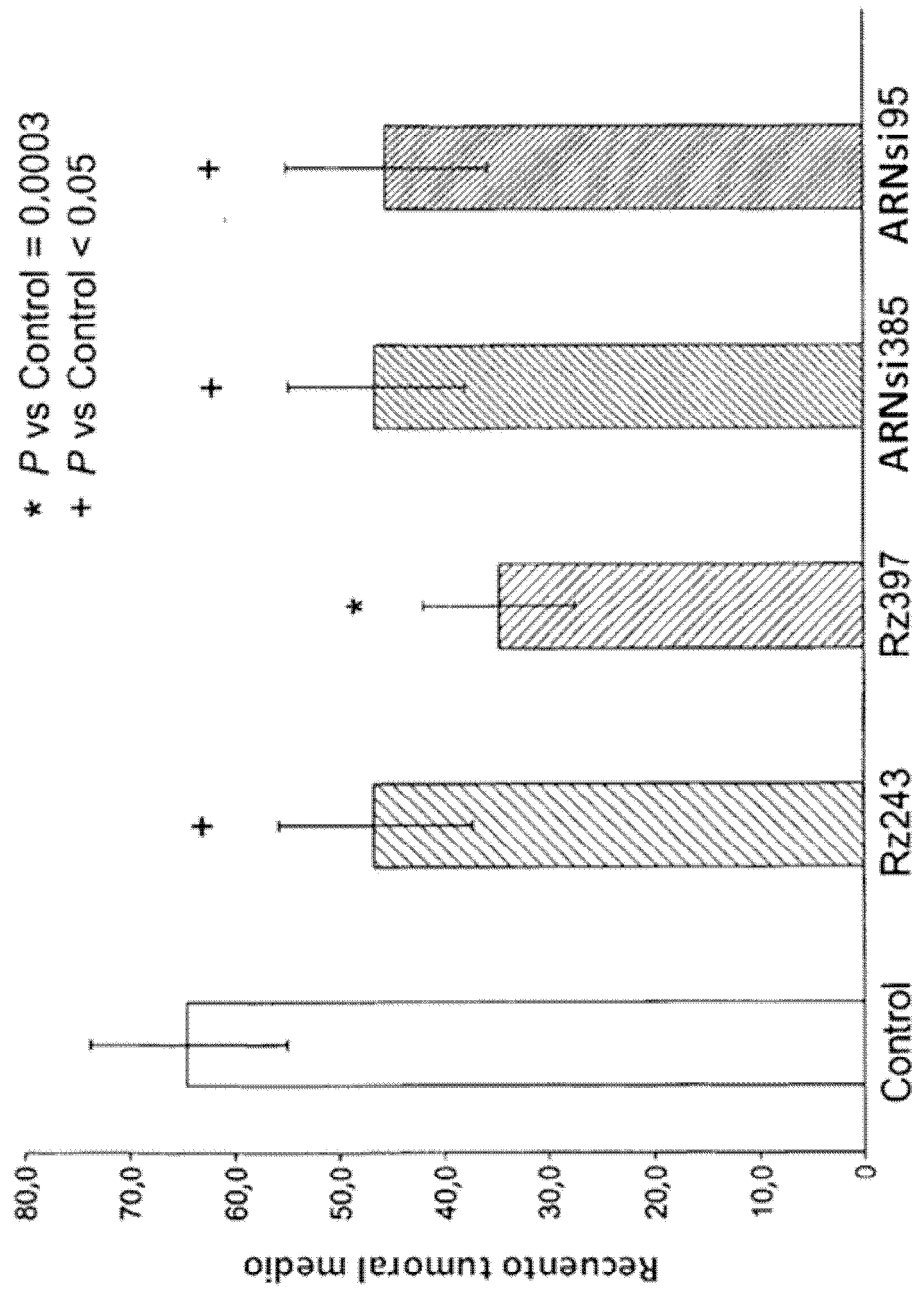


Fig. 4

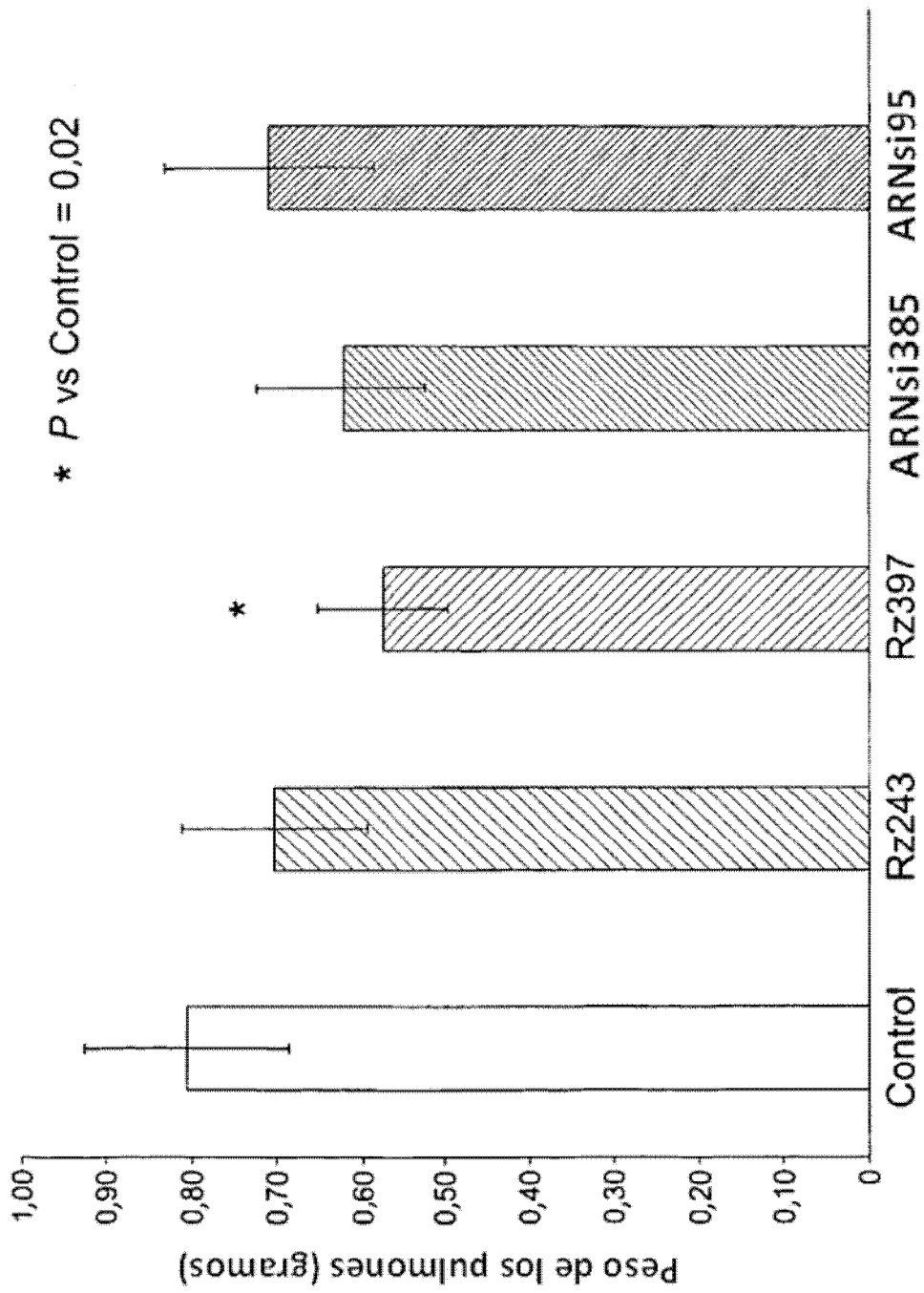


Fig. 5

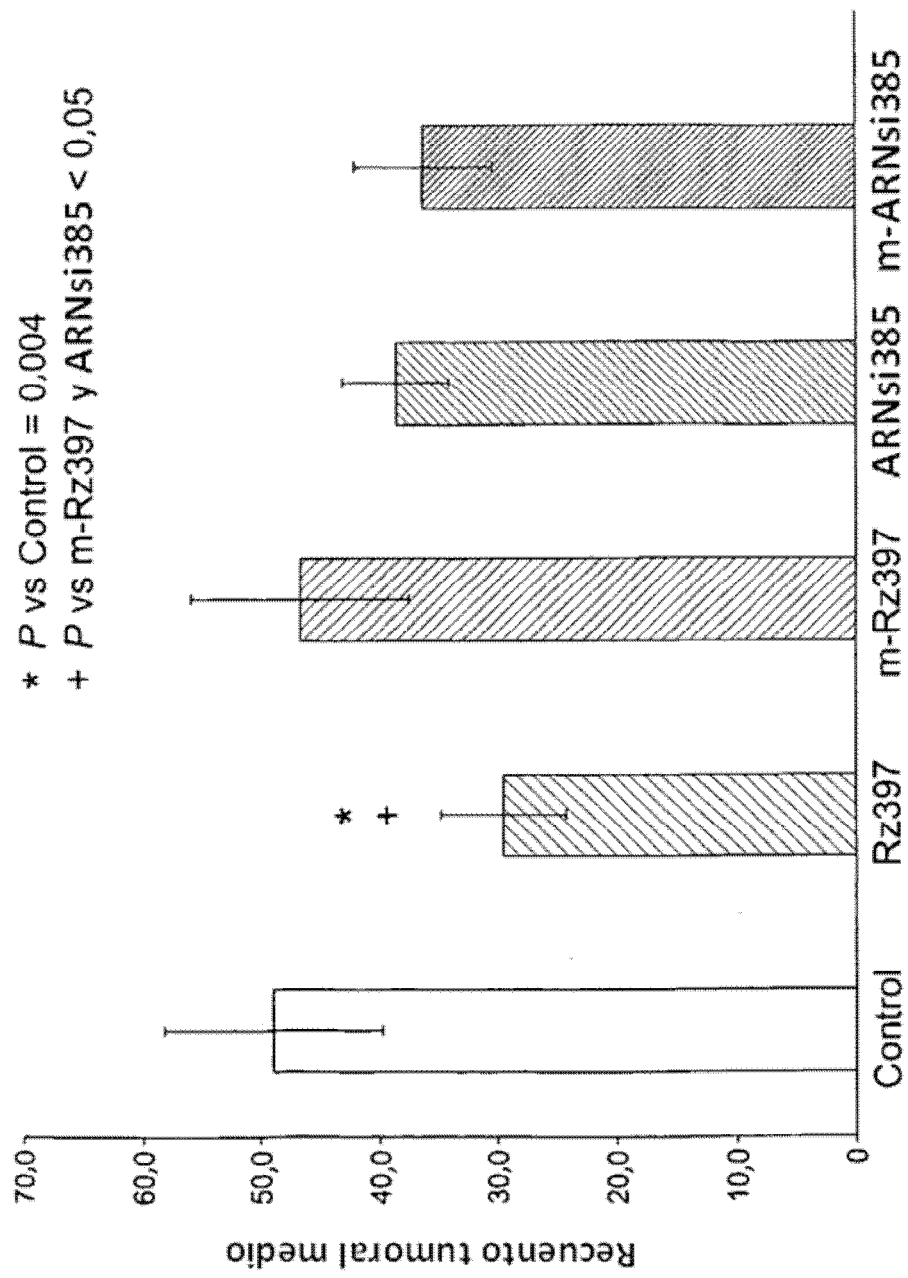


Fig. 6

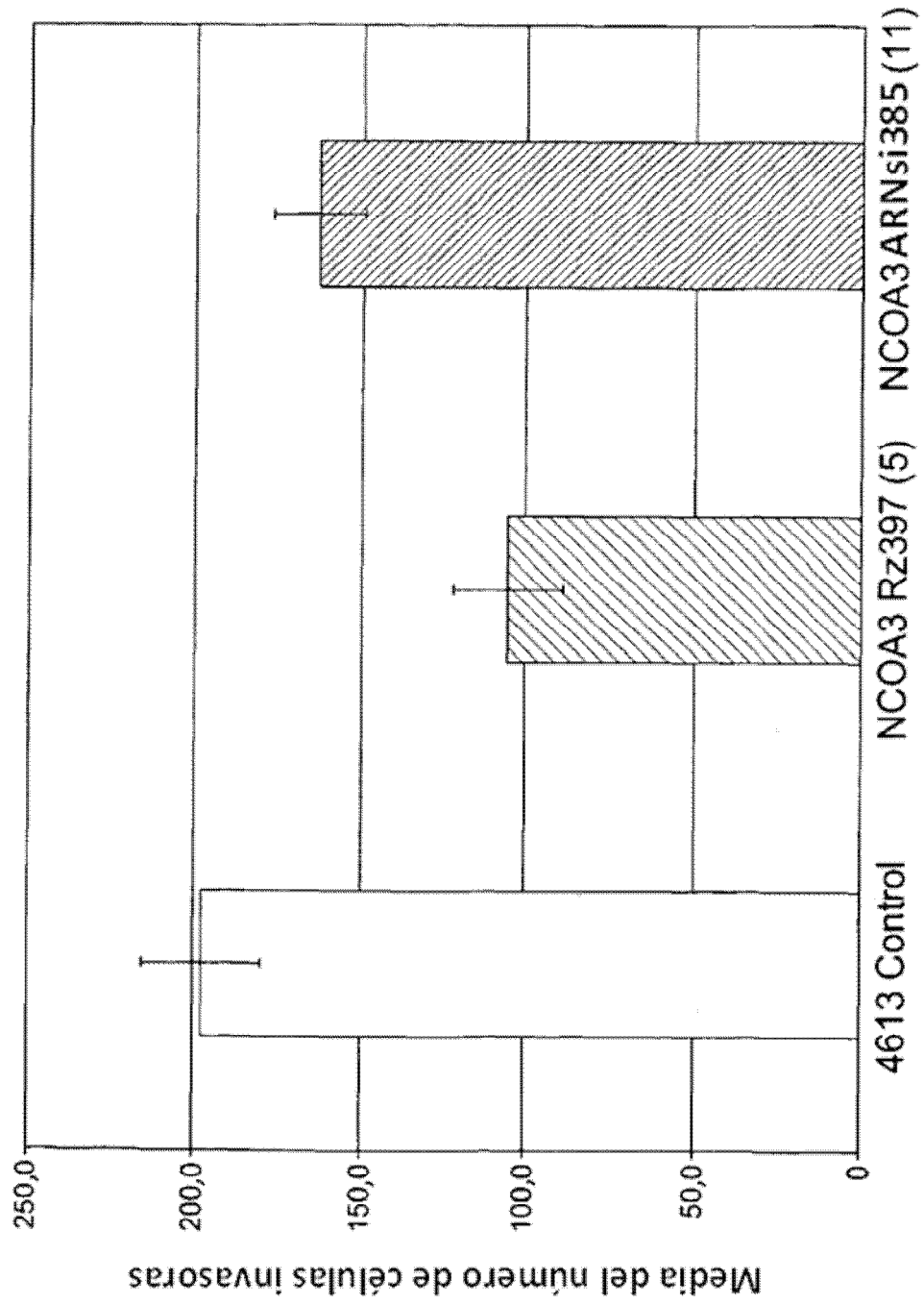


Fig. 7

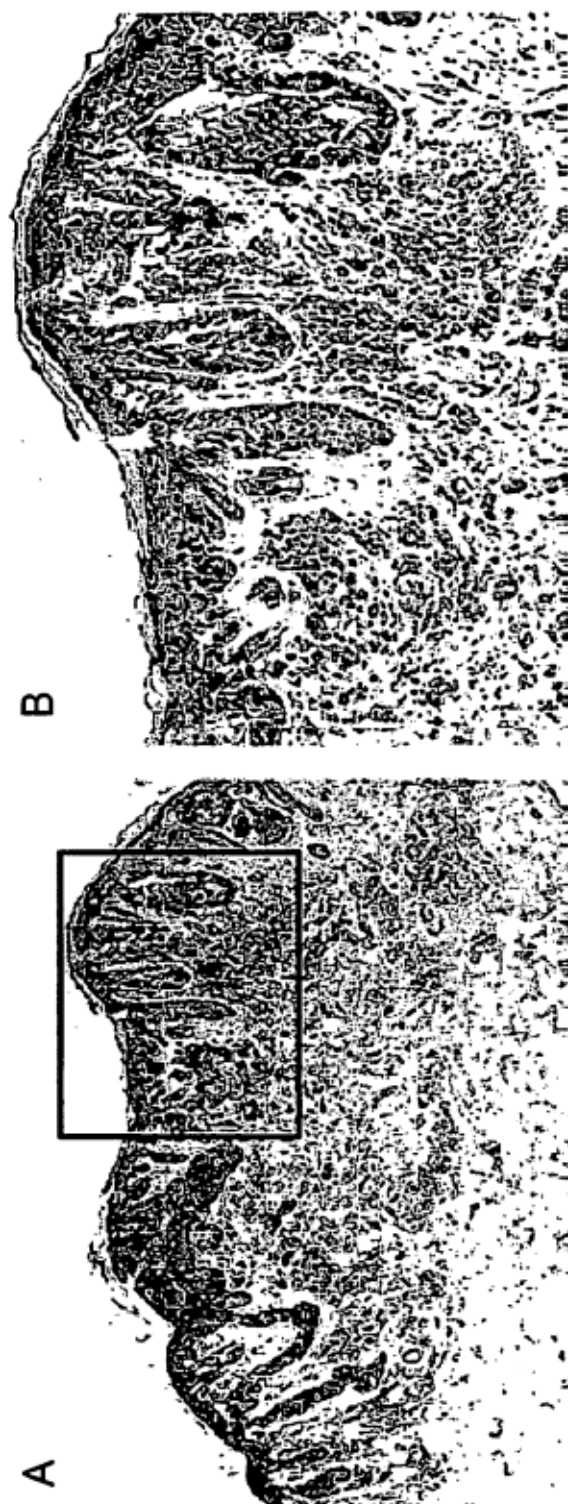


Fig. 8

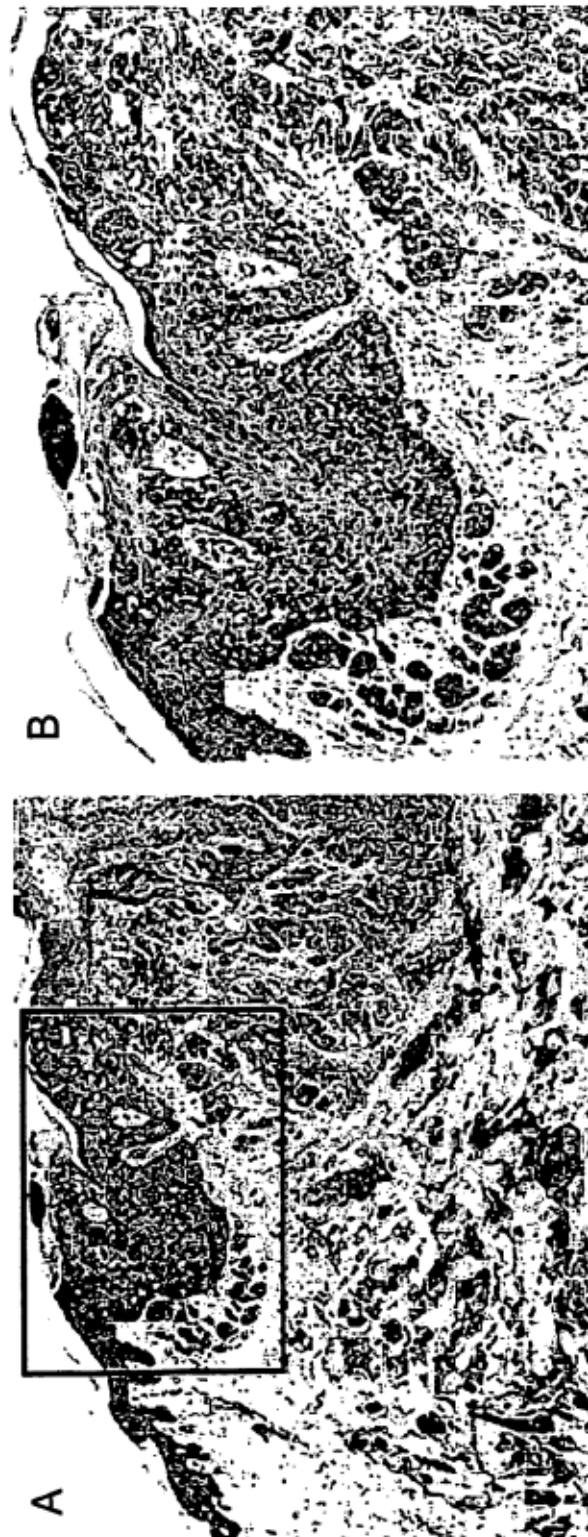


Fig. 9

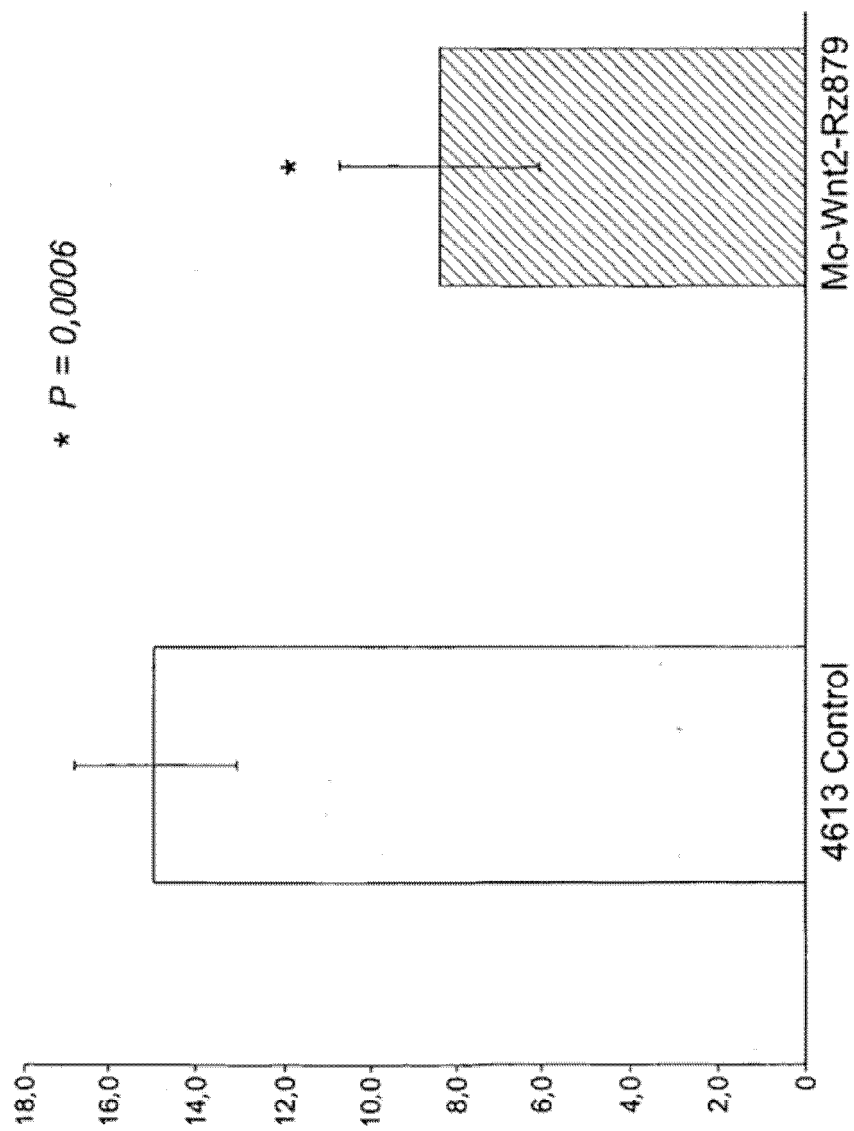


Fig. 10



Fig. 11

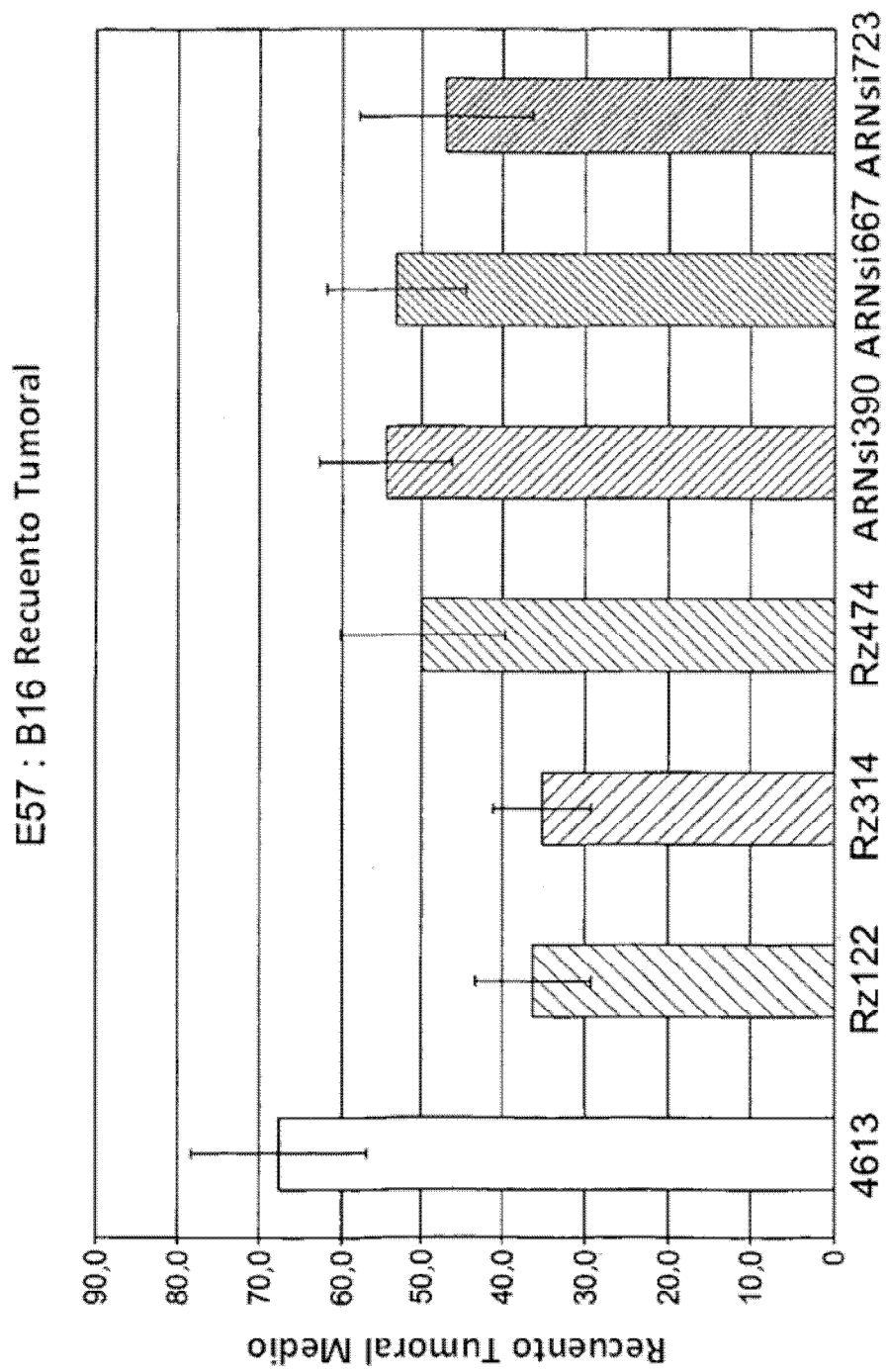


Fig. 12

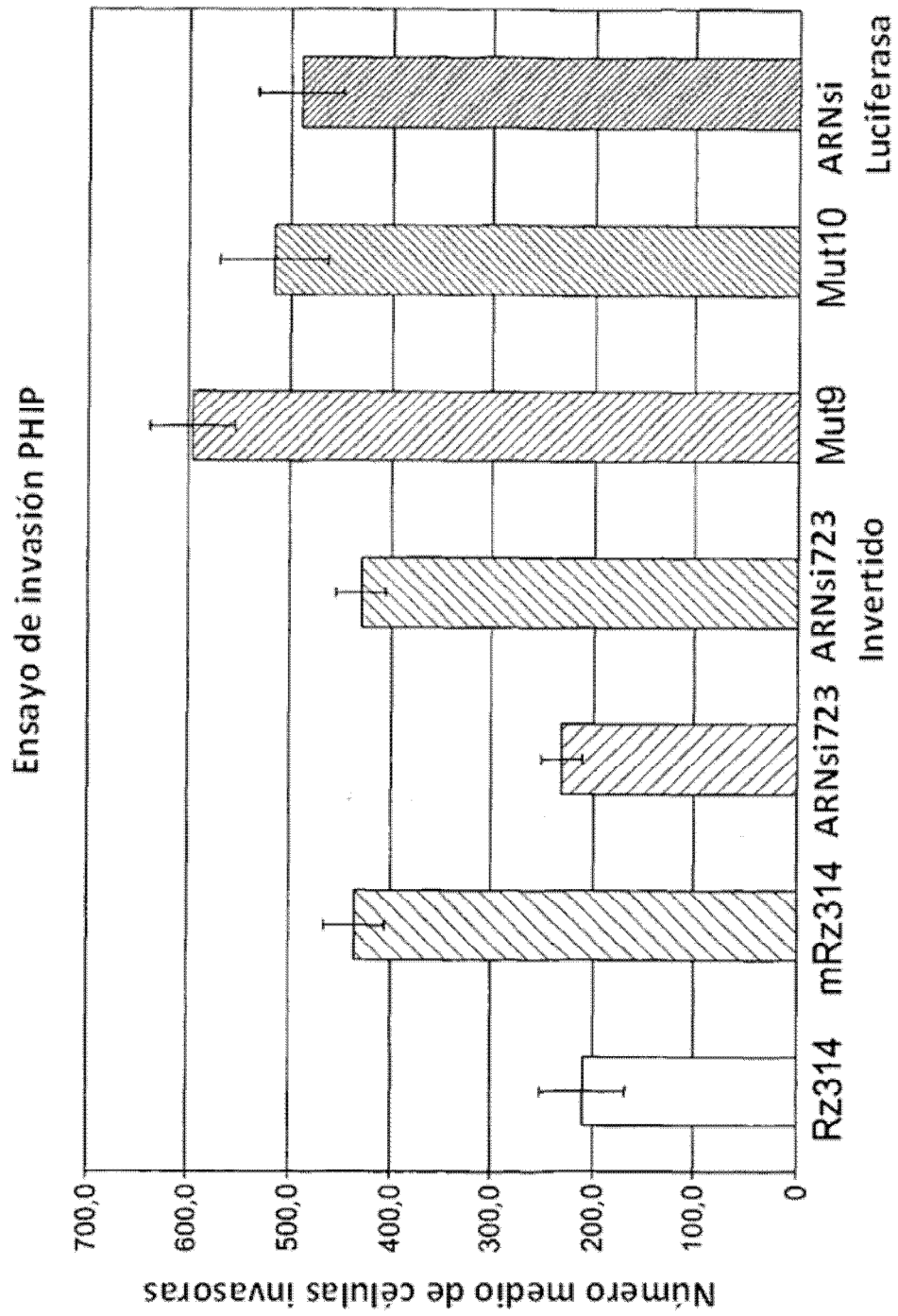


Fig. 13

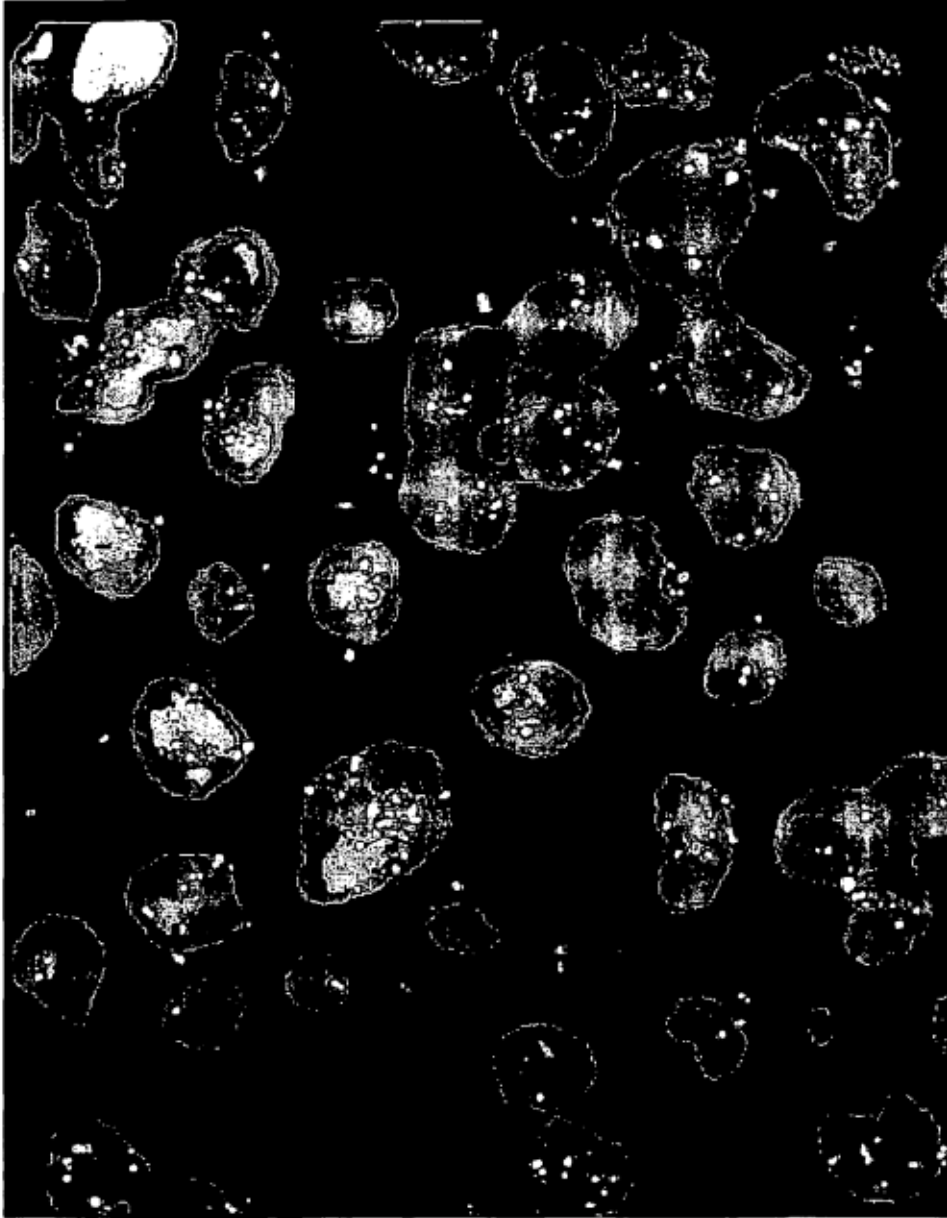


Fig. 14

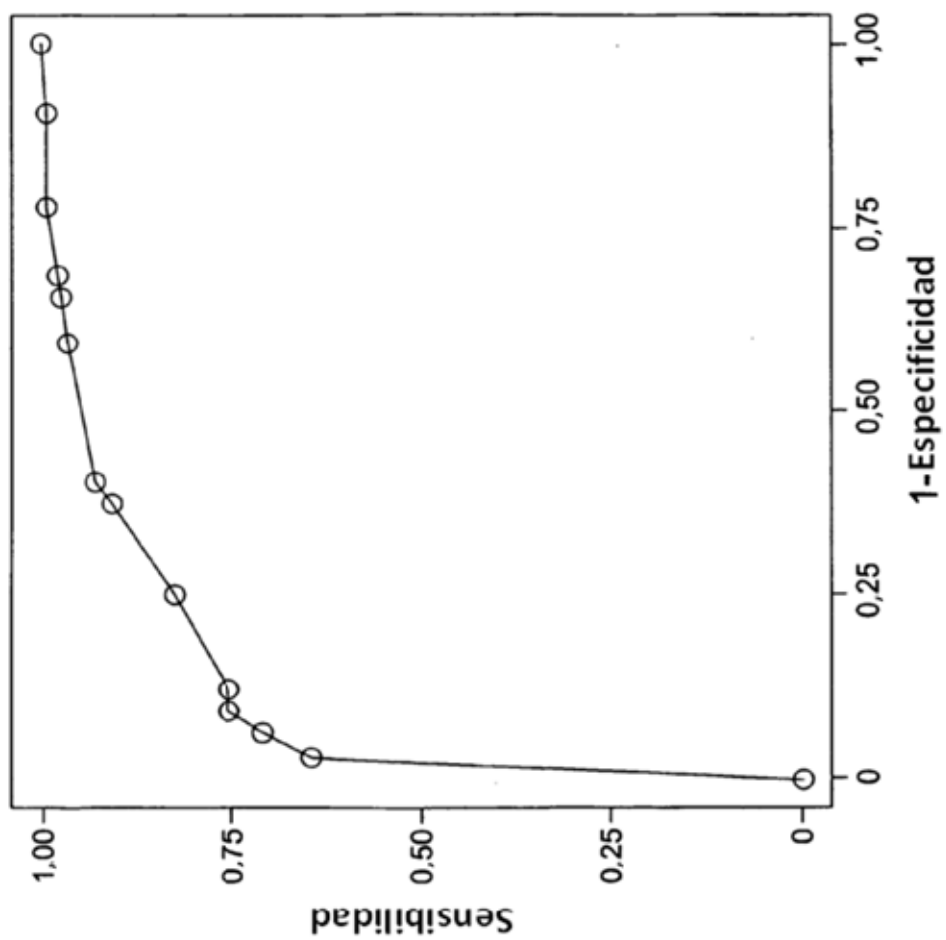


Fig. 15

Fig. 16 hoja 1

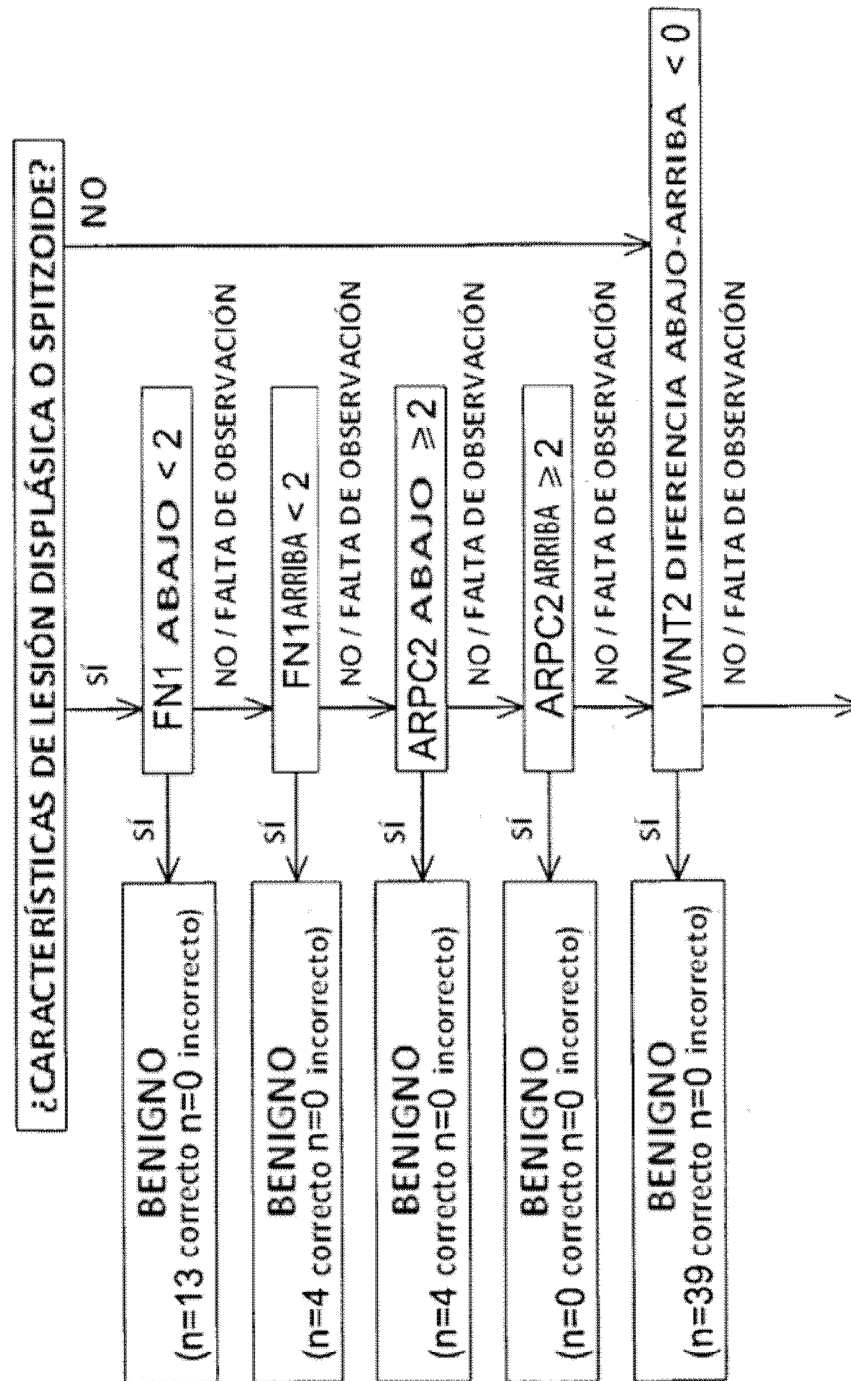


Fig. 16 hoja 2

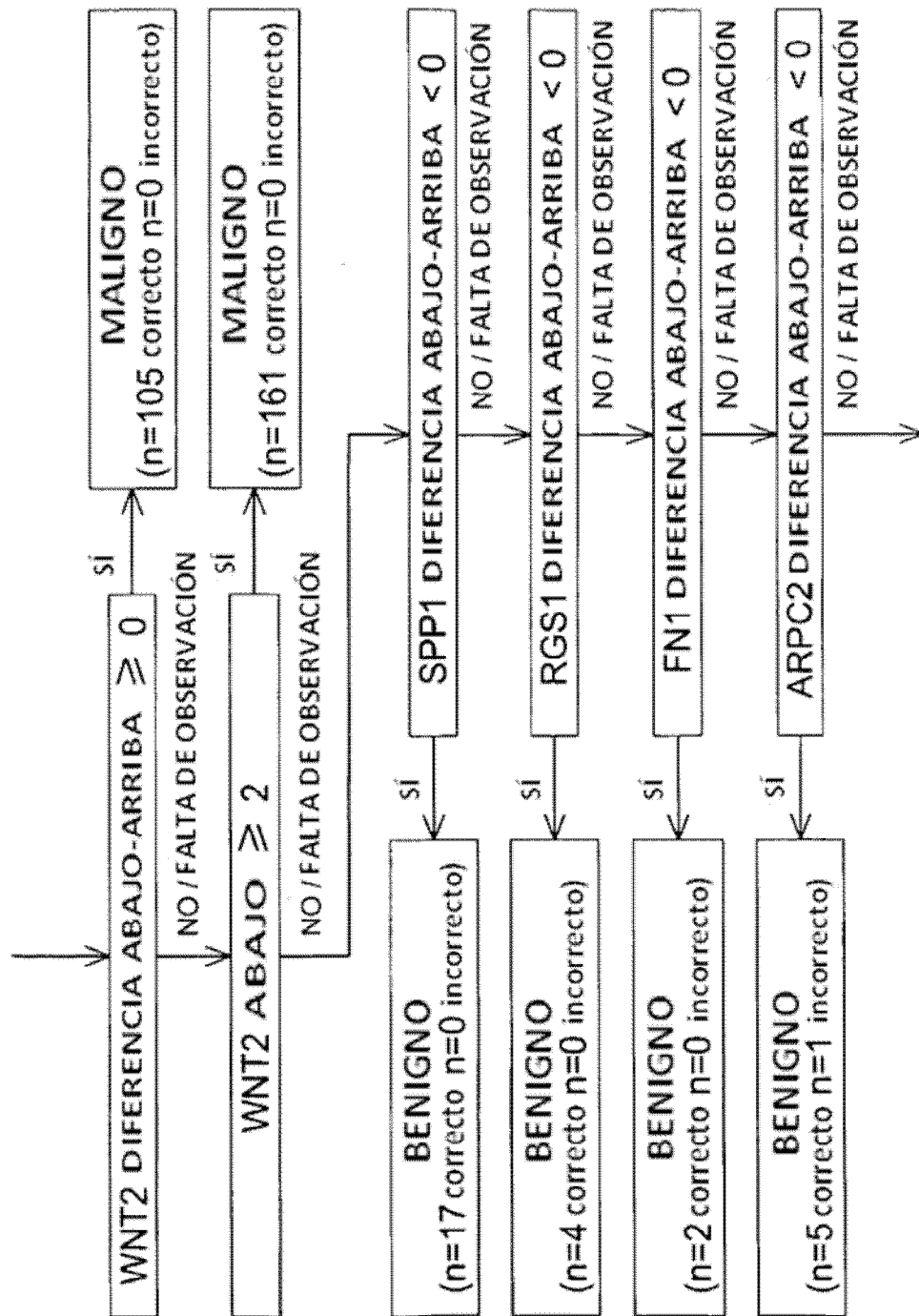


Fig. 16 hoja 3

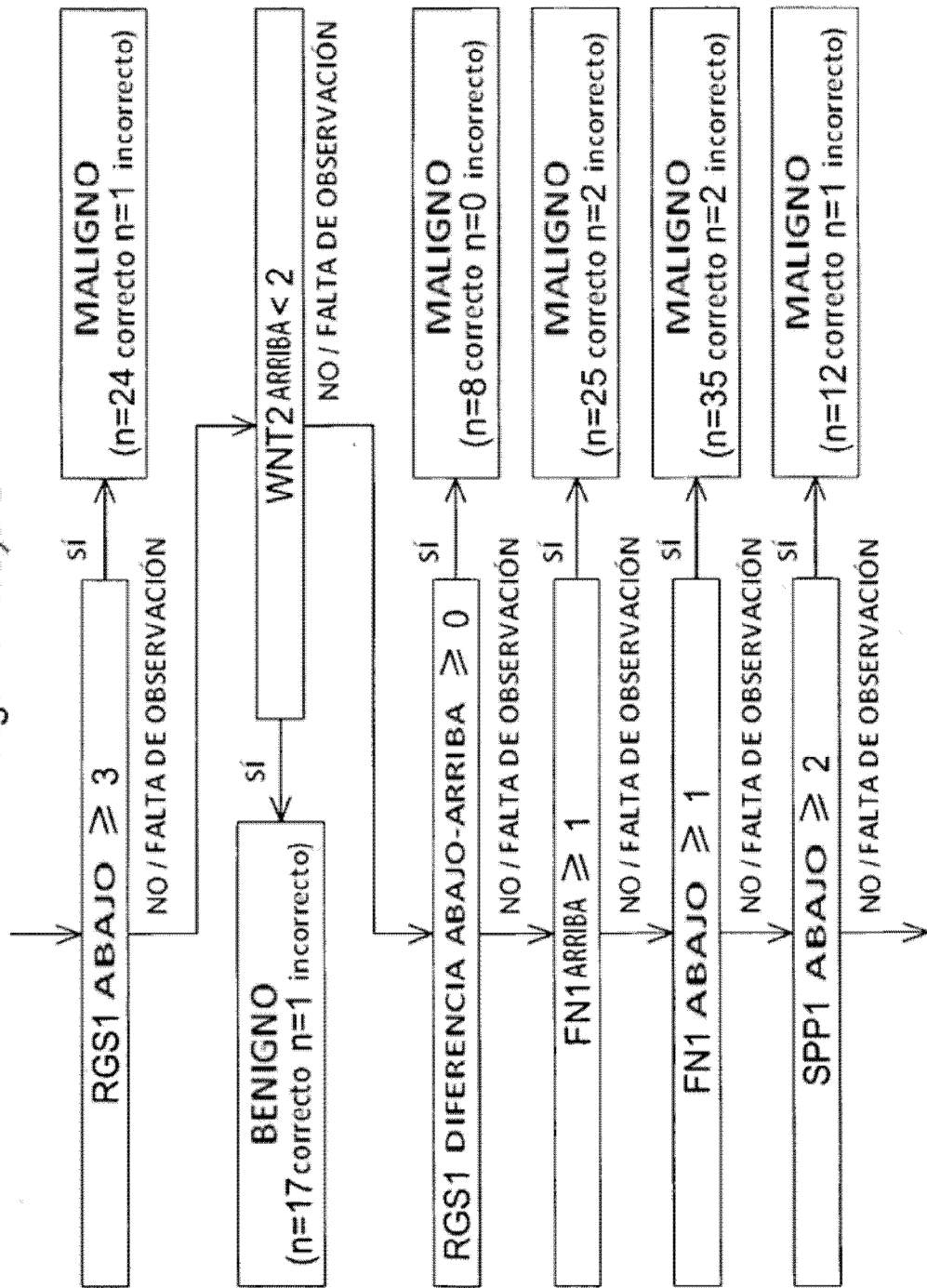


Fig. 16 hoja 4

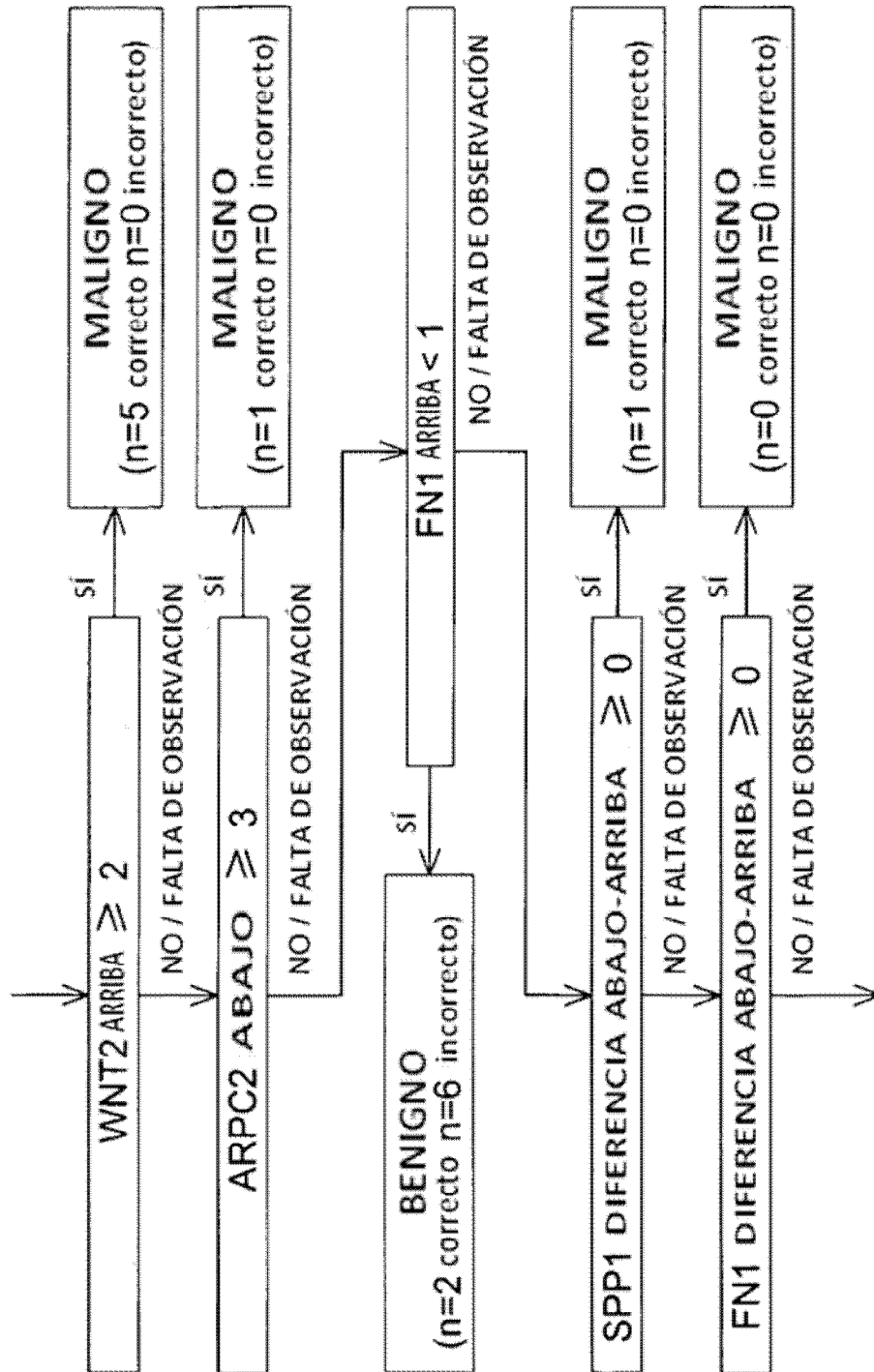


Fig. 16 hoja 5

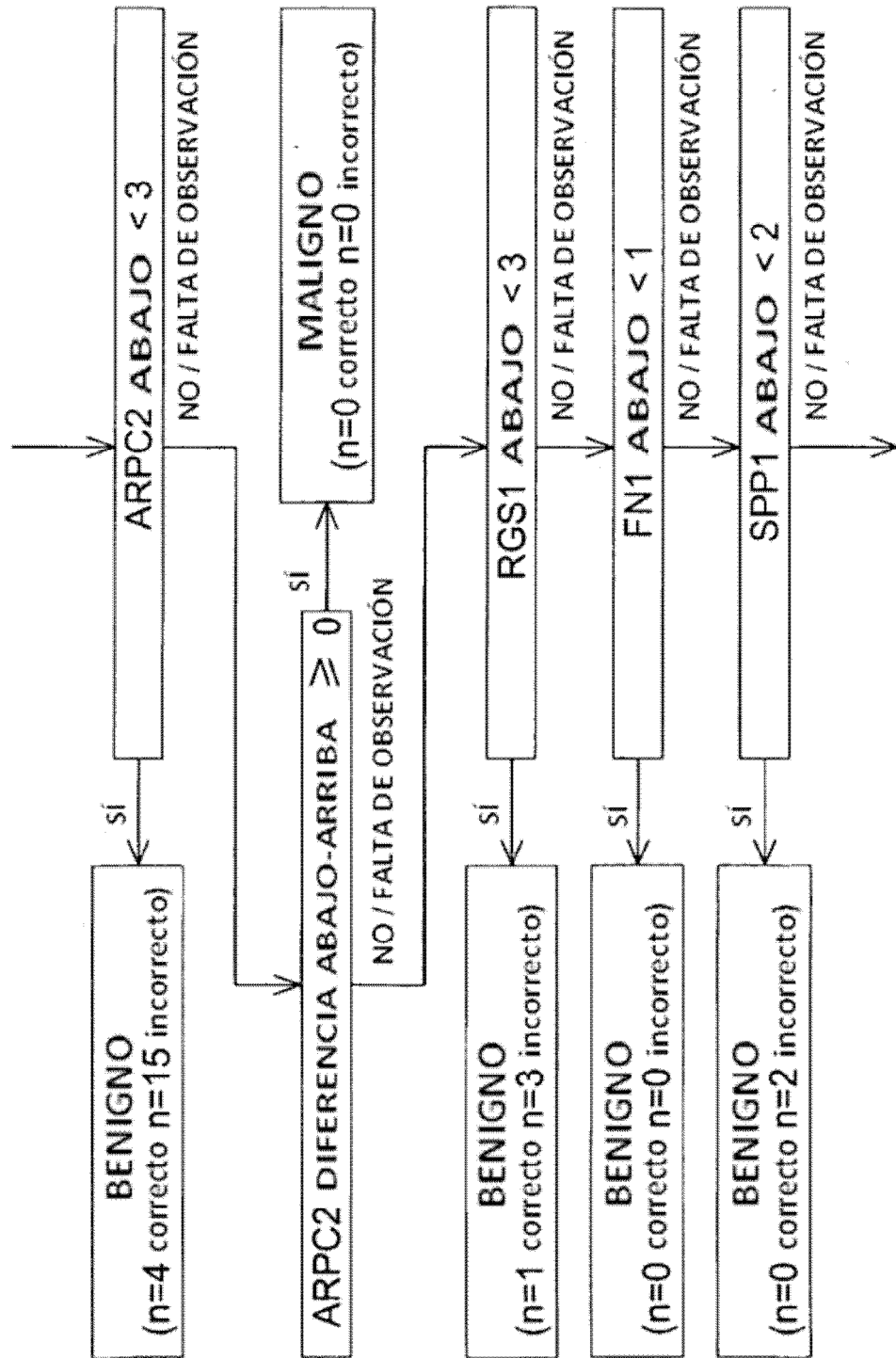
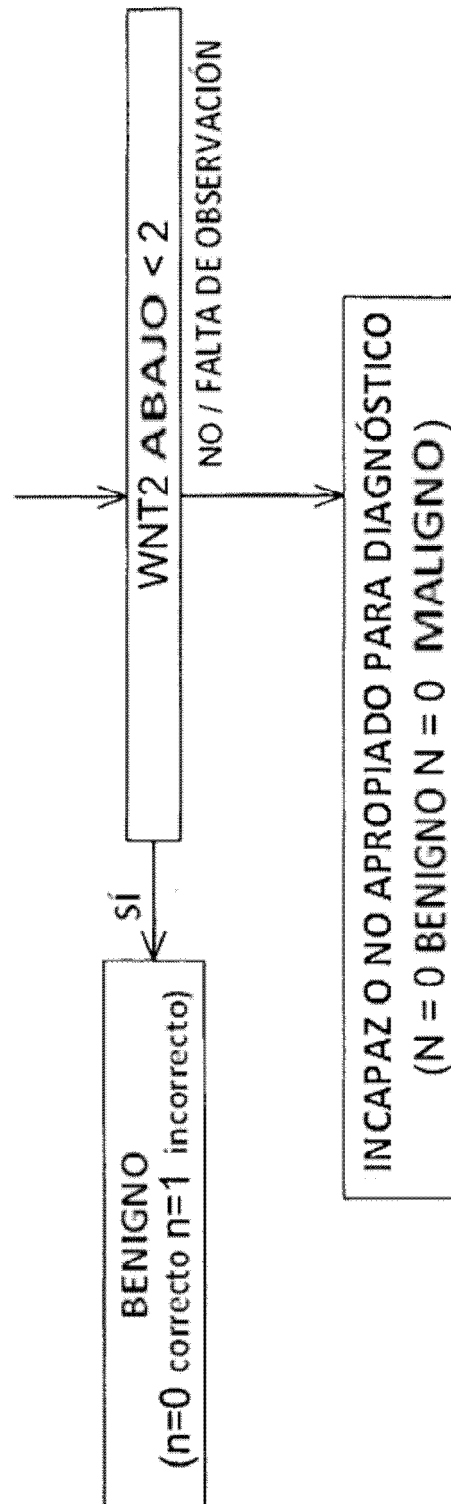


Fig. 16 hoja 6



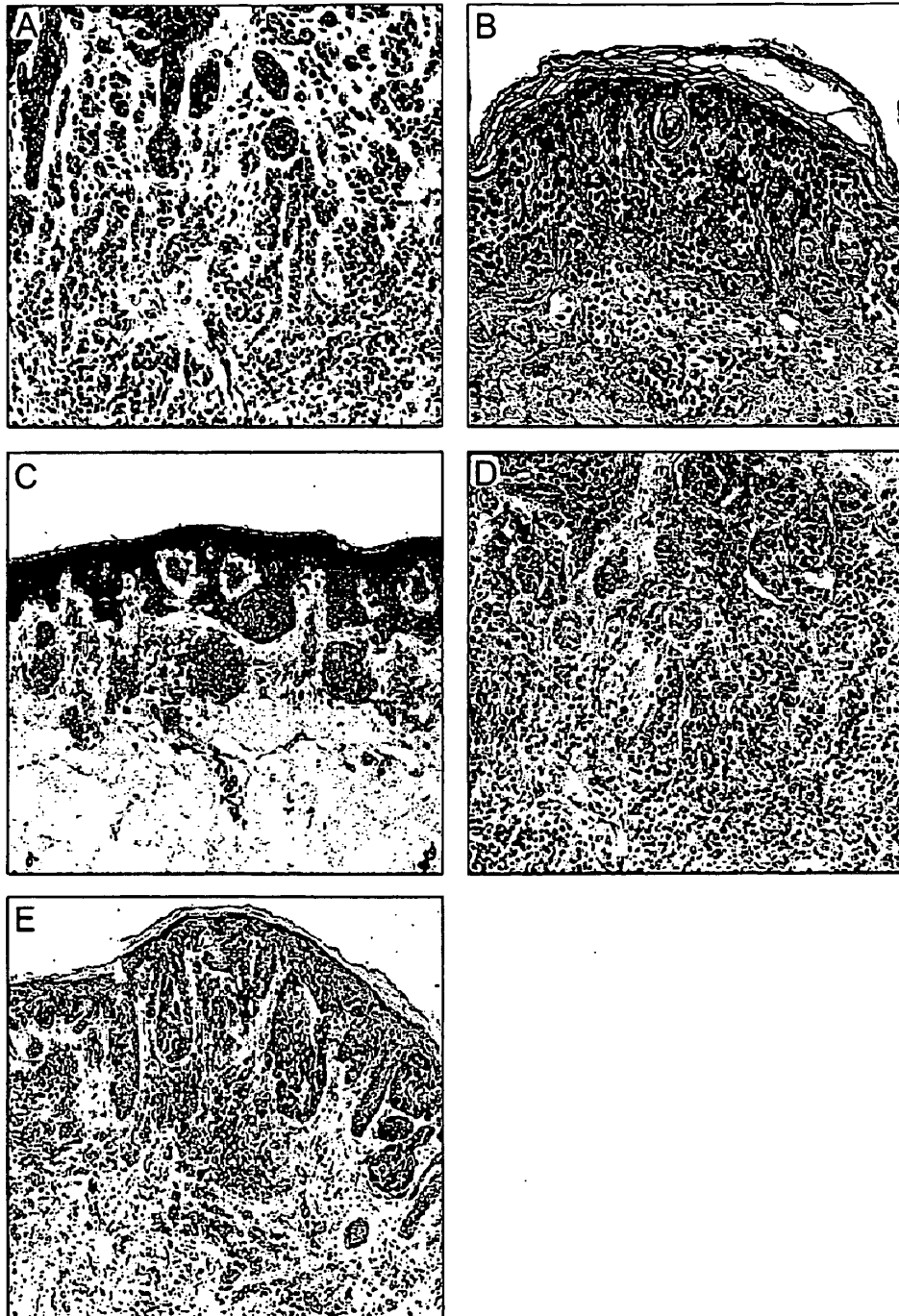


Fig. 17

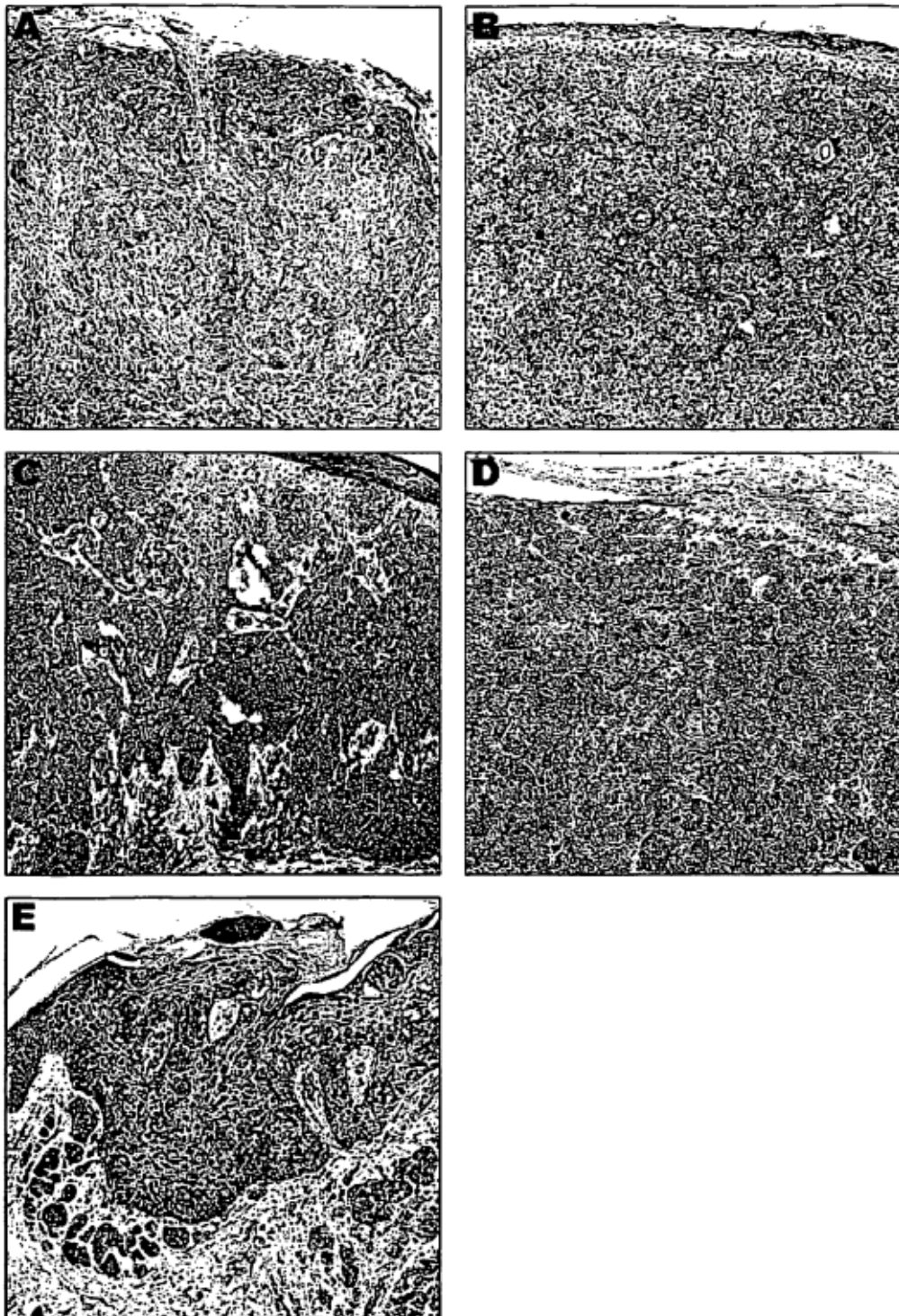


Fig. 18

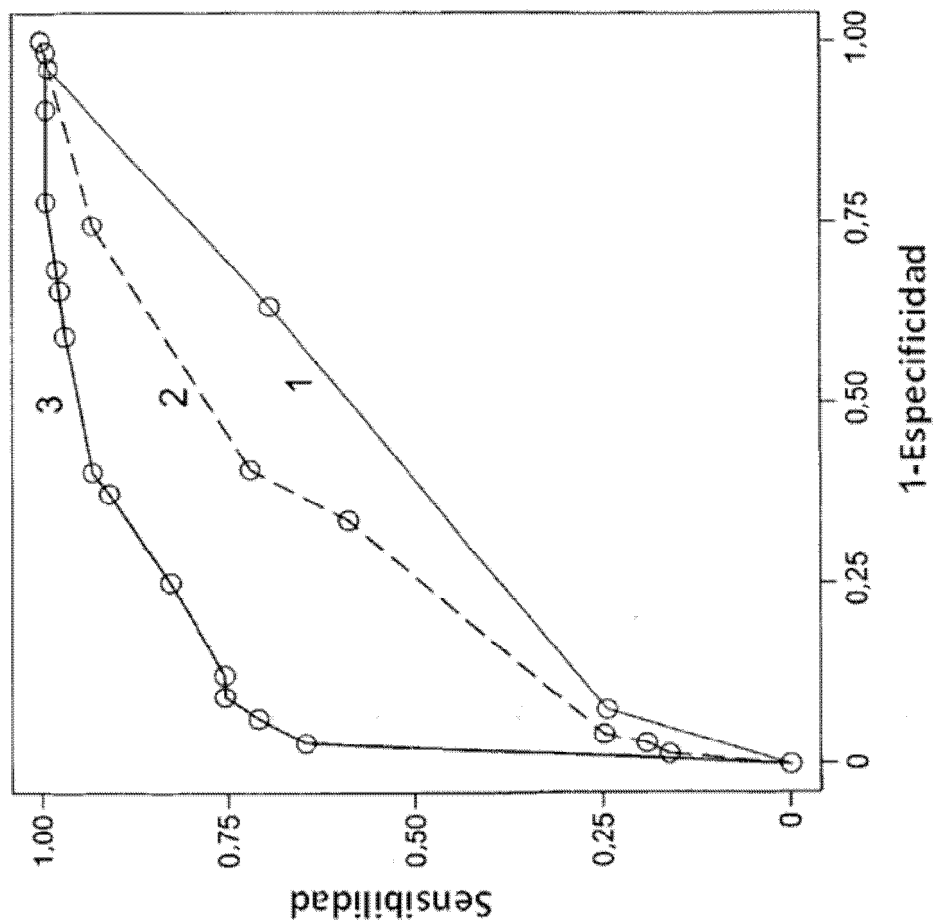


Fig. 19

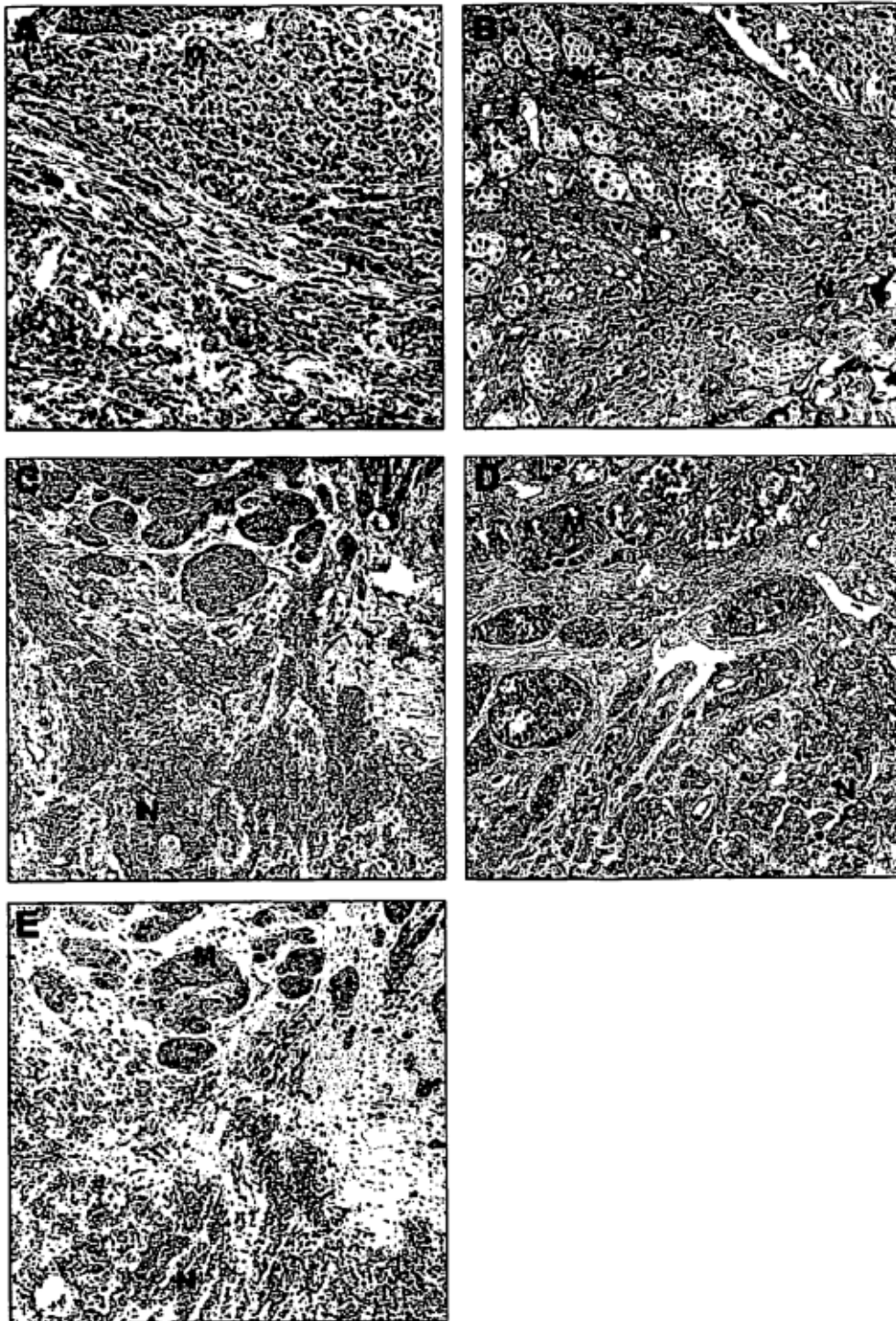


Fig. 20

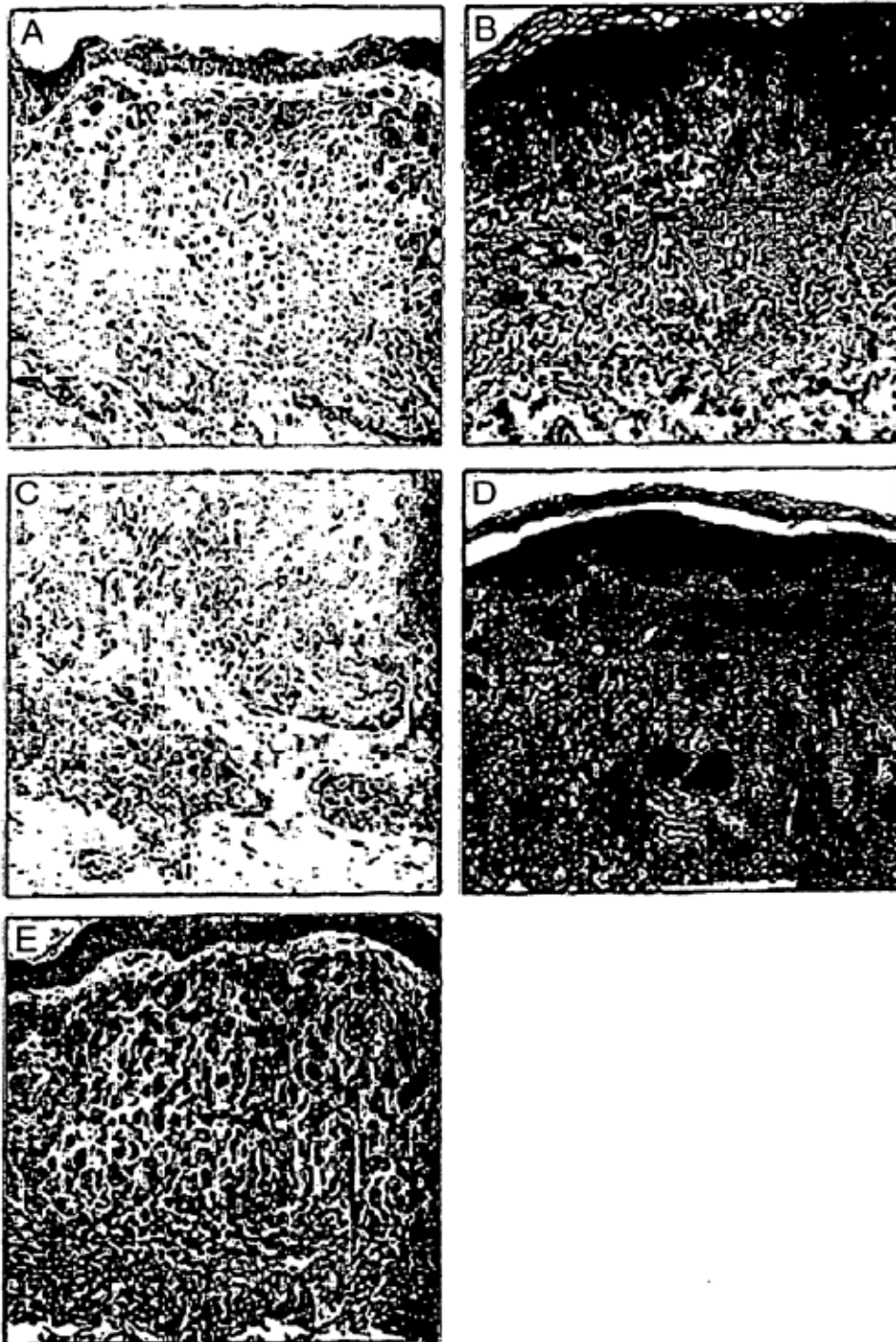


Fig. 21