

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 947 946**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2014** **E 18187484 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2023** **EP 3425061**

54 Título: **Métodos para predecir el riesgo de metástasis en melanoma cutáneo**

30 Prioridad:

14.03.2013 US 201361783755 P

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

24.08.2023

73 Titular/es:

CASTLE BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
2014 San Miguel Drive
Friendswood, TX 77546, US

72 Inventor/es:

COOK, ROBERT WILLIS;
MAETZOLD, DEREK y
OESCHLAGER, KRISTEN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 947 946 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

Métodos para predecir el riesgo de metástasis en melanoma cutáneo

5 Antecedentes de la invención

El melanoma cutáneo (CM) es una forma agresiva de cáncer que se presentó en más de 76 000 casos diagnosticados en el año 2012.¹ Los tumores de CM se desarrollan a través de una serie de etapas discretas durante la progresión a partir de un nevo melanocítico benigno a un tumor metastásico maligno. Generalmente, los nevos benignos se presentan como lesiones pigmentadas, delgadas. Después de la adquisición de mutaciones genéticas claves y el inicio de modificaciones de la citoarquitectura que conducen a una invasión poco profunda de la piel, las lesiones comienzan a crecer radialmente, un proceso referido como la fase de crecimiento radial. Tras escapar del control de crecimiento mediado por los queratinocitos adyacentes, se produce una invasión estromal a regiones más profundas de la dermis, lo que marca la progresión a la fase de crecimiento vertical. Se considera que la fase de crecimiento vertical, junto con las alteraciones genéticas que acompañan este proceso, es el escalón crítico en el desarrollo de melanoma metastásico.

Como es común en muchos otros cánceres, si el CM se detecta en las etapas tempranas de la progresión del tumor y se trata adecuadamente, entonces para la mayoría de los pacientes es probable una alta supervivencia general y libre de metástasis a largo plazo después del diagnóstico.^{2,3} Por ejemplo, los sujetos diagnosticados con tumores de CM, de bajo riesgo, en etapa I tienen una tasa de supervivencia general en 5 años de 91-97 %.³ Una serie de factores histológicos se usan para determinar la etapa del CM y se asocian con el pronóstico. Estos factores incluyen espesor de Breslow, índice mitótico, ulceración, y dispersión de la enfermedad desde el tumor primario a los nódulos linfáticos centinelas y/o regionales.³⁻⁷ La etapa del tumor se determina con base en estos parámetros histopatológicos mediante el uso del bien conocido sistema TNM (T = tumor primario, N = nódulos linfáticos regionales, M = metástasis distantes) que define las etapas 0-IV.³ El sistema TNM para la determinación de etapas es altamente preciso para la supervivencia libre de metástasis para la etapa 0, melanomas *in situ*, que no invaden la capa dérmica (supervivencia en 5 años de 99 %), y melanomas en etapa IV (supervivencia en 5 años <10 %), en los que se detectaron metástasis distantes en el momento del diagnóstico primario. Las metástasis y supervivencia a corto plazo se han documentado para sujetos con enfermedad en etapa I, donde el 5-10 % de los tumores en etapa I informan actividad metastásica a pesar de una intervención quirúrgica con éxito (amplia extirpación local con márgenes claros adecuados). Por tanto, aunque la mayoría de los pacientes con una enfermedad en etapa clínica I tienen una baja probabilidad de una enfermedad con riesgo de metástasis algunos pacientes desarrollarán enfermedad metastásica.

El pronóstico para los casos en etapa clínica II y etapa III tiene poca precisión ya que existe una gran variación dentro de cada etapa y una superposición más grande entre las etapas en las tasas de supervivencia en 5 años. Con el sistema actual para la determinación de etapas, la tasa de supervivencia en 5 años para los sujetos en etapa clínica II es de 53-82 %, mientras que la tasa de supervivencia en 5 años con etapa III es de 22-68 %.^{3,8} El sello distintivo entre los tumores en etapa clínica II y etapa III, y los tumores en etapa I y etapa III, es la presencia de metástasis localizadas de células de CM en el nódulo linfático centinela (SLN) después de un procedimiento de biopsia SLN. Los pacientes con un SLN positivo se encuentran clínicamente en etapa III. Sin embargo, altas tasas de falsos negativos y recurrencia de la enfermedad se asocian con el análisis histológico de SLN como se evidencia por los amplios intervalos de supervivencia libre de metástasis y supervivencia general en pacientes en etapa II y III. Se han desarrollado técnicas inmunohistoquímicas y de amplificación genética diseñadas para mejorar los métodos comunes de tinción con hematoxilina y eosina para la detección de una enfermedad regional, pero solo proporcionan mejoras marginales^{9,10}. Se han identificado biomarcadores en el tejido de SLN, y se han analizado para mejorar la capacidad de reconocer células de CM en los SLN, sin embargo, estos métodos han demostrado una mejora limitada en la precisión y están conformados por un muestreo tisular extenso de una biopsia invasiva del nódulo linfático y no se han adoptado para el uso clínico.^{6,11} Además, los melanomas pueden entrar a la sangre directamente mediante intravasación en los capilares venosos. Por lo tanto, la baja sensibilidad de la biopsia de SLN puede relacionarse con un evento metastásico hematógeno directo frente a un resultado inexacto de la biopsia de SLN. Independientemente de las deficiencias clínicas observadas para el procedimiento de SLNB, sigue siendo el único y mejor factor pronóstico para predecir el riesgo de metástasis en pacientes con CM, y se incluye en múltiples directrices de asociación para el manejo clínico de la enfermedad de CM.

Un pronóstico inexacto para el riesgo de metástasis tiene grandes efectos en los pacientes que se tratan de acuerdo con un enfoque poblacional en lugar de un enfoque individual o personalizado. Por ejemplo, los pacientes con CM categorizados como etapa III mediante el uso de las técnicas histológicas actuales, pero que tienen un riesgo individual real de metástasis que es bajo (falso positivo), se exponen inapropiadamente a un sobretratamiento que incluye aumento de la vigilancia, cirugía nodal, y quimioterapia.¹² Similarmente, los que son SLN negativos, es decir que no se encontraron células de CM dentro del SLN, permanecen en etapa I o II de la enfermedad pero que realmente tienen un alto riesgo de metástasis (falso negativo), están en riesgo de subtratamiento. Además, la biopsia de SLN es una intervención que típicamente se realiza con anestesia general, expone a los pacientes a complicaciones clínicas significativas, y tiene una baja tasa de positividad. Por ejemplo, las directrices de la Red Nacional Integral contra el Cáncer (National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines®) actualmente recomiendan que los pacientes con CM diagnosticados en etapa 1b (espesor de Breslow $\geq 0,75$ mm, pero $<1,00$ mm o presencia de ≥ 1 mitosis en

cualquier espesor de Breslow) se sometan a una biopsia de SLN aún con solo 5 % de positividad en el rendimiento de SLN. Esto significa que de 20 pacientes con melanomas en etapa 1b que se someten a una biopsia de SLN, 19 serán negativos y se expondrán a una complicación quirúrgica de biopsia de SLN.¹² Similarmente, se recomienda que todos los pacientes en etapa II patológica (espesor de Breslow >1,0 mm) se sometan a una biopsia de SLN aunque solo el 18 % tendrá un SLN positivo.^{12,13} Además, una biopsia de SLN positivo da como resultado recomendaciones para una disección linfática regional completa que expone a los pacientes a complicaciones clínicas significativas, como linfedema, y tiene una baja tasa de positividad.

Para este propósito, se han desarrollado firmas de perfiles de la expresión génica (GEP) y se ha demostrado que algunas tienen poderosas capacidades pronósticas en un grupo de enfermedades malignas¹⁴⁻¹⁸. Una de tales firmas se ha usado para el pronóstico del melanoma uveal, un tumor de origen melanocítico que se desarrolla en el ojo. Similar al melanoma cutáneo, el tratamiento del tumor uveal primario es altamente eficaz. Del dos al cuatro por ciento de los pacientes con melanoma uveal presentan evidencia de metástasis clínica en el momento del diagnóstico, pero hasta un 50 % de los pacientes con melanoma uveal desarrollan metástasis sistémicas dentro de los cinco años después del diagnóstico independientemente del tratamiento del tumor primario del ojo (terapia de radiación o enucleación)¹⁹. Esto significa que un evento micrometastático ha ocurrido en aproximadamente el 50 % de los pacientes con melanoma uveal antes del tratamiento del tumor primario del ojo. Recientemente se ha desarrollado una firma de GEP que puede distinguir con precisión tumores de melanoma uveal que tienen un bajo riesgo de metástasis de aquellos que tienen un alto riesgo^{14,20}. Para evaluar la expresión génica se realiza un análisis de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para quince genes (doce genes discriminantes y tres genes control) que se expresan diferencialmente en los tumores con una conocida actividad metastásica en comparación con tumores sin evidencia de metástasis. La firma génica de melanoma uveal separa los casos en un grupo de bajo riesgo que tiene más del 95 % de supervivencia libre de metástasis en cinco años después del diagnóstico, y un grupo de alto riesgo con menos del 20 % de supervivencia libre de metástasis en el mismo punto de tiempo. La firma se ha validado extensamente en el entorno clínico, y se ha demostrado que proporciona una mejora significativa en la precisión del pronóstico en comparación con la clasificación según los criterios de determinación de etapas TNM^{20,21}.

Mauerer et al., evaluaron las diferencias de expresión génica en los nevos melanocíticos en comparación con el melanoma primario, los nevos melanocíticos en comparación con el melanoma metastático, y el melanoma primario en comparación con el melanoma metastático e identifican que GJA1 está sobreexpresado en pacientes con melanoma²⁵.

Una serie de grupos han publicado análisis genómicos de tumores en melanoma cutáneo²²⁻²⁹. Aunque algunos estudios se han concentrado en las alteraciones genéticas en las células de melanoma maligno en comparación con los melanocitos normales, otros han comparado los nevos benignos con los tumores en las fases de crecimiento radial o vertical, o el tumor primario con tumores metastáticos. En el tiempo en que se diseñaron e implementaron los estudios contenidos dentro de esta patente (2010), no pudieron encontrarse evidencias en la literatura u otras fuentes de dominio público que indicaran que podía desarrollarse una prueba del perfil de expresión génica enfocada solamente en el tumor de melanoma primario para la aplicación clínica de predecir metástasis en pacientes con CM.^{22-24,27-29} Además, todos los estudios utilizaron muestras de CM recién congeladas en lugar de tejido tumoral fijado con formalina y embebido en parafina (FFPE). Todos los estudios relacionados con esta invención solo han usado tejido de tumor primario FFPE.

Resumen de la invención

Existe la necesidad en la técnica de un método más preciso y objetivo de predecir cuáles son los tumores que muestran actividad metastásica agresiva. El desarrollo de una huella molecular precisa, tal como el ensayo de perfiles de expresión génica abarcado por la invención descrita en la presente, mediante el cual el riesgo de metástasis de CM puede evaluarse a partir de tejido de tumor primario sería un avance significativo para el campo. Un pronóstico impreciso del riesgo de metástasis tiene profundos efectos en los pacientes, que incluyen una exposición inadecuada al sobretratamiento que incluye aumento de la vigilancia, cirugía nodal y quimioterapia. Los pacientes con diagnósticos imprecisos también están en riesgo de subtratamiento; es decir, las células cancerosas no se observan en el nódulo linfático centinela, aunque están presentes y pueden haberse dispersado ya a otros nódulos linfáticos regionales u otras partes del cuerpo. Un resultado de biopsia falso negativo le da al paciente y al médico un sentido falso de seguridad sobre el grado del cáncer en el cuerpo del paciente. Además, la biopsia de SLN expone a los pacientes a complicaciones clínicas significativas, como linfedema, y tiene una baja tasa de positividad.

En una realización, la invención como se describe en la presente es un método para predecir el riesgo de metástasis, la supervivencia general, o ambos, en un paciente con un tumor de melanoma cutáneo primario, el método comprende: (a) medir los niveles de expresión génica de al menos ocho genes seleccionados del grupo que consiste en BAP1_varA, BAP1_varB, MGP, SPP1, CXCL14, CLCA2, S100A8, BTG1, SAP130, ARG1, KRT6B, GJA, ID2, EIF1B, S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, y CST6, en una muestra del tumor de melanoma cutáneo primario, en donde los al menos ocho genes son MGP, CXCL14, S100A8, BTG1, ARG1, GJA1, ID2, S100A9, KRT14, ROBO1, TACSTD2, SPRR1B, TRIM29, y TYRP1, en donde medir los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes comprende la medición de un nivel de

fluorescencia mediante un sistema de detección de secuencias después de una RT-PCR de los al menos ocho genes; (b) determinar una firma del perfil de expresión génica del paciente que comprende los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes; (c) comparar la firma del perfil de expresión génica del paciente con un perfil de expresión génica de un conjunto de entrenamiento predictivo; y (d) proporcionar una indicación como un riesgo de metástasis, supervivencia general o ambos para el tumor de melanoma cutáneo primario cuando el perfil de expresión génica del paciente indica que los niveles de expresión de al menos los ocho genes están alterados de una manera predictiva en comparación con el perfil de expresión génica del conjunto de entrenamiento predictivo.

Esta descripción proporciona un método más objetivo que predice con mayor precisión cuáles tumores de melanoma muestran actividad metastásica agresiva y dan como resultado una disminución en la supervivencia general del paciente. El desarrollo de una huella molecular precisa, tal como el ensayo del perfil de expresión génica abarcado por la invención descrita en la presente, mediante el cual el riesgo de metástasis de CM y la supervivencia general del paciente puede evaluarse a partir de un tejido de tumor primario sería un avance significativo para el campo, que conduciría a una disminución de la pérdida de vida, menos sufrimiento del paciente, tratamientos más eficaces y el uso de recursos.

Realizaciones específicas de la invención se describen en las reivindicaciones adjuntas y serán evidentes a partir de la siguiente descripción más detallada de determinadas realizaciones y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 representa un análisis estadístico y gráficos que ilustran un análisis de Kaplan-Meier (K-M) de la supervivencia libre de metástasis (MFS) para los casos de CM con predicción de bajo riesgo (clase 1) o de alto riesgo (clase 2) de metástasis de acuerdo con un algoritmo de modelación en máquina con base radial (RBM). La MFS en 5 años para el conjunto de entrenamiento de 164 muestras (**A**) es de 91 % para los casos de clase 1 y 25 % para los casos de clase 2 ($p < 0,0001$). La MFS en 5 años para el conjunto de validación independiente de 104 muestras (**B**) es de 97 % para la clase 1 en comparación con 31 % para la clase 2 ($p < 0,0001$). La precisión del modelo del conjunto de entrenamiento, según se mide mediante ROC, es de 0,9052, en comparación con 0,9089 para la cohorte de validación, cada uno de los cuales refleja modelos valiosos clínicamente.

La Figura 2 representa análisis estadísticos y de K-M del conjunto de entrenamiento de 164 muestras cuando la metástasis se predice mediante el uso de los algoritmos de modelación de árbol de partición (**A**), vecino K más cercano (**B**), regresión logística (**C**), o análisis discriminante (**D**). Las diferencias altamente significativas en las curvas de MFS de K-M para las cohortes de clase 1 y clase 2 se observan con cada método de modelación. La precisión es la mayor cuando el análisis se realiza con el modelo de árbol de partición (ROC=0,9177; precisión = 87 %; sensibilidad = 94 %), aunque los otros modelos también son estadísticamente precisos, con ROC > 0,8.

La Figura 3 representa los mismos parámetros estadísticos y gráficos que en la Figura 2, pero donde los análisis de árbol de partición (**A**), vecino K más cercano (**B**), regresión logística (**C**) o análisis discriminante (**D**) se usaron para analizar el conjunto de validación independiente de 104 muestras. Las diferencias significativas entre las curvas de K-M de la clase 1 y la clase 2 se observan mediante el uso de cada método de modelación. La precisión del algoritmo es la más alta para los modelos de regresión logística y análisis discriminante (ROC=0,8969), y la misma fue verdadera para la sensibilidad, o la precisión para predecir los casos de alto riesgo de clase 2 (sensibilidad = 91 %).

La Figura 4 representa los parámetros estadísticos y el análisis de K-M que reflejan el impacto de melanomas en etapa 0 *in situ* sobre la potencia predictiva del conjunto de entrenamiento. La eliminación de los casos de etapa 0 de las cohortes originales de entrenamiento y validación produce un conjunto de entrenamiento de 149 muestras (**A**) y un conjunto de validación independiente de 104 muestras (**C**). Se observan diferencias significativas en las curvas de K-M para la clase 1 y la clase 2 para ambas cohortes ($p < 0,0001$), y la predicción del riesgo de metástasis es precisa en ambos conjuntos de entrenamiento y validación (ROC=0,9177 y 0,9014, respectivamente). El análisis también se realizó después de la inclusión de todas las muestras de etapa 0 en el conjunto de entrenamiento, lo que produjo una cohorte de entrenamiento de 164 muestras (**B**) que mostró una precisión comparable (ROC=0,9052; precisión=83 %; sensibilidad=85 %) en comparación con el conjunto de entrenamiento de 149 muestras. No se observan grandes diferencias cuando el conjunto de validación independiente de 104 muestras se entrena con el uso de la cohorte de 164 muestras (**D**) en comparación con (**C**).

La Figura 5 representa los parámetros estadísticos y de precisión de MFS de la firma genética cuando se usa para predecir el riesgo de metástasis en tumores de CM con dispersión superficial (**A**) o de tipo nodular (**B**). La MFS por K-M fue de 100 % para los casos de dispersión superficial predichos como clase 1, y solo de 5 % para los casos predichos como clase 2 ($p < 0,0001$). El modelo predictivo tuvo una precisión de 100 % para predecir ambas clases, y ROC=1,00. La predicción del riesgo para tumores nodulares fue menos precisa, con una ROC = 0,9323, precisión de 82 %, y sensibilidad de 81 %, pero el análisis de K-M refleja una diferencia significativa entre la MFS en 5 años de 81 % para la clase 1 y la MFS de 7 % para los casos de clase 2 ($p < 0,0001$).

La Figura 6 representa gráficos de MFS y el análisis estadístico después de una predicción trimodal para los casos de CM en bajo riesgo (clase A), riesgo intermedio (clase B) o alto riesgo (clase C) de metástasis de acuerdo con un

algoritmo de modelación de máquina con base radial (RBM). La MFS en 5 años para el conjunto de validación independiente de 104 muestras es de 98 % para la clase A en comparación con 79 % para la clase B y 30 % para la clase C ($p < 0,0001$), con una tasa de 64 % en la cohorte en general, lo que refleja modelos valiosos clínicamente.

La Figura 7 representa la MFS para la cohorte de validación de 104 muestras basada en la puntuación de probabilidad generada para cada caso durante el análisis de modelación predictiva. Los subgrupos A-J representan aumentos crecientes en 0,1 unidades en la probabilidad de metástasis (0=bajo riesgo de metástasis, 1= alto riesgo de metástasis), según se determina mediante el algoritmo de RBM. Es importante señalar que los aumentos en la puntuación de probabilidad corresponden a disminuciones en las tasas de MFS. Por ejemplo, todos los casos en el subgrupo A tienen una puntuación de probabilidad entre 0 y 0,099, y tienen 100 % de MFS en 5 años en la cohorte. Por el contrario, cada uno de los casos en el subgrupo J tiene una puntuación de probabilidad entre 0,9 y 1,0, y ninguno de esos casos está libre de metástasis a los 5 años. Se observan diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos ($p < 0,0001$), y la MFS en 5 años se muestra en la leyenda de la figura.

La Figura 8 representa el análisis de Kaplan-Meier para la supervivencia libre de metástasis, la supervivencia libre de metástasis distantes, y la supervivencia general para una cohorte de 104 casos que incluye CM en etapas I - IV (A-C), y para una cohorte de 78 casos que incluye solo casos en etapa I y II con evidencia de metástasis, o sin evidencia de metástasis y más de 5 años de seguimiento (D-E).

La Figura 9 representa un análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia libre de metástasis distantes (DMFS) que compara un perfil de expresión génica (GEP) con los factores T del Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer. La DMFS se agrupa mediante la asignación de la clase según GEP (A), un espesor de Breslow mayor o menor que 0,75 mm (B), presencia o ausencia de ulceración (C), o índice mitótico mayor o menor que 1/mm² (D). N refleja la cantidad de casos analizados para cada factor, con base en la disponibilidad de los datos clínicos para esos casos, y la significación estadística.

La Figura 10 representa la supervivencia libre de metástasis (MFS) y la supervivencia en general (OS) en una cohorte de muestras de tumores primarios de melanoma cutáneo obtenidos de pacientes que se sometieron a un procedimiento de SLNB en el transcurso del manejo clínico de la enfermedad. Los casos dentro del grupo se estratifican de acuerdo con los que tuvieron un resultado de SLN negativo (SLN-; que permanece como etapa I o II en las definiciones actuales) o SLN positivo (SLN+; es decir que se clasificaron como etapa III en las definiciones actuales) después de la SLNB para determinar el riesgo de enfermedad metastásica. Debe señalarse que 70 pacientes SLN-desarrollaron enfermedad metastásica y 46 murieron, lo que dio como resultado una MFS y OS en 5 años de solo 55 % y 70 %, respectivamente, en comparación con 37 % y 62 %, respectivamente, para los pacientes con un resultado SLN+.

La Figura 11 representa la supervivencia libre de metástasis (MFS) y la supervivencia en general (OS) en una cohorte de muestras de tumores primarios de melanoma cutáneo obtenidos de pacientes que se sometieron a un procedimiento de SLNB en el transcurso del manejo clínico de su enfermedad. Los casos dentro del grupo se estratifican de acuerdo con los que tuvieron un resultado de clase 1 o clase 2 después de un análisis del GEP de 28 genes para determinar el riesgo de enfermedad metastásica. Debe señalarse que solo 16 de 76 pacientes en la clase 1 desarrollaron enfermedad metastásica y 10 murieron de su enfermedad. La MFS y OS en 5 años fue de 79 % y 89 %, respectivamente, para los pacientes en la clase 1 según el GEP, en comparación con 55 % y 70 %, respectivamente, para los pacientes con un resultado SLN-. Los casos de clase 2 tuvieron MFS y OS en 5 años similares (34 % y 54 %, respectivamente) en comparación con los casos SLN+ (37 % y 62 %, respectivamente).

La Figura 12 representa la supervivencia libre de metástasis (MFS) y la supervivencia en general (OS) en una cohorte de muestras de tumores primarios de melanoma cutáneo obtenida de pacientes que se sometieron a un procedimiento de SLNB en el transcurso del manejo clínico de su enfermedad. Los casos dentro del grupo se estratifican de acuerdo con los resultados combinados predichos mediante el uso del GEP de 28 genes en combinación con SLNB. Los casos de clase 1/SLN- tienen el mejor pronóstico tanto para MFS (83 %) como para OS (91 %). Es significativo que los pacientes de clase 2 con un resultado SLN- o SLN+ tienen una MFS (35 % frente a 33 %, respectivamente) y OS (54 % frente a 57 %, respectivamente) altamente similares, lo que indica que el pronóstico según GEP es más preciso que el pronóstico según SLNB en pacientes con alto riesgo.

La Figura 13 representa la comparación de la supervivencia libre de metástasis (MFS) y libre de metástasis distantes (DMFS) en una cohorte de muestras de tumores primarios de melanoma cutáneo obtenidos de pacientes que se sometieron a un procedimiento de SLNB en el transcurso del manejo clínico de su enfermedad. La MFS incluye metástasis dentro de la cuenca ganglionar (recurrencia regional y enfermedad en tránsito), mientras que la DMFS incluye solo metástasis más allá de la cuenca ganglionar. Los casos dentro del grupo se estratifican de acuerdo con los resultados combinados predichos mediante el uso del GEP de 28 genes en combinación con SLNB. Los casos de clase 1/SLN- tienen el mejor pronóstico tanto para MFS (83 %) como para DMFS (86 %). La comparación de MFS y DMFS destaca la utilidad del GEP para predecir una recurrencia regional, y además refleja el valor de GEP en combinación con SLNB para predecir metástasis distantes en pacientes con CM.

La Figura 14 representa las ventajas quirúrgicas y pronósticas de incluir la firma del GEP con los factores de etapa T según AJCC y SLNB. Con el uso de etapa T solamente **(A)**, se proporcionaron 217 casos de CM con un procedimiento de SLNB. En esta cohorte, 58 casos tuvieron un resultado SLNB+, que refleja un rendimiento quirúrgico de 27 %. La adición de la firma del GEP a los factores T **(B)** habría podido reducir potencialmente la cantidad de procedimientos SLNB de 217 a 141, eliminar 76 casos (35 %), e identificar 49 casos con un resultado SLNB+. Por lo tanto, la adición de la firma del GEP a la asignación de etapas según AJCC proporcionó un rendimiento quirúrgico de 35 % (49/141) en comparación con 27 % (58/217) con la asignación de etapas según AJCC solamente. Se observó, además una ventaja pronóstica para el GEP, ya que el procedimiento de SLNB **(C)** identificó 37/107 casos (sensibilidad = 35 %) con un evento metastásico documentado, mientras que la adición de GEP a SLNB **(D)** identificó 91/107 casos (sensibilidad = 85 %) con un evento metastásico documentado. De los 16 casos metastásicos denominados Clase 1 mediante la firma del GEP, 9 tuvieron un resultado SLN+. De los 9, la firma del GEP clasificó erróneamente solo a 4 casos (1,8 %) que tuvieron un evento metastásico distante, y 3 casos (1,4 %) que murieron de su enfermedad. En general, la firma del GEP proporcionó una mejora neta de la reclasificación de 48 % en la cohorte de 217 muestras de los casos de CM.

Descripción detallada de la invención

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica de la invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, más adelante se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, prevalecerá la presente descripción, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos solo son ilustrativos y no están destinados a ser limitantes. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Los solicitantes se reservan el derecho de reivindicar alternativamente cualquier invención descrita con el uso de la expresión transicional "que comprende", "que consiste esencialmente en", o "que consiste en", de acuerdo con la práctica estándar en la ley de patentes.

Pueden usarse métodos bien conocidos por los expertos en la técnica para obtener construcciones de expresión genética y células recombinantes de acuerdo con esta invención. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, técnicas de recombinación *in vivo*, y técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ver, por ejemplo, las técnicas descritas en Maniatis y otros, 1989, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York; Ausubel y otros, 1989, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, Nueva York, y PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis y otros, 1990, Academic Press, San Diego, CA).

Antes de describir la presente invención en detalle, se definirá una serie de términos. Como se usa en la presente descripción, las formas singulares "un", "uno/una" y "el/la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la referencia a un "ácido nucleico" se refiere a uno o más ácidos nucleicos.

Se hace notar que los términos como "preferentemente", "comúnmente", y "típicamente" no se utilizan en la presente invención para limitar el alcance de la invención reivindicada o para sugerir que ciertas características son discriminantes, esenciales, o incluso importantes para la estructura o función de la invención reivindicada. Más bien, estos términos se proponen meramente para señalar alternativas o características adicionales que pueden o no ser utilizadas en una realización particular de la presente invención.

Para los propósitos de describir y definir la presente invención se hace notar que el término "sustancialmente" se utiliza en la presente invención para representar el grado inherente de incertidumbre que se puede atribuir a cualquier comparación cuantitativa, valor, medición, u otra representación. El término "sustancialmente" se utiliza además en la presente invención para representar el grado en el cual una representación cuantitativa puede variar a partir de una referencia indicada sin resultar en un cambio en la función básica de la materia en cuestión.

Como se usa en la presente, los términos "polinucleótido", "nucleótido", "oligonucleótido", y "ácido nucleico" pueden usarse indistintamente para referirse a un ácido nucleico que comprende ADN, ARN, derivados de estos, o combinaciones de estos.

Los inventores revisaron el estado actual de la técnica en cuanto a evidencia de análisis de micromatrices dirigidos a distinguir perfiles de expresión genética diferenciales que caractericen a los tumores de melanoma cutáneo. Se identificaron siete estudios que utilizaron la tecnología de micromatrices para determinar la expresión genética comparando diversas etapas de melanoma cutáneo.^{22-27,29} El objetivo fue identificar genes que estaban desregulados entre la fase de crecimiento radial y la fase de crecimiento vertical, o en melanomas primarios en comparación con tumores metastásicos. Mauerer y otros, evaluaron las diferencias de la expresión génica en nevos melanocíticos en comparación con melanoma primario, nevos melanocíticos en comparación con melanoma metastásico, y melanoma primario en comparación con melanoma metastásico²⁵. En la técnica no se encontró nada relacionado con la evaluación de tumores de melanoma cutáneo primario con relación a los resultados posteriores metastásicos frente a no metastásicos. En un intento por obtener un conjunto putativo de perfiles de expresión génica, los inventores se

concentraron en genes aislados a partir de muestras de tumores de melanoma primario y muestras de tumores de melanoma metastásico que tuvieron una regulación positiva observada de más de 2 veces, o una regulación negativa de más de 3 veces, y los establecieron como mediadores potenciales de la progresión metastásica. Mediante estos criterios, se escogieron 26 genes regulados positivamente y 78 genes regulados negativamente como la base para la comparación con otros estudios de análisis de la expresión. Este panel de 104 genes se comparó posteriormente con conjuntos de datos de expresión informados en Scatolini y *otros*, Jaeger, y *otros*, Winnipenninckx y *otros*, Haqq, y *otros*, Smith y *otros*, y Bittner y *otros*^{22-24,26,27,29}. Adicionalmente, los datos de expresión de Onken, y *otros*, que informaron 74 genes regulados diferencialmente en tumores de melanoma uveal metastásicos y no metastásicos se compararon con el panel de 104 genes.¹⁴

En una realización, la invención como se describe en la presente es un método para predecir el riesgo de metástasis, la supervivencia general, o ambos, en un paciente con un tumor de melanoma cutáneo primario, el método comprende: (a) medir los niveles de expresión génica de al menos ocho genes seleccionados del grupo que consiste en BAP1_varA, BAP1_varB, MGP, SPP1, CXCL14, CLCA2, S100A8, BTG1, SAP130, ARG1, KRT6B, GJA, ID2, EIF1B, S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, y CST6, en una muestra del tumor de melanoma cutáneo primario, en donde los al menos ocho genes son MGP, CXCL14, S100A8, BTG1, ARG1, GJA1, ID2, S100A9, KRT14, ROBO1, TACSTD2, SPRR1B, TRIM29 y TYRP1, en donde medir los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes comprende la medición de un nivel de fluorescencia mediante un sistema de detección de secuencias después de una RT-PCR de los al menos ocho genes; (b) determinar una firma del perfil de expresión génica del paciente que comprende los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes; (c) comparar la firma del perfil de expresión génica del paciente con un perfil de expresión génica de un conjunto de entrenamiento predictivo; y (d) proporcionar una indicación como un riesgo de metástasis, supervivencia general o ambos para el tumor de melanoma cutáneo primario cuando el perfil de expresión génica del paciente indica que los niveles de expresión de al menos los ocho genes están alterados de una manera predictiva en comparación con el perfil de expresión génica del conjunto de entrenamiento predictivo.

En una realización, el riesgo de metástasis para el tumor de melanoma cutáneo primario se clasifica de un bajo riesgo de metástasis a un alto riesgo de metástasis (por ejemplo, el tumor tiene un riesgo graduado de bajo riesgo a alto o de alto a bajo riesgo de metástasis). Un bajo riesgo de metástasis puede referirse a tasas de supervivencia libre de metástasis en 5 años mayores que 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más, y alto riesgo de metástasis se refiere a tasas de supervivencia libre de metástasis en 5 años de menos del 50 %, 45 %, 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % o menos. De acuerdo con una realización, la clase 1 indica que el tumor tiene un bajo riesgo de metástasis, la clase 2 indica que el tumor tiene un alto riesgo de metástasis, la clase A indica que el tumor tiene un bajo riesgo de metástasis, la clase B indica que el tumor tiene un riesgo intermedio de metástasis y la clase C indica que el tumor tiene un alto riesgo de metástasis.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente pueden comprender determinar que el tumor de melanoma cutáneo primario tiene un riesgo de metástasis aumentado o supervivencia general disminuida mediante la combinación con al menos un estado de TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis), la asignación de etapas clínicas establecida por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) para asignar una etapa al tumor de melanoma cutáneo primario, y el estado de la biopsia de nódulo linfático centinela. De acuerdo con un ejemplo, (1) el espesor de Breslow de mayor o menor que 0,75 mm; o (2) la presencia o ausencia de ulceración; o (3) el índice mitótico mayor o menor que 1/mm²; o (4) el estado de la biopsia de nódulo linfático centinela o cualquier combinación de los cuatro puede usarse en combinación con la firma de expresión génica de un melanoma cutáneo primario. En una realización, se realizó una biopsia de nódulo linfático centinela en el paciente a partir del cual se obtuvo el tumor de melanoma cutáneo primario de manera separada. En otra realización la biopsia de nódulo linfático centinela fue negativa.

En la presente se describe un método para tratar un melanoma cutáneo en un paciente, el método comprende: (a) medir los niveles de expresión génica de al menos ocho genes seleccionados del grupo que consiste en BAP1_varA, BAP1_varB, MGP, SPP1, CXCL14, CLCA2, S100A8, BTG1, SAP130, ARG1, KRT6B, GJA, ID2, EIF1B, S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, y CST6 en una muestra de un tumor de melanoma cutáneo primario en el paciente, en donde medir los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes comprende determinar un nivel de fluorescencia mediante un sistema de detección de secuencias después de una RT-PCR de los al menos ocho genes; (b) determinar una firma del perfil de expresión génica del paciente que comprende los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes; (c) comparar la firma del perfil de expresión génica del paciente con un perfil de expresión génica de un conjunto de entrenamiento predictivo; (d) hacer una determinación de si la firma del perfil de expresión génica del paciente de los al menos ocho genes está alterada de una manera predictiva; y (e) administrar un régimen de tratamiento agresivo contra el cáncer al paciente cuando la determinación es afirmativa de que el paciente tiene un tumor de melanoma cutáneo primario con un riesgo de metástasis aumentado o supervivencia general disminuida.

En la presente se describe un método para tratar melanoma cutáneo en un paciente, el método comprende: (a) medir los niveles de expresión génica de al menos ocho genes seleccionados del grupo que consiste en BAP1_varA, BAP1_varB, MGP, SPP1, CXCL14, CLCA2, S100A8, BTG1, SAP130, ARG1, KRT6B, GJA, ID2, EIF1B, S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, y CST6 en una muestra de un tumor de melanoma cutáneo primario en el paciente, en donde medir los niveles de expresión

génica de los al menos ocho genes comprende determinar un nivel de fluorescencia mediante un sistema de detección de secuencias después de una RT-PCR de los al menos ocho genes; (b) determinar una firma del perfil de expresión génica del paciente que comprende los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes; (c) comparar la firma del perfil de expresión génica del paciente con un perfil de expresión génica de un conjunto de entrenamiento predictivo; (d) hacer una determinación de si la firma del perfil de expresión génica del paciente de los al menos ocho genes está alterada de una manera predictiva; y (e) realizar una biopsia de nódulo linfático centinela (SLNB) en el paciente cuando la determinación es afirmativa de que el paciente tiene un tumor de melanoma cutáneo primario con un riesgo de metástasis aumentado o supervivencia general disminuida.

Como se usa en la presente, "tumor de melanoma cutáneo primario" se refiere a cualquier lesión de melanoma primario, independientemente del espesor del tumor, en pacientes sin evidencia clínica o histológica de enfermedad metastásica regional o distante y que puede obtenerse a través de una variedad de métodos de muestreo tal como biopsia por perforación, biopsia por cuchilla, extirpación local amplia, y otros medios para extraer ARN de la lesión de melanoma primario.

Como se usa en la presente, "metástasis" se define como la recurrencia o progresión de la enfermedad que puede ocurrir localmente (tal como recurrencia local y enfermedad en tránsito), regionalmente (tal como micrometástasis ganglionar o macrometástasis), o distalmente (tal como cerebro, pulmón y otros tejidos). La "clase 1 o clase 2 de metástasis" como se define en la presente incluye bajo riesgo (clase 1) o alto riesgo (clase 2) de metástasis de acuerdo con cualquiera de los métodos estadísticos descritos en la presente. Adicionalmente, "metástasis de melanoma cutáneo" como se usa en la presente incluye metástasis en nódulo linfático centinela, metástasis en tránsito, metástasis distantes, y recurrencia local.

Como se usa en la presente, "supervivencia general" (OS) se refiere al porcentaje de personas en un estudio o grupo de tratamiento que todavía están vivos durante un determinado periodo de tiempo después que fueron diagnosticados o se inició un tratamiento para una enfermedad, tal como cáncer. La tasa de supervivencia general se plantea frecuentemente como una tasa de supervivencia en cinco años, que es el porcentaje de personas en un estudio o grupo de tratamiento que están vivos cinco años después de su diagnóstico o del inicio del tratamiento.

La expresión "medir los niveles de expresión génica" como se usa en la presente se refiere a determinar o cuantificar el ARN o proteínas expresados por el gen o los genes. El término "ARN" incluye transcritos de ARNm, y/o variantes de ARNm con corte y empalme específico. El término "producto de ARN del gen" como se usa en la presente se refiere a transcritos de ARN que se transcribieron a partir del gen y/o variantes de corte y empalme específicas. En el caso de "proteína", se refiere a proteínas traducidas a partir de los transcritos de ARN que se transcribieron a partir del gen. El término "producto proteico del gen" se refiere a las proteínas traducidas a partir de los productos de ARN del gen. Una serie de métodos pueden usarse para detectar o cuantificar el nivel de los productos de ARN del gen o genes dentro de una muestra, que incluye micromatrices, RT-PCR (que incluye RT-PCR cuantitativa), ensayos de protección de nucleasas y análisis de transferencia Northern. El ensayo puede usar el sistema de PCR en tiempo real rápida APPLIED BIOSYSTEMS™ HT7900. Además, un experto en la técnica apreciará que pueden usarse una serie de métodos para determinar la cantidad de un producto proteico de un gen de la invención, que incluye inmunoensayos tal como transferencias Western, ELISA, e inmunoprecipitación seguida por SDS-PAGE e inmunocitoquímica.

Un experto en la técnica apreciará que pueden usarse una serie de agentes de detección para determinar la expresión de los genes. Por ejemplo, para detectar los productos de ARN de los biomarcadores, pueden usarse sondas, cebadores, secuencias de nucleótidos complementarias o secuencias de nucleótidos que se hibridan con los productos de ARN. Para detectar los productos proteicos de los biomarcadores, pueden usarse ligandos o anticuerpos que se unen específicamente a los productos proteicos.

El término "hibridar" se refiere a la interacción de una unión no covalente específica de secuencia con un ácido nucleico complementario. La hibridación puede ser en condiciones de alta rigurosidad. Las condiciones de rigurosidad adecuadas que promueven la hibridación se conocen por los expertos en la técnica.

El término "sonda" como se usa en la presente se refiere a una secuencia de ácido nucleico que hibridará con una secuencia objetivo de ácido nucleico. En un ejemplo, la sonda se hibrida con un producto de ARN del gen o una secuencia de ácido nucleico complementaria de este. La longitud de la sonda depende de las condiciones de hibridación y las secuencias de la sonda y la secuencia objetivo de ácido nucleico. La sonda puede ser de al menos 8, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 400, 500 o más nucleótidos de longitud.

Como se usa en la presente, un "sistema de detección de secuencias" es cualquier método computacional en la técnica que pueda usarse para analizar los resultados de una reacción de PCR. Un ejemplo, *entre otros*, es el sistema de PCR en tiempo real rápida APPLIED BIOSYSTEMS™ HT7900. La expresión génica puede analizarse mediante el uso, *por ejemplo*, de expresión directa de ADN en micromatriz, análisis de secuenciación de Sanger, transferencia Northern, la tecnología NANOSTRING®, análisis seriado de la expresión génica (SAGE), ARN-seq, micromatriz de tejidos, o expresión de proteínas con inmunohistoquímica o técnica de transferencia Western.

Como se usa en la presente el término "expresado diferencialmente" o "expresión diferencial" se refiere a una diferencia en el nivel de expresión de los genes que pueden analizarse mediante la medición del nivel de expresión de los productos de los genes, tal como la diferencia en el nivel del transcrito de ARN mensajero expresado o las proteínas expresadas de los genes. Preferiblemente, la diferencia es estadísticamente significativa. El término "diferencia en el nivel de expresión" se refiere a un aumento o disminución en el nivel de expresión medible de un gen determinado según se mide por la cantidad de transcrito de ARN mensajero y/o la cantidad de proteína en una muestra en comparación con el nivel de expresión medible de un gen determinado en un control. La expresión diferencial puede compararse mediante el uso de la relación del nivel de expresión de un gen o genes determinados en comparación con el nivel de expresión del gen o genes determinados de un control, en donde la relación no es igual a 1,0. Por ejemplo, un ARN o proteína se expresan diferencialmente si la relación del nivel de expresión en una primera muestra en comparación con una segunda muestra es mayor o menor que 1,0. Por ejemplo, una relación mayor que 1, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 3, 5, 10, 15, 20 o más, o una relación menor que 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1, 0,05, 0,001 o menos. La expresión diferencial se puede medir mediante el uso de un valor de p. Por ejemplo, cuando se usa un valor de p, se identifica que un biomarcador se expresa diferencialmente entre una primera muestra y una segunda muestra cuando el valor de p es menor que 0,1, preferentemente menor que 0,05, con mayor preferencia menor que 0,01, aún con mayor preferencia menor que 0,005, con la máxima preferencia menor que 0,001.

Como se usa en la presente, los términos "control" y "estándar" se refieren a un valor específico que puede usarse para determinar el valor obtenido a partir de la muestra. Un conjunto de datos puede obtenerse a partir de muestras de un grupo de sujetos que se conoce que tienen un tipo o subtipo de melanoma cutáneo. Los datos de expresión de los genes en el conjunto de datos pueden usarse para crear un valor control (estándar) que se usa en las muestras de prueba a partir de nuevos sujetos. En tal caso, el "control" o "estándar" es un valor predeterminado para cada gen o conjunto de genes obtenidos a partir de sujetos con melanoma cutáneo cuyos valores de expresión génica y tipos de tumor se conocen.

Como se define en la presente, "firma del perfil de expresión génica" es cualquier combinación de genes, los niveles de expresión de transcritos de ARN mensajero medidos o niveles de expresión directa de ADN o niveles de inmunohistoquímica que pueden usarse para distinguir entre dos tejidos corporales y/o células y/o cambios celulares biológicamente diferentes. La firma del perfil de expresión génica puede estar compuesta de los niveles de expresión génica de al menos 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, u 8 genes.

Como se define en la presente, "conjunto de entrenamiento predictivo" se refiere a una cohorte de tumores de CM con un conocido resultado clínico de metástasis y un perfil de expresión genética conocido, que se usa para definir/establecer todos los otros tumores de CM, basado en el perfil de expresión genética de cada uno, como un tipo de tumor de bajo riesgo, clase 1 o un tipo de tumor de alto riesgo, clase 2. Adicionalmente, en el conjunto de entrenamiento predictivo se incluye la definición de "puntos umbrales" que son puntos en los que se determina una clasificación de riesgo de metástasis, específicos para cada nivel de expresión génica individual.

Como se define en la presente, "alterado de una manera predictiva" se refiere a cambios en el perfil de expresión genética que predice un riesgo de metástasis o predice una supervivencia general. La evaluación de riesgo con modelación predictiva puede medirse como: 1) un resultado binario que tiene un riesgo de metástasis o una supervivencia general que se clasifican como de bajo riesgo (*por ejemplo*, denominado Clase 1 en la presente) frente a un alto riesgo (*por ejemplo*, denominado Clase 2 en la presente); y/o 2) un resultado lineal basado en una puntuación de probabilidad de 0 a 1 que refleja la correlación del perfil de expresión genética de un tumor de melanoma cutáneo con el perfil de expresión genética de las muestras que comprenden el conjunto de entrenamiento usado para predecir un resultado de riesgo. Dentro del intervalo de puntuación de probabilidad de 0 a 1, una puntuación de probabilidad, por ejemplo, menor que 0,5 refleja una muestra de tumor con un bajo riesgo de metástasis o muerte derivado de la enfermedad, mientras que una puntuación de probabilidad, por ejemplo, mayor que 0,5 refleja una muestra de tumor con un alto riesgo de metástasis o muerte derivado de la enfermedad. La puntuación de probabilidad creciente de 0 a 1 refleja una supervivencia libre de metástasis en disminución creciente, como se ilustra por ejemplo en la Figura 7. Por ejemplo, dentro de los subconjuntos A, B y C en la Figura 7, los tumores de melanoma cutáneo que tienen una puntuación de probabilidad de 0 a 0,299 muestran tasas de supervivencia libre de metástasis en 5 años del 100 %, y las tasas permanecen por encima de 90 % para los subconjuntos D (0,3-0,399) y E (0,4-0,499). Por el contrario, los subconjuntos de tumores F (0,5-0,599, 50 % de MFS en 5 años), G (0,6-0,699, 45 % de MFS en 5 años), H (0,7-0,799, 33 % de MFS en 5 años), I (0,8-0,899, 25 % de MFS en 5 años) y J (0,9-1,0, 10 % de MFS en 5 años), con puntuaciones de probabilidad entre 0,5 y 1 muestran disminuciones significativas en las tasas de supervivencia en 5 años con cada aumento creciente de 0,1 en la puntuación de probabilidad.

Para desarrollar un sistema ternario, de tres clases, para la evaluación del riesgo, donde la Clase A tiene un bajo riesgo de metástasis o muerte derivado de la enfermedad, la Clase B tiene un riesgo intermedio, y la Clase C tiene un alto riesgo, se determinó la mediana del valor de puntuación de probabilidad para todas las muestras de tumor de bajo riesgo o alto riesgo en el conjunto de entrenamiento, y se estableció una desviación estándar de la mediana como un límite numérico para definir el riesgo bajo o alto. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 6, los tumores de melanoma cutáneo de bajo riesgo (Clase A) dentro del sistema de clasificación ternario tienen una supervivencia libre de metástasis en 5 años de 98 %, en comparación con los tumores de alto riesgo (Clase C) con una tasa en 5 años de 30 %. Los casos que caen fuera de una desviación estándar de la mediana de las puntuaciones de probabilidad de

riesgo bajo o alto tienen un riesgo intermedio, y los tumores de riesgo intermedio (Clase B) tienen una tasa de supervivencia libre de metástasis en 5 años de 79 %.

El sistema de estado de TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis) es el sistema de determinación de etapas del cáncer más ampliamente usado entre los médicos clínicos y es mantenida por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) y la Unión Internacional para el Control del Cáncer (UICC). Los sistemas de asignación de etapas del cáncer codifican el grado del cáncer para proporcionar a los médicos clínicos y pacientes los medios para cuantificar el pronóstico de pacientes individuales y para comparar grupos de pacientes en ensayos clínicos y quienes reciben cuidado estándar en todo el mundo. La asignación de etapas clínicas incluye las microetapas del melanoma primario y la evaluación clínica/radiológica de las metástasis. Por convención, la asignación de etapas clínicas debe usarse después de la extirpación completa del melanoma primario con evaluación clínica de las metástasis regionales y distantes. El AJCC y la UICC actualizan periódicamente el sistema de determinación de etapas del cáncer según el estado de TNM. La revisión más reciente es la 7ma edición, eficaz para cánceres diagnosticados el 1ro de enero de 2010 o después (Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editores. AJCC cancer staging manual (7ma ed). Nueva York, NY: Springer; 2010, páginas 325-344). La clasificación de tumores se resume a continuación en la tabla A.

Tabla A. Clasificación T de melanoma de la piel

Clasificación T	Grosor (mm)	Estado de ulceración/mitosis
T1	≤1,0	a: sin ulceración y mitosis <1/mm ²
		b: con ulceración o mitosis ≥1/mm ²
T2	1.01-2.0	a: sin ulceración
		b: con ulceración
T3	2.01-4.0	a: sin ulceración
		b: con ulceración
T4	>4,0	a: sin ulceración
		b: con ulceración

Como se define en la presente, "biopsia de nódulo linfático centinela" se refiere a un procedimiento en el cual el o los primeros nódulos linfáticos (*es decir*, el nódulo linfático centinela) a los cuales es más probable la dispersión de células cancerosas a partir de un tumor primario se identifican, eliminan, y examinan para determinar la presencia de células cancerosas. Una biopsia de nódulo linfático centinela (SLNB) puede usarse para ayudar a determinar el grado, o etapa, del cáncer en el cuerpo. Durante el procedimiento de SLNB, se toman biopsias de múltiples SLN. Un resultado de SLNB negativa puede sugerir que el cáncer no ha desarrollado la capacidad de dispersión a los nódulos linfáticos cercanos u otros órganos. Un resultado de SLNB positiva indica que el cáncer está presente en el nódulo linfático centinela y puede estar presente en otros nódulos linfáticos cercanos (denominados nódulos linfáticos regionales) y, posiblemente, otros órganos. Como intervención quirúrgica, la SLNB tiene un rendimiento bajo donde solo el 5 % de los pacientes con etapas de 1b de CM que se someten a SLNB producen una SLNB positiva, y solo el 18 % de los pacientes en etapa II producen una SLNB positiva. La SLNB puede tener efectos adversos. Los efectos adversos potenciales de la cirugía de nódulos linfáticos incluyen los siguientes: riesgo de complicaciones por la anestesia general, linfedema, o edema tisular; seroma, o la acumulación de linfa en el sitio de la cirugía; entumecimiento, hormigueo, baja función motora o dolor en el sitio de la cirugía; dificultad para mover la parte del cuerpo afectada; e infección. La SLNB, como otros procedimientos quirúrgicos, puede provocar dolor, edema, y moretones a corto plazo en el sitio quirúrgico y aumento del riesgo de infección. Además, algunos pacientes pueden tener reacciones alérgicas o de la piel al colorante azul usado en la SLNB. Otro daño clínicamente significativo es un resultado falso negativo de la biopsia, es decir, que no se observan células cancerosas en el nódulo linfático centinela, aunque pueden estar presentes en el sistema linfático, quizás no han alcanzado la SLNB, se eliminaron biológicamente de la SLNB y pueden estar presentes en nódulos linfáticos regionales, se dispersaron de manera hematógena, o en otras partes del cuerpo. Una biopsia con resultado falso negativo provoca asignar etapas menores al paciente, lo que resulta en el subtratamiento del verdadero riesgo del paciente de desarrollar una enfermedad metastásica y le da al paciente y al médico un sentido falso de seguridad sobre el grado del cáncer en el cuerpo del paciente. Como se demostró por el estudio de MSLT-1 y las directrices del AJCC, aproximadamente el doble de los pacientes que tienen SLNB negativa tendrán metástasis en comparación con los que tienen SLNB positiva.

Como se define en la presente, "régimen de tratamiento agresivo contra el cáncer" se determina por un profesional médico y puede ser específico para cada paciente. Un régimen de tratamiento agresivo contra el cáncer se define por la Red Nacional Integral contra el Cáncer (NCCN), y se ha definido en las directrices NCCN Guidelines® como que incluye uno o más de lo siguiente: 1) estudio de imágenes intensificadas (TAC, PET/CT, MRI, rayos X de pecho), 2) análisis y/u obtención de biopsia de nódulo linfático centinela con posterior disección de nódulo linfático parcial o completa, 3) inclusión en ensayos clínicos en curso, y 4) intervención terapéutica con tratamiento con interferón alfa y

radiación a la cuenca ganglionar. Las directrices para la práctica clínica están publicadas en las directrices National Comprehensive Cancer Network (NCCN Guidelines® Melanoma versión 2.2013 disponible en internet en el sitio NCCN.org). Otras opciones terapéuticas incluyen, pero no se limitan a, inyecciones de la vacuna del Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), interferón, o interleucina 2 (IL-2) directamente en el melanoma; terapia de radiación sin intervención quimioterapéutica; o aplicación de la crema de imiquimod (ALDARA®). Para los melanomas en un brazo o pierna, otra opción podría ser perfusión del miembro aislado (*es decir*, infundir el miembro con una solución calentada de quimioterapia). Otros tratamientos posibles incluyen terapia dirigida, tal como inmunoterapia (por ejemplo, ipilimumab/YERVOY®), quimioterapia (por ejemplo, dacarbacina/DTIC® y temozolomida/TEMODAR®), o inmunoterapia combinada con quimioterapia (*es decir*, bioquimioterapia).

Como se usa en la presente, los términos tratamiento, tratar, o que trata se refieren a un método para reducir los efectos de una enfermedad o afección o síntoma de la enfermedad o afección. Por lo tanto, en el método descrito, el tratamiento puede referirse a una reducción del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % en la gravedad de una enfermedad o afección establecidas o síntoma de la enfermedad o afección. Por ejemplo, un método para tratar una enfermedad se considera que es un tratamiento si existe una reducción del 5 % en uno o más síntomas de la enfermedad en un sujeto en comparación con un control. Por lo tanto, la reducción puede ser una reducción del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % o cualquier por ciento entre 5 y 100 % en comparación con los niveles nativos o controles. Se entiende que el tratamiento no necesariamente se refiere a una cura o ablación completa de la enfermedad, afección, o síntomas de la enfermedad o afección.

En una realización, el tumor de melanoma cutáneo se toma a partir de una muestra por extirpación local amplia, fijada en formalina, embebida en parafina. En otra realización, el tumor de melanoma cutáneo se toma a partir de una muestra de biopsia por perforación, fijada en formalina, embebida en parafina. En otra realización, el tumor de melanoma cutáneo se toma a partir de una muestra de biopsia por cuchilla, fijada en formalina, embebida en parafina.

El análisis de la expresión genética y la determinación de los resultados se puede llevar a cabo mediante el uso de un análisis de máquina con base radial y/o árbol de partición, análisis de regresión logística (LRA), vecino K más cercano, u otro enfoque algorítmico. Estas técnicas de análisis tienen en cuenta el gran número de muestras requeridas para generar un conjunto de entrenamiento que permitirá una predicción precisa de los resultados producto de puntos de corte establecidos con un conjunto de entrenamiento en proceso o puntos de corte definidos para análisis no algorítmicos, pero que cualquier cantidad de enfoques lineales y no lineales pueden producir un resultado estadísticamente significativo y clínicamente significativo. Las ventajas de uso de los métodos descritos en la presente se relacionan con, *por ejemplo*, el exceso de 140 muestras en el conjunto de entrenamiento usado para cubrir ya sea la heterogeneidad o los cambios más pequeños del perfil de expresión génica manejados adecuadamente que pueden predecir resultados de manera no adecuada, en un conjunto de prueba independiente. Como se define en la presente, en la técnica se entiende que un "análisis de supervivencia de Kaplan-Meier" también se conoce como el estimador límite del producto, que se usa para estimar la función de supervivencia a partir de los datos del tiempo de vida. En la investigación médica, se usa frecuentemente para medir la fracción de pacientes que sobreviven durante una cantidad de tiempo determinada después del tratamiento. El programa informático JMP GENOMICS® proporciona una interfaz para utilizar cada uno de los métodos de modelación predictiva descritos en la presente, y no debe limitar las reivindicaciones a los métodos llevados a cabo solo con el programa informático JMP GENOMICS®.

Ejemplos

Los ejemplos a continuación son ilustrativos de realizaciones específicas de la invención, y diversos usos de estas. Se exponen solo con propósitos explicativos, y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Materiales y Métodos

1. Preparación de las muestras de tumores de melanoma cutáneo y aislamiento de ARN

Las muestras de tumores de melanoma cutáneo primario, fijadas en formalina, embebidas en parafina (FFPE) dispuestas en secciones de 5 µm sobre láminas para microscopio se adquirieron de múltiples instituciones participantes en protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional (IRB). Todos los tejidos se revisaron por un patólogo para confirmar la presencia de melanoma y se marcó el área tumoral disecable. El tejido tumoral se disecó de la lámina mediante el uso de un escalpelo desechable estéril, se recolectó en un tubo de microcentrífuga, y se desparafinó mediante el uso de xileno. El ARN se aisló de cada muestra mediante el uso del estuche de aislamiento de ácidos nucleicos totales Ambion RECOVERALL™ (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY). La cantidad y calidad del ARN se evaluaron mediante el uso del sistema NANODROP™ 1000 y el Bioanalizador 2100 de Agilent.

2. Generación de ADNc y análisis de RT-PCR

El ARN aislado de las muestras FFPE se convirtió a ADNc mediante el uso del estuche de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad de APPLIED BIOSYSTEMS™ (Life Technologies Corporation, Grand Island, NY). Antes de realizar el ensayo de RT-PCR cada muestra de ADNc se sometió a una etapa de amplificación previa de 14 ciclos.

Las muestras de ADNc amplificadas previamente se diluyeron 20 veces en tampón TE. 50 ul de cada muestra diluida se mezcló con 50 ul de mezcla maestra para la expresión génica 2X TAQMAN®, y la solución se cargó en una tarjeta génica de microfluidos de alto rendimiento diseñada especialmente que contiene cebadores específicos para 28 genes discriminantes de clases y 3 genes control endógenos (HNRNPL, YKT2 y FXR1). Cada muestra se corrió por triplicado.

3. Análisis de la expresión y asignación de clases

Los valores de Ct medios se calcularon para los conjuntos de muestras triplicados, y los valores de ΔC_t se calcularon al sustraer el Ct medio de cada gen discriminante de la media geométrica de los valores de Ct medios de los tres genes control endógenos (HNRNPL, YKT2 y FXR1). Los valores de ΔC_t se estandarizaron de acuerdo con la media de la expresión de todos los genes discriminantes con una escala equivalente a la desviación estándar. Se seleccionaron tres genes control en base al análisis mediante el uso de geNorm. Distintos métodos de modelación predictiva lineales y no lineales, que incluyen máquina con base radial, vecino k más cercano, árbol de partición, regresión logística, análisis discriminante y puntuación de la distancia, se realizaron mediante el uso del programa informático basado en SAS JMP GENOMICS® (JMP, Cary, NC). Las curvas de Kaplan-Meier que reflejan la supervivencia libre de metástasis también se generaron en JMP, y la significación estadística se calculó de acuerdo con el método de log rank. El análisis de regresión de Cox univariado y multivariado se realizó mediante el uso de WinSTAT para Microsoft Excel versión 2012.1.

Ejemplo 1: Firma genética del riesgo de metástasis de melanoma cutáneo y expresión de biomarcadores

La expresión genética de los genes discriminantes en la firma (tabla 1) se evaluó en una cohorte de 268 muestras de melanoma cutáneo mediante el uso de RT-PCR (Figura 1). Como se muestra en la tabla 2 más adelante, de los 28 genes discriminantes, 26 estaban alterados significativamente en los tumores de melanoma metastásico en comparación con los tumores no metastásicos ($p < 0,05$, intervalo 0,0366-6,08E-16), y 25 estaban regulados negativamente. Los genes que se regularon positivamente en los tumores metastásicos incluyeron SPP1, KRT6B, y EIF1B.

Tabla 1: Genes incluidos en la firma del GEP capaz de predecir el riesgo de metástasis a partir de tumores primarios de CM.

<u>Símbolo del Gen</u>	<u>Nombre del Gen</u>	<u>Nombres alternativos del gen</u>
BAP1_varA	Proteína 1 asociada a BRCA1	TPDS, UCHL2, HUCEP-13, HUCEP-6, BAP_var1, BAP (a1)
BAP1_varB	Proteína 1 asociada a BRCA1	UCHL2, HUCEP-13, HUCEP-6, BAP_var2, BAP (a2)
MGP	ácido gamma carboxiglutámico de la matriz	proteína Gla de la matriz, ácido gamma carboxiglutámico, GIG36, MGLAP, NTI
SPP1	fosfoproteína secretada 1	BNSP, BSPI, ETA-1, OPN, PSEC0156
CXCL14	ligando 14 de quimocina (resto C-X-C)	miembro 14 de la subfamilia B de citocinas inducibles pequeñas, UNQ240/PRO273, BMAC, BRAK, KEC, KS1, MIP-2 g, MIP2G, NJAC, SCYB14
CLCA2	canal de cloruro accesorio 2	canal de cloruro regulador 2, canal de cloruro activado por calcio 2, CACC, CACC3, CLCRG2, CaCC-3
S100A8	Proteína A8 de unión a calcio S100	calgranulina-A, subunidad de calprotectina L1L, antígeno de fibrosis quística, cadena ligera del complejo L1 de leucocitos, proteína 8 relacionada con el factor inhibidor de la migración, banda proteica A del cálculo renal, proteína S100-A8, 60B8AG, CAGA, CFAG, CGLA, CP-10, L1Ag, MA387, MIF, MRP8, NIF, P8
S100A9	Proteína A9 de unión a calcio S100	calgranulina-B, subunidad de calprotectina L1H, cadena pesada del complejo L1 de leucocitos, proteína 14 relacionada con el factor inhibidor de la migración, 60B8AG, CAGB, CFAG, CGLB, L1AG, LIAG, MAC387, MIF, MRP14, NIF, P14

<u>Símbolo del Gen</u>	<u>Nombre del Gen</u>	<u>Nombres alternativos del gen</u>
BTG1	gen 1 de translocación de células B, anti-proliferativo	proteína del gen 1 de translocación de células B
SAP130	proteína asociada a Sin3A, 130 kDa	
ARG1	arginasa-1	arginasa de tipo hepático, arginasa tipo I
KRT6B	queratina 6B	queratina tipo II citoesquelética 6B, citoqueratina 6B, queratina tipo II Kb10, CK-6B, CK6B, K6B, KRTL1, PC2
GJA1	proteína de uniones en hendidura, alfa 1	conexina 43, proteína de unión en hendidura de 43 kDa de corazón, AU042049, AW546267, Cnx43, Cx43, Cx43alpha1, Gja-1, Npm1
ID2	inhibidor de unión a ADN 2, proteína de hélice-bucle-hélice negativa dominante	proteína de hélice-bucle-hélice básica de clase B, GIG8, ID2A, ID2H, ldb2, bHLHb26
EIF1B	factor 1B de iniciación de la traducción eucariota	homólogo GC20 del factor de traducción de proteínas SUI1
CRABP2	proteína 2 de unión al ácido retinoico celular	RP11-66D17.5, CRABP-II, RBP6
KRT14	queratina 14	queratina tipo I citoesquelética 14, citoqueratina 14, CK14, EBS3, EBS4, K14, NFJ
ROBO1	roundabout, receptor guía de axones, homólogo 1 (Drosophila)	homólogo 1 de roundabout, eliminado en U veinte veinte, H-Robo-1, DUTT1, SAX3
RBM23	proteína 23 con resto de unión a ARN	proteína 4 que contiene región de unión a ARN, factor de corte y empalme SF2, PP239, CAPERbeta, RNPC4
TACSTD2	transductor 2 de señales de calcio asociado al tumor	glicoproteína de la superficie celular Trop-2, marcador superficial 1 de componente de la membrana de cromosoma 1, proteína marcadora de carcinoma pancreático GA733-1, GA733-1, TROP2, EGP-1, EGP1, GA7331, GP50, M1S1
DSC1	desmocolina 1	miembro 1 de la familia de cadherinas, glicoproteína desmosómica 2/3, CDHF1, DG2/DG3
SPRR1B	proteína pequeña 1B rica en prolina	CORNIFIN, cornifina-B, pancornulina de 14,9 kDa, GADD33, SPRR1
TRIM29	resto tripartita que contiene 29	ATDC
AQP3	acuaporina 3	acuagliceroporina 3, AQP-3, GIL
TYRP1	proteína 1 relacionada con tirosinasa	RP11-3L8.1, CAS2, CATB, GP75, OCA3, TRP, TRP1, TYRP, PROTEÍNA b
PPL	periplakin	antígeno de pénfigo paraneoplásico de 190 kDa, proteína precursora cornificada de la envoltura de 195 kDa
LTA4H	hidrolasa de leucotrieno A4	Hidrolasa de LTA-4
CST6	cistatina E/M	

Tabla 2: Genes incluidos en la firma del GEP capaz de predecir el riesgo de metástasis a partir de tumores primarios de CM.

	Delta-valor de Ct				
Símbolo del Gen	muestras no metastásicas	muestras metastásicas	cambio de la expresión en muestras metastásicas	valor de p	dirección del cambio de expresión
BAP1 varA	-1,290	-1,677	-0,388	0,007118	disminuye
MGP	-1,996	-2,190	-0,194	0,48585	disminuye
SPP1	-1,011	2,224	3,235	6,08E-16	aumenta
CXCL14	3,021	0,828	-2,193	3,31E-12	disminuye
BAP1 varB	0,381	0,003	-0,378	0,004646	disminuye
CLCA2	-3,468	-5,603	-2,135	1,02E-08	disminuye
S100A8	-0,450	-1,179	-0,728	0,030655	disminuye
BTG1	-2,422	-3,008	-0,586	0,023606	disminuye
SAP130	-1,075	-1,405	-0,329	0,023626	disminuye
ARG1	-1,645	-4,393	-2,749	1,05E-08	disminuye
KRT6B	-1,809	-1,222	0,586	0,160458	aumenta
GJA1	-2,882	-3,652	-0,770	0,034149	disminuye
ID2	-0,649	-1,411	-0,762	3,91E-06	disminuye
EIF1B	0,041	0,350	0,309	0,023747	aumenta
S100A9	3,374	2,527	-0,847	0,012385	disminuye
CRABP2	-0,087	-0,953	-0,866	0,00059	disminuye
KRT14	5,654	3,927	-1,727	1,75E-05	disminuye
ROBO1	0,100	-0,364	-0,464	0,000406	disminuye
RBM23	-2,788	-3,161	-0,374	0,018025	disminuye
TACSTD2	-3,485	-3,984	-0,499	0,03658	disminuye
DSC1	-0,102	-2,963	-2,861	7E-09	disminuye
SPRR1B	4,622	3,139	-1,482	0,001392	disminuye
TRIM29	0,228	-2,239	-2,467	2,34E-09	disminuye
AQP3	3,413	1,848	-1,565	5,08E-06	disminuye
TYRP1	1,276	-0,850	-2,125	2,41E-06	disminuye
PPL	-0,082	-2,233	-2,150	5,59E-11	disminuye
LTA4H	-0,736	-1,275	-0,539	0,000156	disminuye
CST6	-0,535	-3,099	-2,563	1,02E-08	disminuye

Ejemplo 2: Estudios de desarrollo del conjunto de entrenamiento inicial y comparación con cohorte de validación

- Con el uso del programa informático JMP GENOMICS® y el análisis de los datos clínicos, se generó un conjunto de entrenamiento de 164 muestras de melanoma cutáneo que puede predecir con precisión el riesgo de metástasis basado en la firma de 28 genes. El conjunto de entrenamiento contenía 15 melanomas de etapa 0 *in situ*, 61 melanomas de etapa I, 70 de etapa II, 17 de etapa III, y 1 de etapa IV. El riesgo metastásico se evaluó mediante el uso de un algoritmo de modelación predictiva de máquina con base radial, que reporta la clase 1 (bajo riesgo de metástasis) o la clase 2 (alto riesgo de metástasis). Los valores de ΔCt generados a partir del análisis de RT-PCR de la cohorte del conjunto de entrenamiento se estandarizaron respecto de la media para cada gen, con una escala equivalente a la desviación estándar. Los análisis también se realizaron mediante el uso de KNN, PTA, y análisis discriminante para confirmar los resultados del enfoque de RBM (como se analiza más adelante). El algoritmo de predicción del conjunto de entrenamiento se validó después mediante el uso de una cohorte independiente de 104 muestras de melanoma cutáneo, compuesta de 57 melanomas de etapa I, 34 de etapa II, 11 de etapa III y 2 de etapa IV. Las muestras en el conjunto de validación se estandarizaron antes del análisis con el uso de los factoriales

generados durante la estandarización del conjunto de entrenamiento. El área bajo la curva característica operativa del receptor (ROC), la precisión, la sensibilidad (predicción de un evento metastásico de alto riesgo), y especificidad (predicción de un resultado no metastásico) fueron criterios de valoración estadísticos para el análisis. En la cohorte del conjunto de entrenamiento, ROC = 0,9052, precisión = 83 %, sensibilidad = 85 %, y especificidad = 80 % (Figura 1A). En la cohorte de validación, ROC = 0,9089, precisión = 86 %, sensibilidad = 89 %, y especificidad = 83 % (Figura 1B).

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier también se realizó para las cohortes de entrenamiento y validación. En el conjunto de entrenamiento, la supervivencia libre de metástasis en 5 años (MFS) fue de 91 % para los casos de clase 1, y 25 % para los casos de clase 2 ($p < 0,0001$; Figura 1A). Por comparación, la MFS en 5 años para la cohorte de validación fue de 97 % para los casos de clase 1 y 31 % para los casos de clase 2 ($p < 0,0001$; Figura 1B). En general, la tasa de MFS en 5 años para todo el conjunto de entrenamiento, combinando los casos de clase 1 y clase 2, fue de 64 %, mientras que la tasa de MFS combinada para el conjunto de validación fue de 69 %.

Ejemplo 3: Análisis del conjunto de entrenamiento de 162 muestras con múltiples métodos de modelación predictiva

El programa informático JMP GENOMICS® permite el análisis mediante el uso de métodos de modelación predictiva lineales y no lineales. Para evaluar si la precisión de la predicción del riesgo de metástasis para la cohorte de validación se limitó al método de RBM, se realizaron los análisis de árbol de partición, vecino K más cercano, regresión logística, y análisis discriminante (Figura 2 y 3). La ROC, precisión, sensibilidad, especificidad y MFS en 5 años por K-M del conjunto de entrenamiento para los casos de clase 1 y de clase 2 fueron muy comparables con el método de RBM. Se observó una predicción muy precisa de metástasis, y una MFS en 5 años significativamente diferente entre los casos de la clase 1 y de la clase 2 cuando se usó un árbol de partición (Figura 2A), vecino K más cercano (Figura 2B), regresión logística (Figura 2C), o análisis discriminante (Figura 2D). Las diferencias significativas en la MFS en 5 años también se observaron para los casos de clase 1 y clase 2 de la cohorte de validación mediante el uso de árbol de partición (Figura 3A), vecino K más cercano (Figura 3B), regresión logística (Figura 3C), y análisis discriminante (Figura 3D). Es importante señalar, sin embargo, que la precisión de la predicción para las muestras de validación estuvo por encima del 80 % con todos los métodos excepto el análisis por árbol de partición (Figura 3A), y la sensibilidad, o precisión de la predicción para los casos con eventos metastásicos documentados, fue tan alta como 91 % cuando se usó una regresión logística o análisis discriminante.

Ejemplo 4: Evaluación del efecto del melanoma *in situ* sobre la precisión del conjunto de entrenamiento

Para evaluar el impacto de las muestras de melanoma de etapa 0 *in situ* sobre las capacidades predictivas del conjunto de entrenamiento, lo mismo a) las muestras en etapa 0 se retiraron de todas las cohortes de entrenamiento y validación, lo que generó un nuevo conjunto de entrenamiento de 149 casos; o b) todas las muestras en etapa 0 se incluyeron solo en el conjunto de entrenamiento, lo que generó un conjunto de entrenamiento compuesto de 164 casos. Los nuevos conjuntos de entrenamiento predictivo para el melanoma cutáneo se usaron para entrenar una cohorte de validación de 104 muestras.

La predicción según la máquina con base radial se realizó como se describió anteriormente, y la ROC, la precisión de la predicción, y la MFS en 5 años se evaluaron para los conjuntos de entrenamiento y validación (Figura 4). Las estadísticas del conjunto de entrenamiento para ambos conjuntos de entrenamiento de 149 muestras y de 164 muestras (Figura 4A y 4B) fueron altamente comparables. La ROC fue la más alta para el conjunto de 149 muestras, pero la precisión, la sensibilidad y la especificidad fueron altamente similares en los conjuntos de entrenamiento de 149 y 164 muestras. El análisis de K-M produjo diferencias muy significativas entre las MFS de la clase 1 y la clase 2 con cada conjunto de entrenamiento. El riesgo metastásico de las 104 muestras en la cohorte de validación se predijo con precisión con los conjuntos de entrenamiento de 149 y 164 muestras (Figura 4C y 4D). Ambos conjuntos de validación tuvieron una ROC mayor que 0,9, lo que refleja modelos clínicos de predicción altamente relevantes, y la sensibilidad fue de 83 % y 89 % cuando la predicción de la clase se realizó mediante el uso de los conjuntos de entrenamiento de 149 y 164 muestras, respectivamente. De nuevo, la MFS fue significativamente diferente entre la clase 1 y la clase 2 independientemente de la cohorte del conjunto de entrenamiento usada para predecir el riesgo en el conjunto de validación.

Ejemplo 5: Identificación de firmas de genes discriminantes reducidos con precisión predictiva

La predicción precisa de los casos metastásicos de alto riesgo es extremadamente importante para evitar que aquellos pacientes con probabilidad de metástasis reciban un protocolo de tratamiento de bajo riesgo. Por lo tanto, una medida de éxito para el conjunto de genes predictivos es lograr una sensibilidad mayor que 88 % en ambos conjuntos de entrenamiento y de validación. Como se muestra en la tabla 3 más adelante, y en la Figura 4, la sensibilidad es de 85 % para el conjunto de entrenamiento de 164 muestras y de 89 % para el conjunto de validación de 104 muestras cuando la firma de 28 genes que incorpora todos los genes discriminantes se usa para predecir el riesgo de metástasis. Se generaron conjuntos de genes más pequeños que tenían una sensibilidad igual o aumentada en comparación con la firma de 28 genes (tabla 3, en letras negritas). Sin embargo, la mayoría de los conjuntos de genes que no incluyeron los 28 genes no fueron capaces de producir los umbrales de sensibilidad necesarios para su uso en una prueba de GEP clínicamente factible.

Tabla 3: Sensibilidad, o precisión para predecir un evento metastásico, lograda cuando se usó la firma de 28 genes o subconjuntos más pequeños de genes.

Conjunto de genes	Núm. de variables	Conjuntos de entrenamiento/validación de la sensibilidad (%)
Todos los genes discriminantes	28	89/94
SPP1, CXCL14, BAP1_varB, CLCA2, S100A8, BTG1	6	79/89
TACSTD2, RBM23, PPL, S100A8, MGP, TYRP1	6	86/78
SAP130, ARG1, KRT6B, GJA1, EIF1B, ID2	6	81/81
CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1	6	70/81
ROBO1, CST6, BAP1varB, ID2, SPRR1B, KRT6B	6	75/83
SPRR1B, AQP3, PPL, DSC1, TYRP1, TRIM29	6	81/81
KRT6B, GJA1, AQP3, TRIM29, TYRP1, RBM23, MGP, EIF1B	8	93/94
SPP1, MGP, KRT6B, PPL, RBM23, AQP3, CXCL14, GJA1	8	86/92
BAP1_varB, S100A8, ARG1, S100A9, RBM23, DSC1, TYRP1, CST6	8	77/94
BAP1_varA, BTG1, ARG1, GJA1, EIF1B, TACSTD2, TYRP1, LTA4H	8	74/89
GJA1, ID2, KRT14, ROBO1, RBM23, TRIM29, LTA4H, S100A9	8	70/69
DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, CST6	8	72/86
KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3	8	68/72
BAP1_varA, MGP, SPP1, CXCL14, BAP1_varB, CLCA2, S100A8, BTG1	8	81/83
SAP130, ARG1, KRT6B, GJA1, EIF1B, ID2, EIF1B, S100A9, CRABP2	8	84/81
MGP, SAP130, GJA1, ID2, S100A9, ROBO1, AQP3, LTA4H	8	65/69
SAP130, ARG1, KRT6B, EIF1B, S100A9, KRT14, ROBO1, RBM23, TRIM29, AQP3, TYRP1, CST6	12	91/97
GJA1, PPL, ROBO1, MGP, TRIM29, AQP3, RBM23, TACSTD2, TYRP1, KRT6B, EIF1B, DSC1	12	93/94
CRABP2, TYRP1, PPL, EIF1B, SPRR1B, DSC1, GJA1, AQP3, MGP, RBM23, CLCA2, TRIM29	12	93/89
RBM23, TACSTD2, CRABP2, PPL, GJA1, SPP1, CXCL14, EIF1B, AQP3, MGP, LTA4H, KRT6B	12	91/89
BAP1_varA, SPP1, BAP1_varB, S100A8, SAP130, KRT6B, ID2, S100A9, ROBO1, TACSTD2	12	86/83
BAP1_varA, MGP, S100A8, BTG1, ARG1, S100A9, KRT14, ROBO1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, LTA4H	12	75/75
SPP1, BAP1_varB, CLCA2, SAP130, GJA1, S100A9, RBM23, SPRR1B, TYRP1, BTG1, KRT6B	12	84/89
EIF1B, S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, CST6	12	82/89
CXCL14, BAP1_varB, CLCA2, S100A8, BTG1, SAP130, S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2	12	79/92
MGP, CLCA2, S100A8, ARG1, GJA1, ID2, S100A9, ROBO1, RBM23, SPRR1B, TRIM29, AQP3	12	70/78

Conjunto de genes	Núm. de variables	Conjuntos de entrenamiento/validación de la sensibilidad (%)
S100A8, TACSTD2, BAP1_varA, KRT6B, EIF1B, TRIM29, TYRP1, CST6, PPL, RBM23, AQP3, GJA1, SPRR1B, ARG1	14	91/89
BAP1_varB, CLCA2, BTG1, SAP130, GJA1, ID2, S100A9, CRABP2, RBM23, TACSTD2, DSC1, LTA4H, SPP1, KRT6B	14	86/89
SPP1, CLCA2, S100A8, SAP130, ARG1, ID2, EIF1B, S100A9, KRT14, ROBO1, DSC1, TRIM29, TYRP1, LTA4H	14	86/97
CXCL14, BAP1varB, S100A8, BTG1, ARG1, KRT6B, ID2, EIF1B, CRABP2, KRT14, RBM23, TACSTD2, SPRR1B, TRIM29	14	89/82
BAP1_varA, MGP, SPP1, CXCL14, BAP1_varB, CLCA2, S100A8, BTG1, SAP130, ARG1, KRT6B, GJA1, ID1, EIF1B	14	84/86
S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, CST6	14	82/78
BTG1, SAP130, ARG1, GJA1, EIF1B, CRABP2, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, AQP3, PPL, CST6	14	84/86
BAP1_varA, MGP, BAP1_varB, CLCA2, BTG1, SAP130, GJA1, ID2, S100A9, CRABP2, RBM23, TACSTD2, DSC1, LTA4H	14	72/72
MGP, CXCL14, S100A8, BTG1, ARG1, GJA1, ID2, S100A9, KRT14, ROBO1, TACSTD2, SPRR1B, TRIM29, TYRP1	14	82/86
S100A8, BTG1, SAP130, EIF1B, S100A9, CRABP2, KRT14, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, CST6, BAP1varB, LTA4H	14	79/86
CST6, KRT6B, LTA4H, CLCA2, CRABP2, TRIM29, CXCL14, PPL, ARG1, RBM23, GJA1, AQP3, TYRP1, SPP1, DSC1, TACSTD2, EIF1B, BAP1_varA	18	91/89
MGP, CXCL14, CLCA2, BTG1, ARG1, GJA1, EIF1B, CRABP2, ROBO1, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, CST6	18	81/92
MGP, BAP1_varB, CLCA2, S100A8, BTG1, KRT6B, GJA1, ID2, EIF1B, S100A9, ROBO1, RBM23, TACSTD2, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, SPRR1B	18	81/100

Ejemplo 6: La firma de 28 genes para el melanoma cutáneo predice progresión de un tumor agresivo al SLN, nódulos linfáticos distantes, metástasis en tránsito, metástasis distantes y recurrencia local

- 5 Un total de 29 muestras de nódulo linfático centinela (SNL) positivo, en etapa III, se incluyeron en la población del estudio (17 en el conjunto de entrenamiento y 12 en el conjunto de validación). Estos resultados se muestran a continuación en la tabla 4. La predicción del riesgo por RBM para las muestras de etapa III dio como resultado 25 de 29 casos (86 %) clasificados como alto riesgo, clase 2. Las metástasis más allá del SLN se documentaron para 23 de los 29 casos, y 21 de estos se predijeron como clase 2 por el algoritmo. Los eventos metastásicos localizados en
- 10 nódulos linfáticos distantes se documentaron para 13 casos, 12 (92 %) de los cuales se predijeron con precisión como clase 2. Similarmente, 6 de 7 (86 %) de los casos de metástasis en tránsito se asignaron a la clase 2, lo que indica que la firma predictiva de 28 genes predice con precisión todos los tipos de tumores agresivos de melanoma cutáneo, que incluyen las metástasis SLN positivas, ganglionares distantes, en tránsito, viscerales distantes y recurrencia local.
- 15 Tabla 4: Precisión de la firma de 28 genes de CM para predecir el riesgo metastásico en metástasis en SLN, nódulos linfáticos distantes, en tránsito, y enfermedad recurrente localmente.

	Conjunto de entrenamiento		Conjunto de validación	
	total	denominado clase 2	total	denominado clase 2
Muestras SLN+ (etapa III)	17	14 (82 %)	12	11 (92 %)
evento de met documentado	12	11 (92 %)	11	10 (91 %)

	Conjunto de entrenamiento		Conjunto de validación	
	total	denominado clase 2	total	denominado clase 2
evento de met no documentado	5	3 (60 %)	1	1 (100 %)
metástasis en nódulo linfático distante	6 (2 SLN+)	6 (100 %)	7 (5 SLN+)	6 (86 %)
metástasis en tránsito	3	2 (66 %)	4	4 (100 %)
recurrencia local	9	4* (44 %)	5**	3 (60 %)
*2/4 LR tienen un evento metastásico conocido (ambos denominados clase 2)				
**1/5 LR es etapa III (SLN+) - denominado clase 2				

Ejemplo 7: Comparación estadística de la firma del GEP con factores pronósticos comunes de CM

Se realizó un análisis de regresión de Cox univariado y multivariado para la cohorte de validación de 104 muestras después de la predicción de riesgo de metástasis (tablas 5 y 6). El GEP se comparó con los factores pronósticos individuales que comprenden una etapa patológica según AJCC, incluido el espesor de Breslow, el índice mitótico, y el estado de ulceración, y se comparó, además, directamente con la etapa según AJCC. La etapa según AJCC se analizó como se conoce en la técnica como Etapa IA, IB, IIA frente a IIB, IIC, III, IV para el conjunto de validación completo, y como Etapa IA, IB, IIA frente a IIB, IIC para el análisis que incluyó solo la Etapa I y la II. Por lo tanto, el análisis se realizó con inclusión de todos los casos del conjunto de validación (tabla 5), o con inclusión solo de los casos de etapa I y de etapa II (tabla 6). El análisis de Cox univariado dio como resultado una correlación significativa con la metástasis para todos los factores excepto para el índice mitótico independientemente de si se incluyeron todos los casos del conjunto de validación, o si la inclusión se restringió a los casos de etapa I y II solamente. La comparación del GEP con el espesor de Breslow, la ulceración y el índice mitótico mostraron que el GEP y la ulceración se correlacionaron significativamente con el riesgo de metástasis en un análisis multivariado (HR = 5,0 y 4,2, $p = 0,011$ y $0,001$, respectivamente). La comparación directa con la etapa según AJCC mediante un análisis multivariado indica que ambos factores se correlacionan significativamente con la metástasis (GEP HR=7,5, $p=0,001$; AJCC HR=8,5, $p<0,0001$). Estos resultados indican que la firma de 28 genes es capaz de predecir las metástasis independientemente de la asignación de etapas por TNM según AJCC y otros factores pronósticos.

Tabla 5: Análisis univariado y multivariado de los factores pronósticos del melanoma cutáneo con inclusión de los casos de todas las etapas según AJCC.

Variable	Univariado			Multivariado		
	HR	IC del 95 %	valor de p	HR	IC del 95 %	valor de p
Breslow	138,5	3,3-5754	0,009	13,1	0,2-972,5	0,243
Ulceración	13,4	5,9-30,5	4,00E-07	4,2	1,76-10,1	0,001
Mitótico	2,8	0,9-9,3	0,089	2,0	0,6-6,9	0,288
Prueba de GEP	20,3	7,0-58,9	5,13E-07	5,0	1,4-17,4	0,011
Variable	Univariado			Multivariado		
	HR	IC del 95 %	valor de p	HR	IC del 95 %	valor de p
AJCC	21	8,6-51,4	3,77E-07	8,5	3,2-22,8	2,23E-05
Prueba de GEP	20,3	7,0-58,9	5,13E-07	7,5	2,2-25,2	0,001

Una aplicación clínica importante de la prueba de GEP es identificar pacientes que se han clasificado como de bajo riesgo (etapa clínica I y II) de metástasis, pero que en realidad tienen un alto riesgo de metástasis basado en la firma genómica de sus CM. El análisis de regresión de Cox univariado y multivariado se realizó para estos pacientes en la cohorte de validación de 104 muestras después de la predicción de riesgo de metástasis (tabla 6) que solo tenían CM de etapa clínica I y II. De nuevo, el GEP se comparó con los elementos que comprenden la etapa patológica según AJCC: espesor de Breslow, índice mitótico y estado de ulceración, y directamente con la etapa según AJCC. En el análisis univariado, el espesor de Breslow, el estado de ulceración y la Clase 2 según GEP fueron significativos ($p<0,0003$). Sin embargo, en el análisis multivariado, la Clase 2 según GEP, el espesor de Breslow y la ulceración fueron significativos (cociente de riesgos = 6,1, 20, y 3,9, respectivamente; $p = 0,02$, $0,028$, y $0,011$, respectivamente).

Los análisis univariados para la comparación de la etapa según AJCC con la Clase 2 según GEP mostraron que ambos son estadísticamente significativos, pero la variable de Clase 2 según GEP tuvo un mayor cociente de riesgos que la etapa según AJCC (20,3 frente a 15,2, respectivamente). Los análisis multivariados demostraron que ambos factores eran independientes entre sí ($p=0,002$) pero el cociente de riesgos para la Clase 2 según GEP de nuevo fue mayor que el de la etapa según AJCC (9,6 frente a 5,4). En conjunto, estas dos tablas de resultados (tabla 5 y 6) indican que la firma de 28 genes predice las metástasis independientemente de la asignación de etapas por TNM según AJCC y otros factores pronósticos en pacientes de todas las etapas (I, II, III y IV).

Tabla 6: Análisis univariado y multivariado de los factores pronósticos del melanoma cutáneo con inclusión de casos de las etapas I y II según AJCC.

Variable	Univariado			Multivariado		
	HR	IC del 95 %	valor de p	HR	IC del 95 %	valor de p
Breslow	165,6	10,7-2559	0,0003	20	1,4-303	0,028
Ulceración	13,1	4,8-35,6	8,1E-07	3,9	1,4-10,9	0,011
Mitótico	1,7	0,5-5,8	0,407	1,4	0,4-5,2	0,595
Prueba de GEP	20,3	5,8-70,8	2,9E-06	6,1	1,3-27,6	0,020
Variable	Univariado			Multivariado		
	HR	IC del 95 %	valor de p	HR	IC del 95 %	valor de p
AJCC	15,2	5,8-39,7	6,0E-07	5,4	1,8-15,7	0,002
Prueba de GEP	20,3	5,8-70,8	2,9E-06	9,6	2,3-39,5	0,002

Ejemplo 8: La firma de 28 genes para melanoma cutáneo predice las metástasis en patrones de crecimiento de dispersión superficial y nodular

De los cuatro patrones de crecimiento descritos para los tumores de CM, la dispersión superficial es el más prevalente, y biológicamente distinto de los melanomas nodulares.¹³ El análisis de máquina con base radial de los tumores de dispersión superficial dentro de la cohorte ($n=128$) dio como resultado una clasificación muy precisa de los tumores metastásicos y no metastásicos (Figura 5A). El análisis de MFS por K-M muestra que los casos predichos como clase 1 tienen una tasa libre de metástasis en 5 años de 100 %, mientras que los casos de alto riesgo de clase 2 tienen solo una tasa de MFS de 5 %. Adicionalmente, una ROC=1,00 refleja una precisión de 100 % de la predicción para los tumores de dispersión superficial. La firma genética es capaz, además, de predecir el potencial metastásico para los tumores de CM de tipo nodular (Figura 5B). La tasa de MFS por K-M es de 81 % para los casos de la clase 1, en comparación con 7 % para los casos de la clase 2 ($p<0,0001$). La precisión del modelo predicho fue alta, como se evidencia por ROC = 0,9323, precisión de 82 %, y sensibilidad de 81 %. Estos resultados indican que la firma genética tiene una alta precisión para predecir la enfermedad de dispersión superficial y menor precisión para predecir la enfermedad nodular.

Ejemplo 9: Métodos trimodales y lineales para predecir el riesgo de metástasis de acuerdo con el GEP

Aunque un enfoque bimodal (bajo riesgo Clase 1 vs alto riesgo Clase 2) puede ser la salida de informe clínico preferida, otros análisis sugieren que el enfoque trimodal o lineal puede ser clínicamente adecuado. Un análisis mediante el uso de un enfoque trimodal demostró un resultado de estratificación relacionado con el riesgo de metástasis. Específicamente, el desarrollo de una salida trimodal de Clase A (riesgo bajo), Clase B (riesgo medio) y Clase C (riesgo alto) muestra un aumento graduado en el riesgo de metástasis (Figura 6). El análisis muestra que la MFS en 5 años para el conjunto de validación independiente de 104 muestras es de 98 % para la clase A en comparación con 79 % para la clase B y 30 % para la clase C ($p<0,0001$), con una tasa de 64 % en la cohorte en general, que refleja modelos clínicamente valiosos.

La probabilidad de la predicción del riesgo de metástasis se basa en los coeficientes de las 28 variables (genes) y se informa como un valor entre 0 y 1. Para el análisis de dos clases, los casos con una puntuación de probabilidad entre 0 y 0,5 se designan como casos de bajo riesgo, de clase 1. Por el contrario, los casos con una puntuación de probabilidad entre 0,5 y 1,0 se clasifican como clase 2, de alto riesgo. La salida lineal de la puntuación de probabilidad puede usarse, además, directamente para evaluar el riesgo asociado con la firma genética de un tumor de CM en particular. Como se muestra en la Figura 7, la MFS en 5 años de los casos en la cohorte de validación de 104 muestras se correlaciona fuertemente con la probabilidad de metástasis. La evaluación de todos los casos con una probabilidad de metástasis menor que 0,299 muestra que ninguno de esos casos había tenido un evento metastásico documentado hasta la fecha, y la MFS en 5 años es de 100 %. Cuatro de los 29 casos que caen entre las puntuaciones de probabilidad de 0,3 y 0,499 tienen evidencia de un evento metastásico, y la MFS en 5 años para este grupo es mayor

que 92 %. Los casos con puntuaciones de probabilidad entre 0,5 y 1,0 tienen una reducción significativa en la MFS en 5 años. Como se ilustra por las curvas F-J en la Figura 7, aumentos crecientes de 0,1 en la puntuación de probabilidad conducen a reducciones correspondientes en la MFS en 5 años de 50 % a 45 %, 33 %, 25 %, y 10 %. Por lo tanto, la utilidad de la firma predictiva de 28 genes subyace tanto en la asignación de clases del riesgo de metástasis y la correlación lineal de la probabilidad con el resultado de metástasis.

Ejemplo 10: Predicción de la supervivencia libre de metástasis distantes (DMFS) y la supervivencia general (OS) mediante el uso de la firma pronóstica del GEP.

Los estudios de validación iniciales para probar la precisión pronóstica de la firma de 28 genes y el conjunto de entrenamiento clínicamente útil usaron la supervivencia libre de metástasis (MFS) como el criterio de valoración para el análisis de los datos. La MFS refleja la progresión de la enfermedad ya sea a sitios regionales (que incluyen el nódulo linfático centinela) y/o distantes de la dispersión del melanoma. La evaluación de los criterios de valoración de la DMFS (tiempo hasta la dispersión más allá de la cuenca del nódulo linfático centinela) y la OS (tiempo hasta la muerte) indica que la firma del GEP tiene capacidades pronósticas precisas para predecir ambos criterios de valoración (Figura 8). El análisis de Kaplan-Meier se realizó para comparar MFS, DMFS y OS en dos conjuntos de validación relacionados, el primero consistió en 104 casos de CM que incluyeron melanomas en Etapas I-IV (Figura 8A-C), y un segundo subconjunto más pequeño de 78 casos de CM que incluyeron solo melanomas en Etapa I y Etapa II (Figura 8D-F).

La DMFS se determinó para la firma del GEP, y los resultados se compararon con el espesor de Breslow, la ulceración y el índice mitótico, tres factores T clínicos evaluados comúnmente para determinar la etapa según AJCC para cada paciente de CM (Figura 9). La DMFS se agrupa mediante la asignación de la clase según GEP (Figura 9A), el espesor de Breslow mayor o menor que 0,75 mm (Figura 9B), la presencia o ausencia de ulceración (Figura 9C), o el índice mitótico mayor o menor que 1/mm² (Figura 9D). La comparación indica que la firma del GEP tiene una precisión pronóstica mejor que los factores clínicos recomendados actualmente, o comparable con ellos, para la evaluación clínica del riesgo del paciente de CM.

Ejemplo 11: Comparación de la firma pronóstica del GEP con la biopsia de nódulo linfático centinela para predecir metástasis regionales y distantes.

De un total de 217 muestras de tumores de melanoma de pacientes que se sometieron a una biopsia de nódulo linfático centinela (SLNB) se obtuvo el perfil de expresión génica con la firma de 28 genes para clasificar los casos de acuerdo con el riesgo. Un total de 58 pacientes tuvieron un resultado de SLNB positiva mientras que 159 pacientes tuvieron un resultado de SLNB negativa (tabla 7). Un total de 37 de 58 pacientes (64 %) con SLNB positiva desarrollaron metástasis y 19 de los 58 pacientes (33 %) murieron de su enfermedad. Entre los pacientes con SLNB negativa 70 de 159 (44 %) desarrollaron metástasis y 46 finalmente murieron de su enfermedad. Los parámetros de la asignación de etapas según AJCC, de los pacientes con SLNB positiva y negativa se resumen en la tabla 7. El PPV (valor predictivo positivo) de SLNB para metástasis fue de 64 % mientras que el NPV (valor predictivo negativo) de SLNB para metástasis fue de 56 % (tabla 8).

Tabla 7: Datos demográficos iniciales de los pacientes en la cohorte del estudio que se sometió a un procedimiento de SLNB.

Características clínicas	SLN positivo (n=58)	SLN negativo (n=159)
Mediana de la edad (intervalo)	57 (23-94)	63 (31-89)
Mets regionales/distantes	37	70
Etapas según AJCC		
I	n/a	46
II	n/a	112
III	58	0
IV	n/a	1
Espesor de Breslow		
Mediana (intervalo)	4,0 (0,8-16)	2,3 (0,4-14)
≤ 1 mm	4	27
> 1mm	51	132
Índice mitótico		
< 1/mm ²	2	44

Características clínicas	SLN positivo (n=58)	SLN negativo (n=159)
≥ 1/mm2	48	100
Ulceración		
ausente	20	93
presente	33	58

Tabla 8: Valores predictivos positivos y predictivos negativos para las herramientas pronósticas SLNB y GEP.

Herramienta pronóstica	PPV,% (IC del 95 %)	NPV,% (IC del 95 %)
SLNB	64 (50 - 75)	56 (48 - 64)
GEP	65 (56 - 72)	79 (68 - 87)

La Figura 10 muestra las curvas de KM para la supervivencia libre de metástasis (MFS) y la supervivencia general (OS) para los pacientes con SLNB negativa y los pacientes con SLNB positiva. Los valores de p respectivos para la diferencia entre las curvas para los pacientes con SLNB positiva y SLNB negativa fueron $<0,0001$ y $<0,006$.

Entre los 217 pacientes de melanoma, 141 tuvieron un resultado de alto riesgo Clase 2 según GEP mientras que 76 tuvieron un resultado de bajo riesgo Clase 1. Noventa y uno de los 141 pacientes Clase 2 (65 %) desarrollaron enfermedad metastásica mientras que 55 murieron de la enfermedad. Dieciséis de 76 pacientes (21 %) en la clase 1 desarrollaron enfermedad metastásica y 10 de 76 (13 %) murieron de la enfermedad. El PPV de la prueba de GEP para metástasis fue de 65 % y el NPV fue de 79 %. La Figura 11 muestra la curva de KM para MFS y OS para la clasificación de los pacientes según GEP. Los valores de p respectivos para la diferencia entre las curvas para los pacientes de Clase 1 y clase 2 según GEP fueron $<0,0001$ para ambos análisis. La OS en 5 años para todos los pacientes con SLNB positiva fue de 62 % en comparación con 54 % para los casos con una puntuación de Clase 2 según GEP. La OS en 5 años para todos los casos con SLNB negativa fue de 70 %, en comparación con 89 % para todos los casos con una puntuación de Clase 1 según GEP.

Hubo una diferencia estadísticamente significativa en los análisis univariado y multivariado de un resultado de SLNB positiva (en comparación con SLNB negativa) y la puntuación de la Clase 2 según GEP (en comparación con la Clase 1 según GEP) cuando se comparan los grupos metastásicos y no metastásicos con regresión de Cox (tabla 9). Los valores de p respectivos para el análisis multivariado fueron $<0,008$ y $<3,1 \times 10^{-5}$. De manera similar, tanto el resultado de SLNB como la puntuación según GEP fueron estadísticamente significativos cuando se compararon los casos con muerte por la enfermedad frente a todos los otros con análisis de regresión de Cox en análisis univariado. Los valores de p respectivos fueron $<0,007$ y $<1,9 \times 10^{-6}$. Por el contrario, en el análisis multivariado solo la puntuación según GEP fue estadísticamente significativa con un valor de p de $<5,2 \times 10^{-6}$.

Tabla 9: Valores predictivos positivos y predictivos negativos para las herramientas pronósticas SLNB y GEP.

	Variable	Univariado			Multivariado		
		HR	IC del 95 %	valor de p	HR	IC del 95 %	valor de p
MFS	Clase 2 según GEP	5,5	3,2-9,4	4,0E-07	4,9	2,9-8,6	3,1E-05
	SLN+	2,4	1,6-3,6	2,6E-05	1,7	1,2-2,6	0,008
OS	Clase 2 según GEP	5,4	2,7-10,8	1,9E-06	5,1	2,5-10,2	5,2E-06
	SLN+	2,1	1,2-3,6	0,007	1,6	0,9-2,8	0,092

La Figura 12 ilustra que el uso de la clasificación por GEP en combinación con el estado de SLNB mejora adicionalmente el pronóstico. La MFS en 5 años en general y la OS en 5 años para los pacientes de clase 1 es de 79 % y 89 %, respectivamente, y para los pacientes con SLNB negativa es de 55 % y 70 %, respectivamente. El 31 % de los pacientes con una Clase 1 según GEP y un resultado de SLNB negativa tuvieron una MFS en 5 años en general y una OS en 5 años de 83 % y 91 %, respectivamente. La MFS en 5 años en general y la OS en 5 años para los pacientes de clase 2 según GEP es de 34 % y 54 % respectivamente y para los pacientes con SLNB positiva es de 37 % y 62 %. El 23 % de los pacientes con una Clase 2 según GEP y una SLNB positiva tuvieron una MFS en 5 años en general y OS en 5 años de 33 % y 57 %. Para el 42 % de los pacientes con una Clase 2 según GEP, pero resultado de SLNB negativa, la MFS en 5 años y la OS en 5 años fueron de 35 % y 54 %, respectivamente, similar a los pacientes que eran de Clase 2 con un resultado de SLNB positiva. Solo se identificó una pequeña cohorte de 9 pacientes (que representan el 4 %) con una puntuación de Clase 1 según GEP, pero con resultado de SLNB positiva. La MFS en 5 años en general y la OS en 5 años para este grupo fue de 53 % y 78 %, respectivamente. Los valores de p respectivos para la diferencia entre los cuatro grupos de GEP y SLNB combinados fueron $<0,0001$ para ambos análisis de MFS y OS.

La predicción de MFS y DMFS cuando se combinó el resultado de la clase según GEP con la SLNB se muestra en la Figura 13. Los casos con resultados Clase 1/SLN- continúan mostrando el riesgo más bajo de metástasis distantes, con tasas de DMFS en 5 años de 86 %. Por el contrario, los casos de clase 2/ SLN+ tienen el riesgo más alto de desarrollar una enfermedad distante, y tienen una tasa de DMFS de 42 %. Como se muestra en la Figura 14, la adición de la firma del GEP a la asignación de etapas según AJCC proporcionó un rendimiento quirúrgico de 35 % (49/141) en comparación con 27 % (58/217) con asignación de etapas según AJCC solamente. Se observó además una ventaja pronóstica para el GEP, ya que el procedimiento de SLNB (C) identificó 37/107 casos (sensibilidad = 35 %) con un evento metastásico documentado, mientras que la adición de GEP a SLNB (D) identificó 91/107 casos (sensibilidad = 85 %) con un evento metastásico documentado.

Los encabezamientos de sección usados en la presente descripción son sólo para propósitos de organización y no se deben interpretar como limitativos de la materia descrita.

Referencias

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:10-29.
2. Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, y otros, Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 2001;19:3622-34.
3. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, y otros, Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 2009;27:6199-206.
4. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, y otros, Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001;19:3635-48.
5. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1471-4.
6. Takeuchi H, Morton DL, Kuo C, y otros, Prognostic significance of molecular upstaging of paraffin-embedded sentinel lymph nodes in melanoma patients. *J Clin Oncol* 2004;22:2671-80.
7. Zettersten E, Shaikh L, Ramirez R, Kashani-Sabet M. Prognostic factors in primary cutaneous melanoma. *Surg Clin North Am* 2003;83:61-75.
8. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, y otros, Multivariate analysis of prognostic factors among 2,313 patients with stage III melanoma: comparison of nodal micrometastases versus macrometastases. *J Clin Oncol* 2010;28:2452-9.
9. Yee VS, Thompson JF, McKinnon JG, y otros, Outcome in 846 cutaneous melanoma patients from a single center after a negative sentinel node biopsy. *Ann Surg Oncol* 2005;12:429-39.
10. Karim RZ, Scolyer RA, Li W, y otros, False negative sentinel lymph node biopsies in melanoma may result from deficiencies in nuclear medicine, surgery, or pathology. *Ann Surg* 2008;247:1003-10.
11. Nicholl MB, Elashoff D, Takeuchi H, Morton DL, Hoon DS. Molecular upstaging based on paraffin-embedded sentinel lymph nodes: ten-year follow-up confirms prognostic utility in melanoma patients. *Ann Surg* 2011;253:116-22.
12. Coit DG. Melanoma Version 2.2013: National Comprehensive Cancer Network; 2013 2/2013.
13. Morton DL. Overview and update of the phase III Multicenter Selective Lymphadenectomy Trials (MSLT-I and MSLT-II) in melanoma. *Clin Exp Metastasis* 2012;29:699-706.
14. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* 2004;64:7205-9.
15. Francis P, Namlos HM, Muller C, y otros, Diagnostic and prognostic gene expression signatures in 177 soft tissue sarcomas: hypoxia-induced transcription profile signifies metastatic potential. *BMC Genomics* 2007;8:73.
16. Paik S, Shak S, Tang G, y otros, A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.
17. Colman H, Zhang L, Sulman EP, y otros, A multigene predictor of outcome in glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010;12:49-57.
18. Gordon GJ, Jensen RV, Hsiao LL, y otros, Using gene expression ratios to predict outcome among patients with mesothelioma. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:598-605.
19. Sato T. Locoregional management of hepatic metastasis from primary uveal melanoma. *Semin Oncol* 2010;37:127-38.
20. Onken MD, Worley LA, Tuscan MD, Harbour JW. An accurate, clinically feasible multi-gene expression assay for predicting metastasis in uveal melanoma. *J Mol Diagn* 2010;12:461-8.
21. Onken MD, Worley LA, Char DH, y otros, Collaborative Ocular Oncology Group Report Number 1: Prospective Validation of a Multi-Gene Prognostic Assay in Uveal Melanoma. *Ophthalmology* 2012.
22. Jaeger J, Koczan D, Thiesen HJ, y otros, Gene expression signatures for tumor progression, tumor subtype, and tumor thickness in laser-microdissected melanoma tissues. *Clin Cancer Res* 2007;13:806-15.
23. Bittner M, Meltzer P, Chen Y, y otros, Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature* 2000;406:536-40.
24. Haqq C, Nosrati M, Sudilovsky D, y otros, The gene expression signatures of melanoma progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:6092-7.
25. Mauzer A, Roesch A, Hafner C, y otros, Identification of new genes associated with melanoma. *Exp Dermatol* 2011;20:502-7.

26. Scatolini M, Grand MM, Grosso E, y otros, Altered molecular pathways in melanocytic lesions. *Int J Cancer* 2010;126:1869-81.
27. Smith AP, Hoek K, Becker D. Whole-genome expression profiling of the melanoma progression pathway reveals marked molecular differences between nevi/melanoma in situ and advanced-stage melanomas. *Cancer Biol Ther* 2005;4:1018-29.
28. Weeraratna AT, Becker D, Carr KM, y otros, Generation and analysis of melanoma SAGE libraries: SAGE advice on the melanoma transcriptome. *Oncogene* 2004;23:2264-74.
29. Winnepenninckx V, Lazar V, Michiels S, y otros, Gene expression profiling of primary cutaneous melanoma and clinical outcome. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:472-82.

10

REIVINDICACIONES

1. Un método para predecir el riesgo de metástasis, supervivencia general, o ambos, en un paciente con un tumor de melanoma cutáneo primario, el método comprende:

(a) medir los niveles de expresión génica de al menos ocho genes seleccionados de BAP1_varA, BAP1_varB, MGP, SPP1, CXCL14, CLCA2, S100A8, BTG1, SAP130, ARG1, KRT6B, GJA1, ID2, EIF1B, S100A9, CRABP2, KRT14, ROBO1, RBM23, TACSTD2, DSC1, SPRR1B, TRIM29, AQP3, TYRP1, PPL, LTA4H, y CST6, en una muestra del tumor de melanoma cutáneo primario,

en donde los al menos ocho genes son:

MGP, CXCL14, S100A8, BTG1, ARG1, GJA1, ID2, S100A9, KRT14, ROBO1, TACSTD2, SPRR1B, TRIM29, y TYRP1; en donde medir los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes comprende la medición de un nivel de fluorescencia mediante un sistema de detección de secuencias después de una RT-PCR de los al menos ocho genes;

(b) determinar una firma del perfil de expresión génica del paciente que comprende los niveles de expresión génica de los al menos ocho genes;

(c) comparar la firma del perfil de expresión génica del paciente con un perfil de expresión génica de un conjunto de entrenamiento predictivo; y

(d) proporcionar una indicación como un riesgo de metástasis, supervivencia general o ambos para el tumor de melanoma cutáneo primario cuando el perfil de expresión génica del paciente indica que los niveles de expresión de al menos los ocho genes están alterados de una manera predictiva en comparación con el perfil de expresión génica del conjunto de entrenamiento predictivo.

2. El método de la reivindicación 1, en donde el riesgo de metástasis para el tumor de melanoma cutáneo primario se clasifica desde un bajo riesgo de metástasis a un alto riesgo de metástasis.

3. El método de la reivindicación 2, en donde la clase 1 indica un bajo riesgo de metástasis, la clase 2 indica un alto riesgo de metástasis, la clase A indica un bajo riesgo de metástasis, la clase B indica un riesgo intermedio de metástasis y la clase C indica un alto riesgo de metástasis.

4. El método de la reivindicación 1, que comprende, además, determinar que el tumor de melanoma cutáneo primario tiene un riesgo de metástasis aumentado o supervivencia general disminuida mediante la combinación con al menos uno del estado de TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis), la asignación de etapas clínicas establecidas por el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC) para asignar una etapa al tumor de melanoma cutáneo primario, y el estado de la biopsia de nódulo linfático centinela.

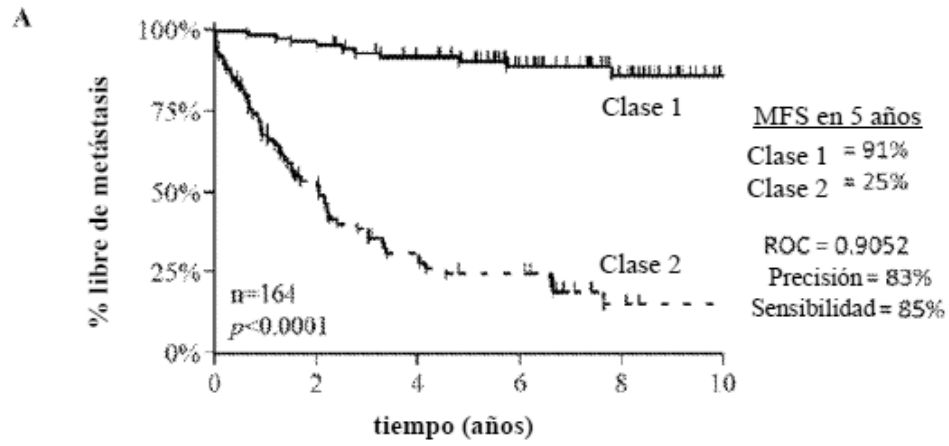
5. El método de la reivindicación 1, en donde una biopsia de nódulo linfático centinela se realizó en el paciente a partir de la cual se obtuvo separadamente el tumor de melanoma cutáneo primario.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la biopsia de nódulo linfático centinela fue negativa.

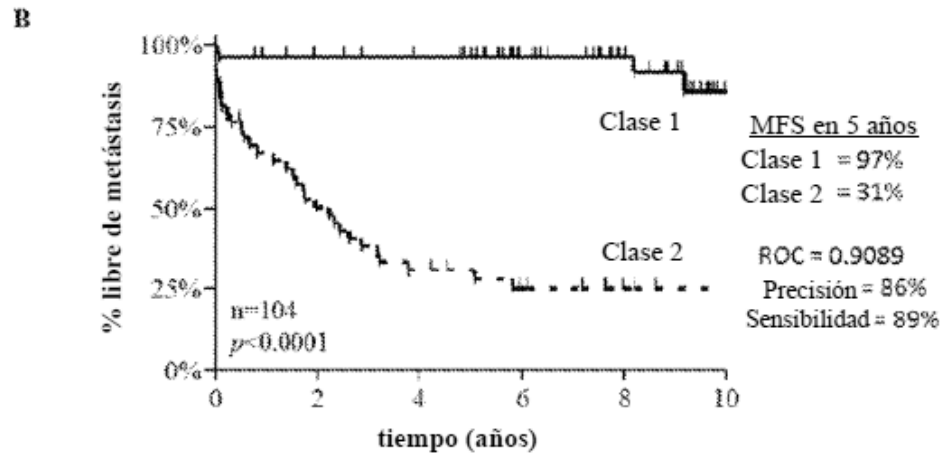
7. El método de la reivindicación 1, en donde el tumor de melanoma cutáneo primario se toma a partir de una muestra por extirpación local amplia, fijada en formalina, embebida en parafina.

8. El método de la reivindicación 1, en donde el tumor de melanoma cutáneo primario se toma a partir de una muestra de biopsia, fijada en formalina, embebida en parafina, seleccionada de una biopsia por perforación, una biopsia por cuchilla y otro método de biopsia.

Figura 1



año	0	2	4	6	8	10
en riesgo (Clase 1)	88	85	74	51	31	11
en riesgo (Clase 2)	76	38	21	16	5	2



año	0	2	4	6	8	10
en riesgo (Clase 1)	61	56	53	38	23	5
en riesgo (Clase 2)	43	22	14	9	4	2

Figura 2

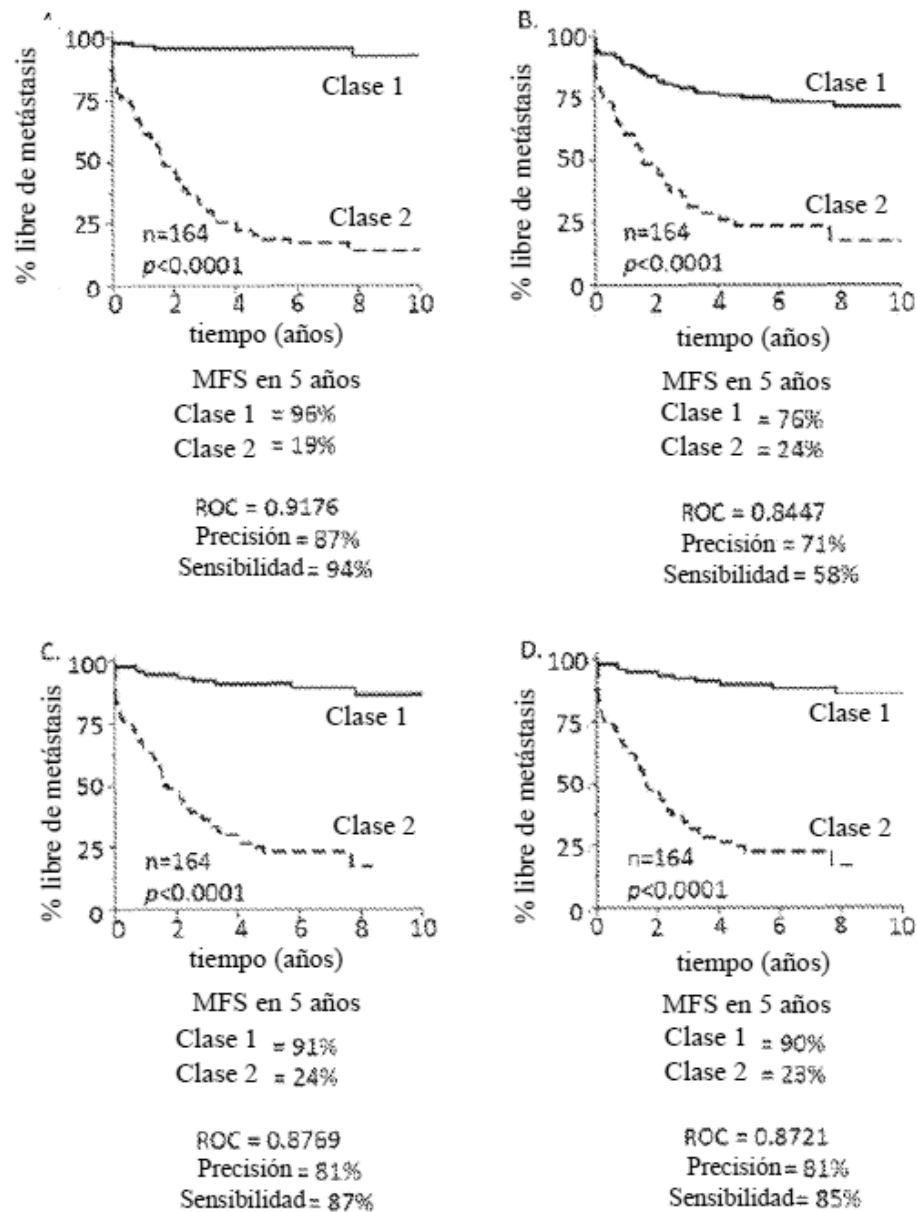


Figura 3

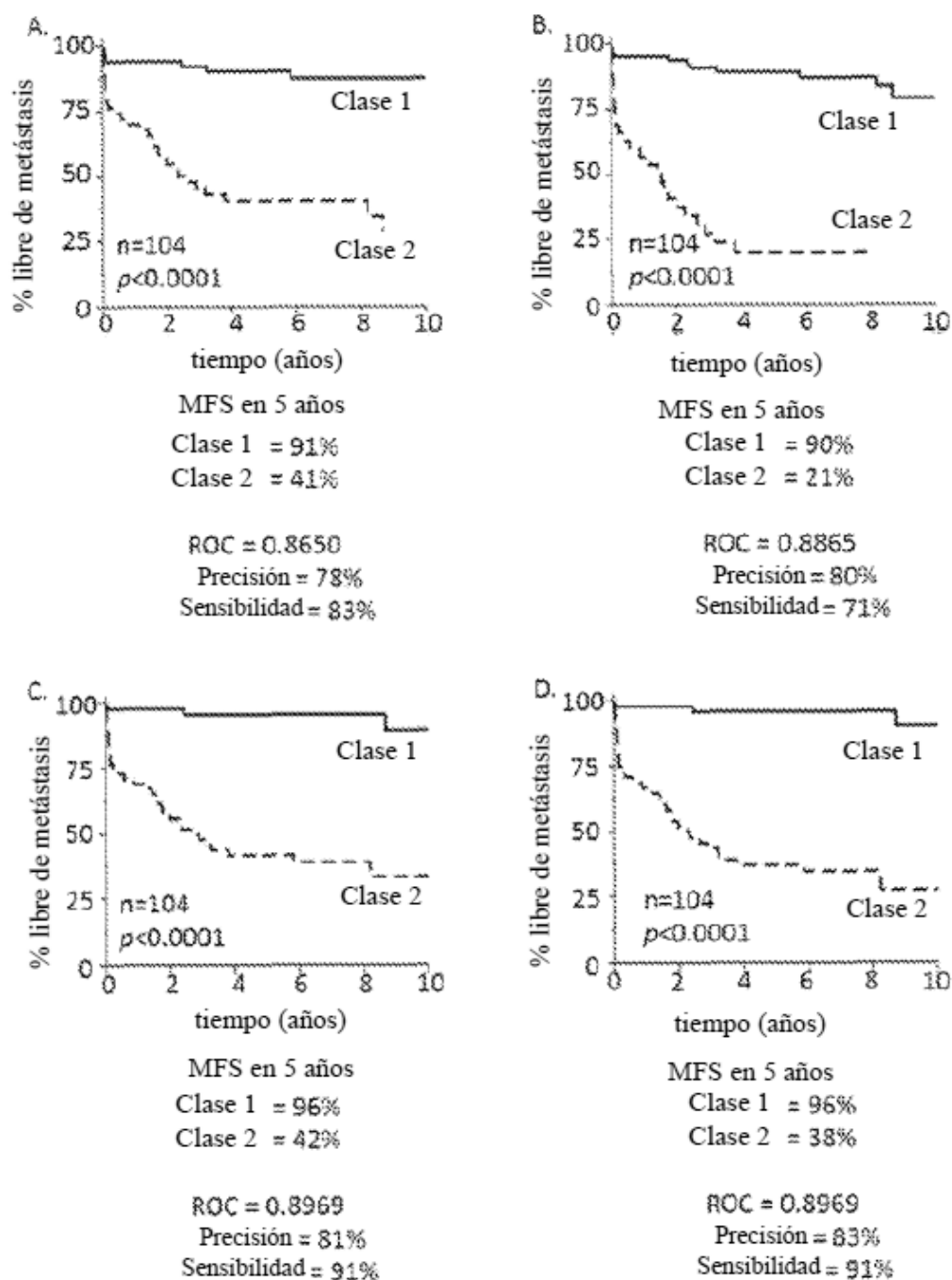


Figura 4

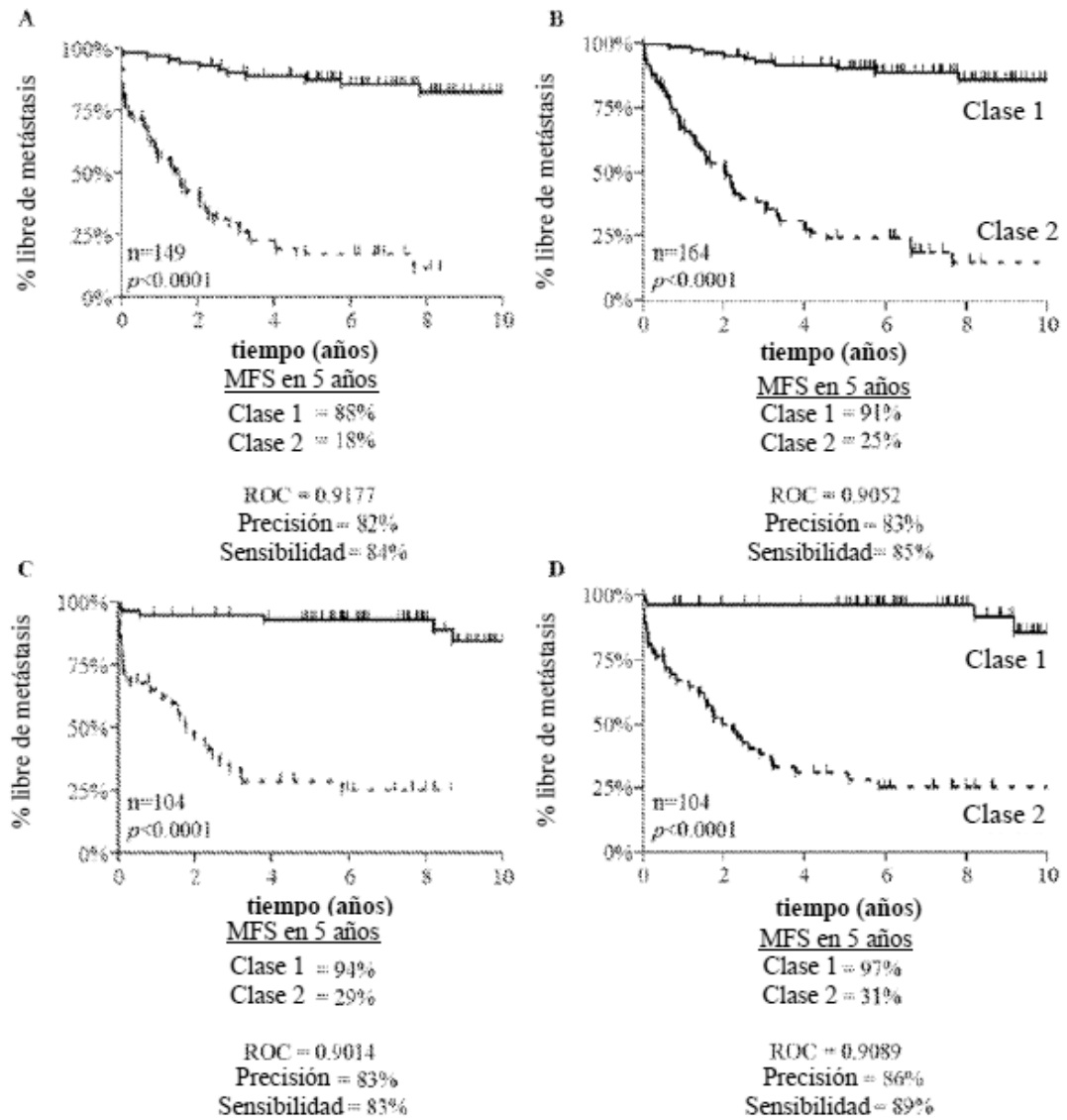


Figura 5

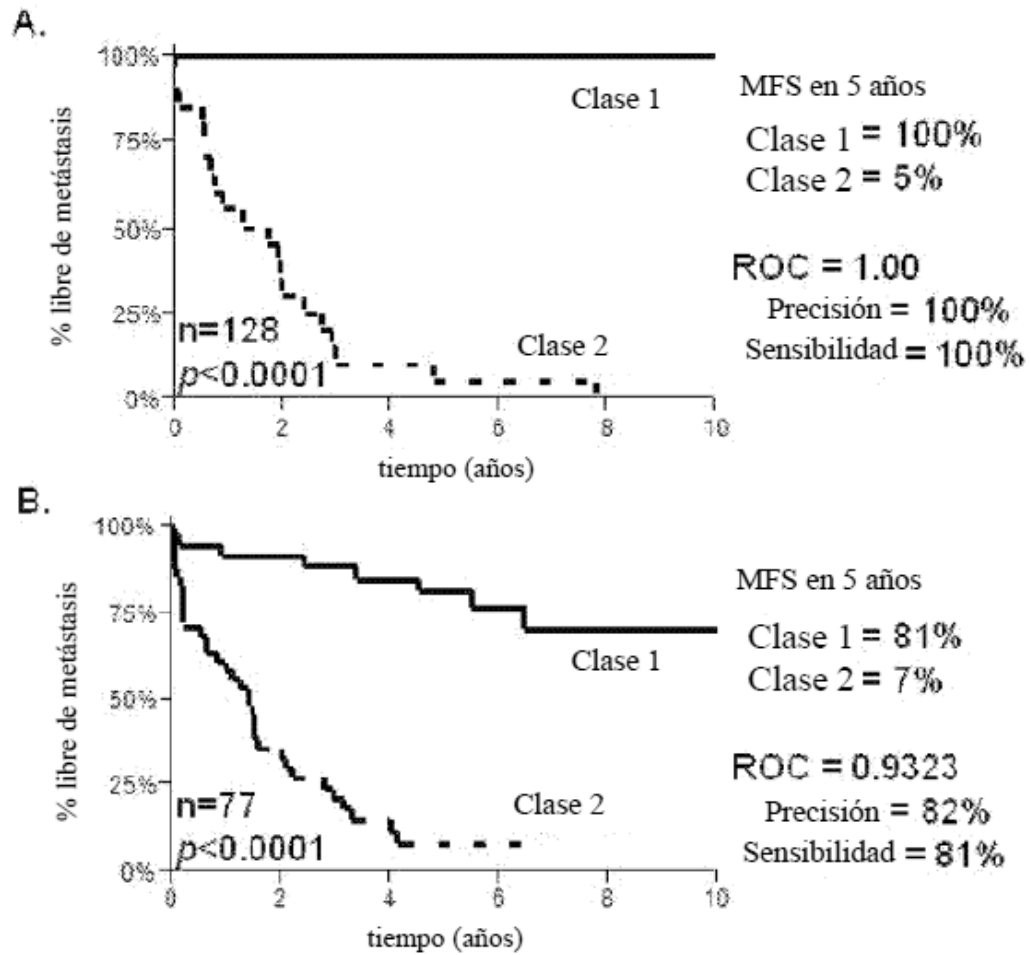


Figura 6

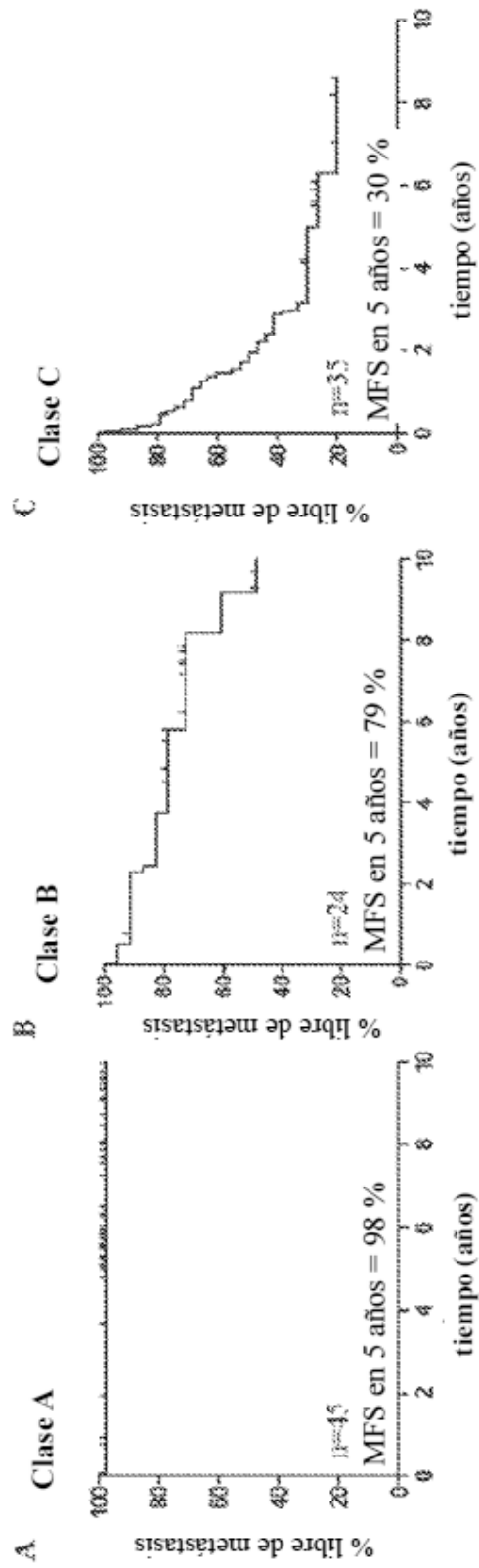


Figura 7

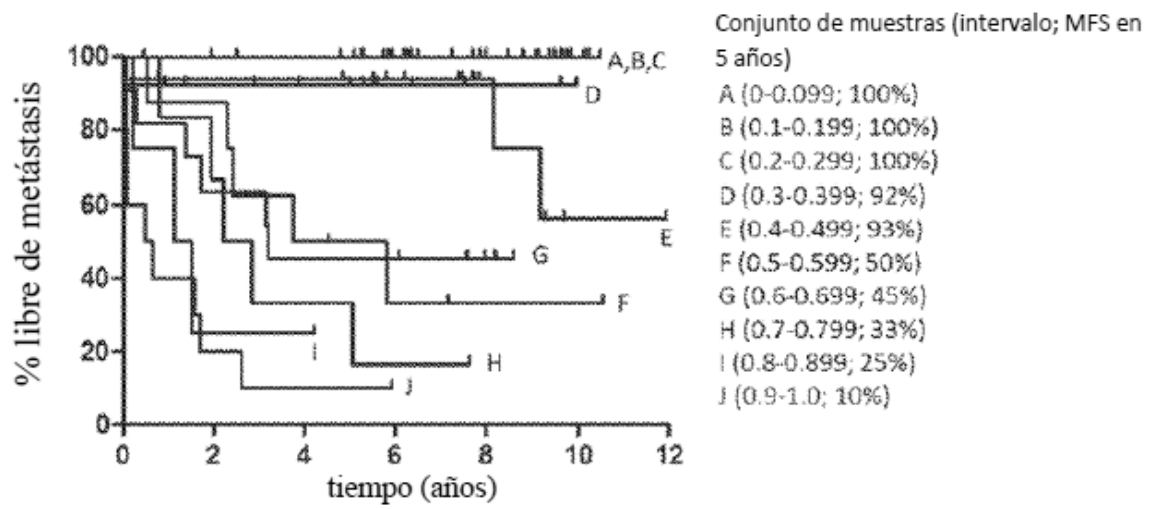
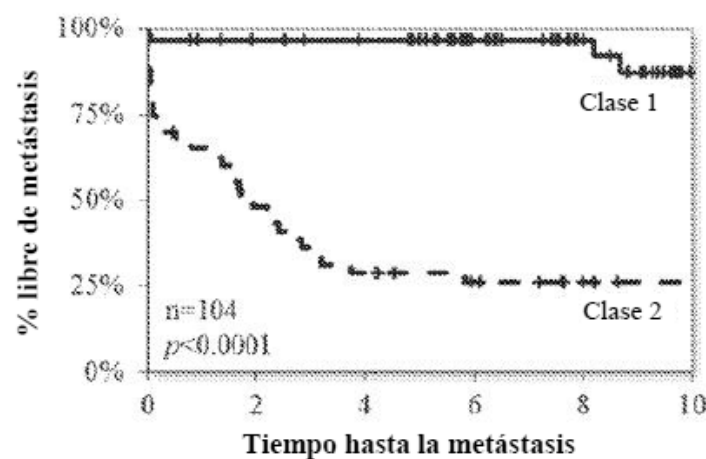


Figura 8

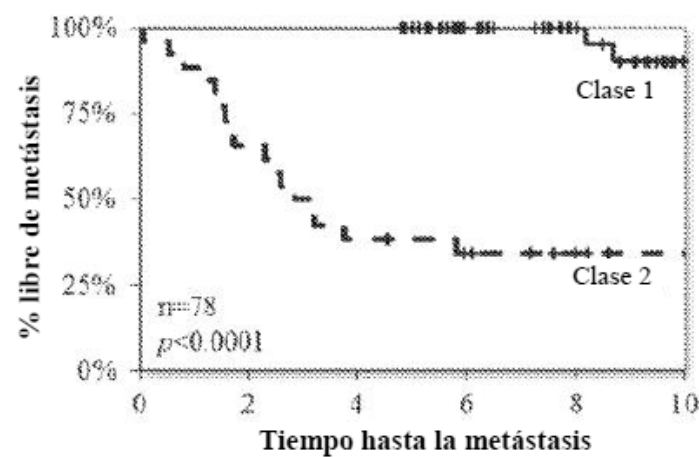
Supervivencia libre de metástasis

A



año	0	2	4	6	8	10	Eventos observados
en riesgo (Clase 1)	61	56	53	38	23	5	4
en riesgo (Clase 2)	43	21	13	9	4	2	31

B

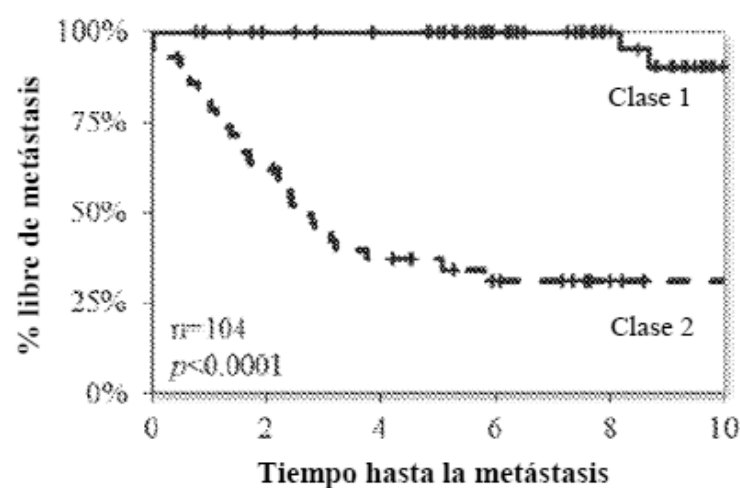


año	0	2	4	6	8	10	Eventos observados
en riesgo (Clase 1)	52	52	52	38	23	5	2
en riesgo (Clase 2)	26	18	11	8	4	2	17

Figura 8 (continuación)

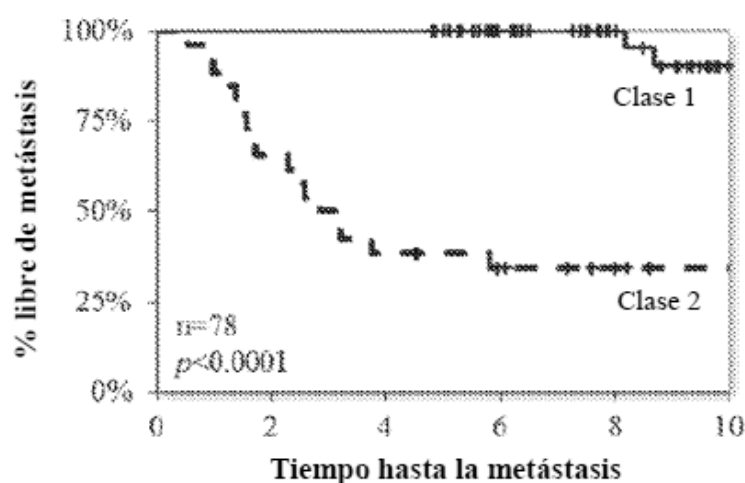
Supervivencia libre de metástasis distantes

C



año	0	2	4	6	8	10	Eventos observados
en riesgo (Clase 1)	61	57	54	38	23	5	2
en riesgo (Clase 2)	43	27	16	10	4	2	28

D

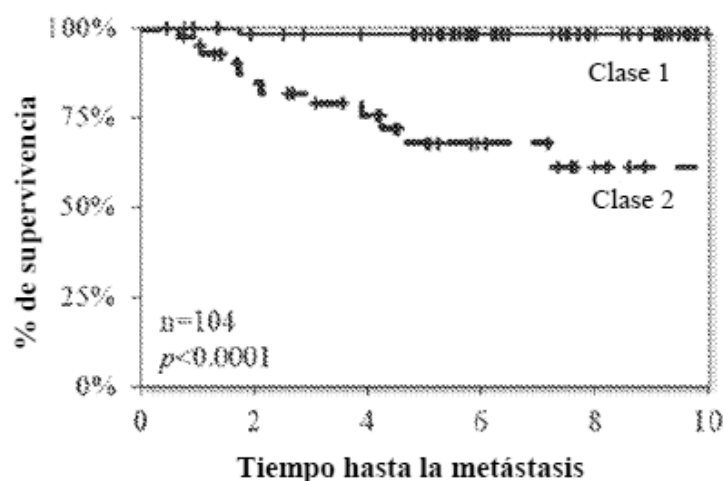


año	0	2	4	6	8	10	Eventos observados
en riesgo (Clase 1)	52	52	52	38	23	5	2
en riesgo (Clase 2)	26	18	11	8	4	2	17

Figura 8 (continuación)

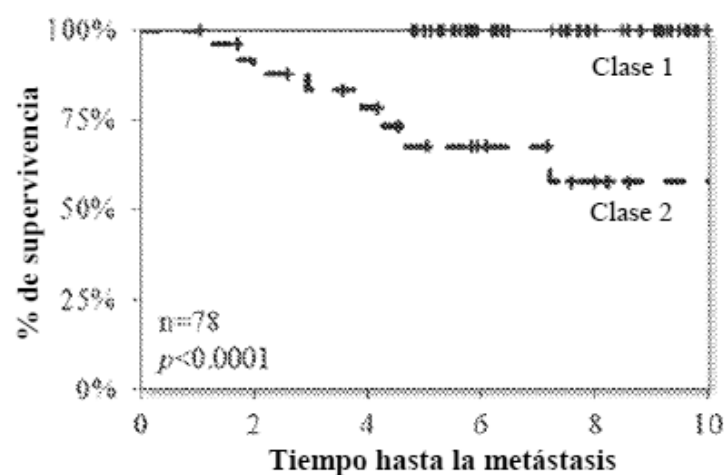
Supervivencia general

E



año	0	2	4	6	8	10	Eventos observados
en riesgo (Clase 1)	61	57	54	38	23	5	1
en riesgo (Clase 2)	43	32	24	13	6	2	12

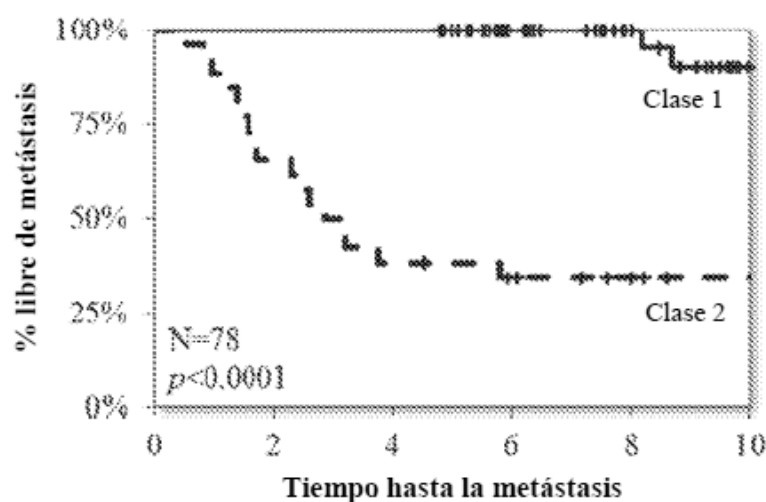
F



año	0	2	4	6	8	10	Eventos observados
en riesgo (Clase 1)	52	52	52	38	23	5	0
en riesgo (Clase 2)	26	22	17	10	5	2	8

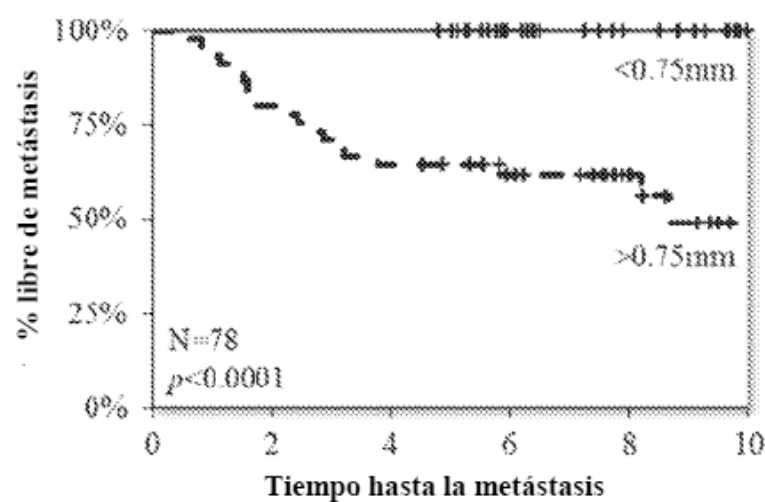
Figura 9

A



año	0	2	4	6	8	10
en riesgo (Clase 1)	52	52	52	38	23	5
en riesgo (Clase 2)	26	18	11	8	4	2

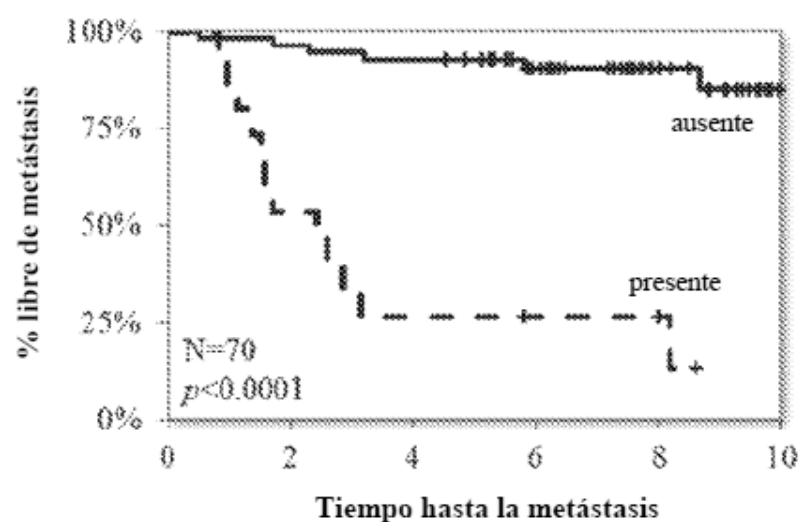
B



año	0	2	4	6	8	10
en riesgo (<0.75mm)	33	33	33	23	14	3
en riesgo (>0.75mm)	45	37	30	23	13	4

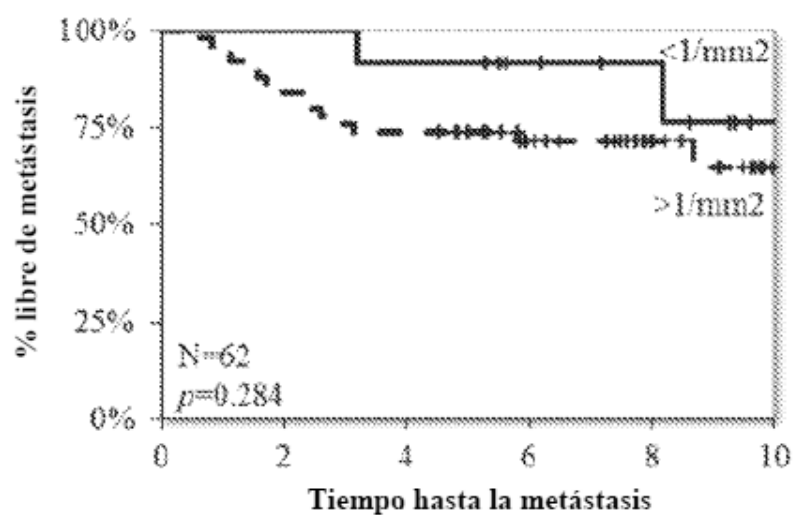
Figura 9 (continuación)

C



año	0	2	4	6	8	10
en riesgo (ausente)	55	54	52	38	21	5
en riesgo (presente)	15	9	5	4	3	1

D



año	0	2	4	6	8	10
en riesgo (<1/mm2)	12	12	12	9	7	2
en riesgo (>1/mm2)	50	43	38	27	15	3

Figura 10

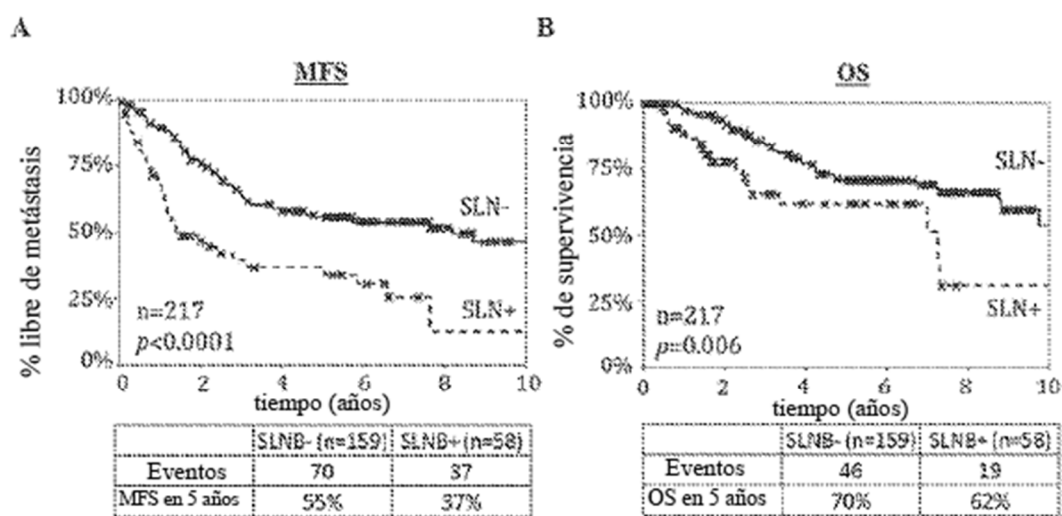


Figura 11

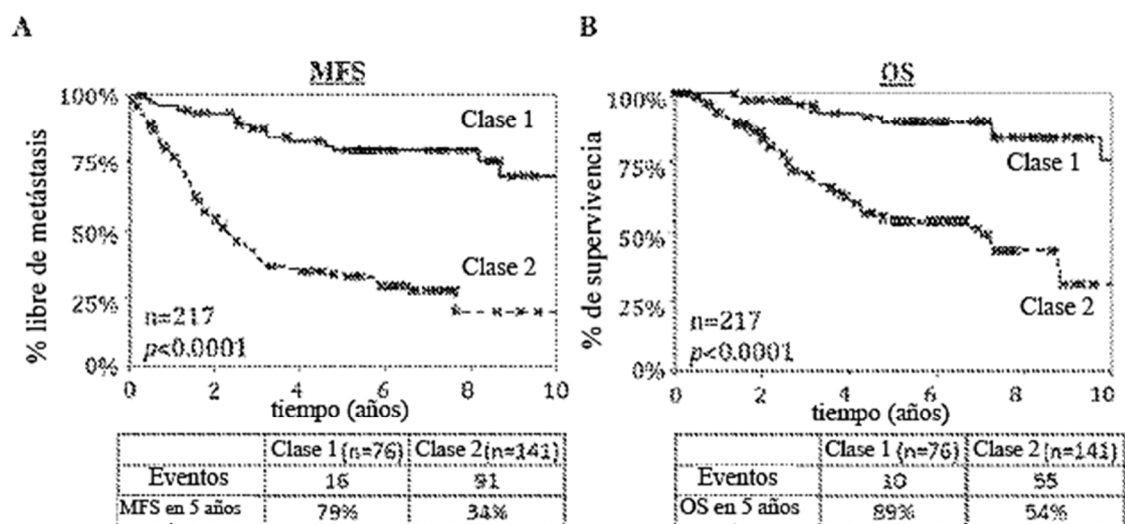


Figura 12

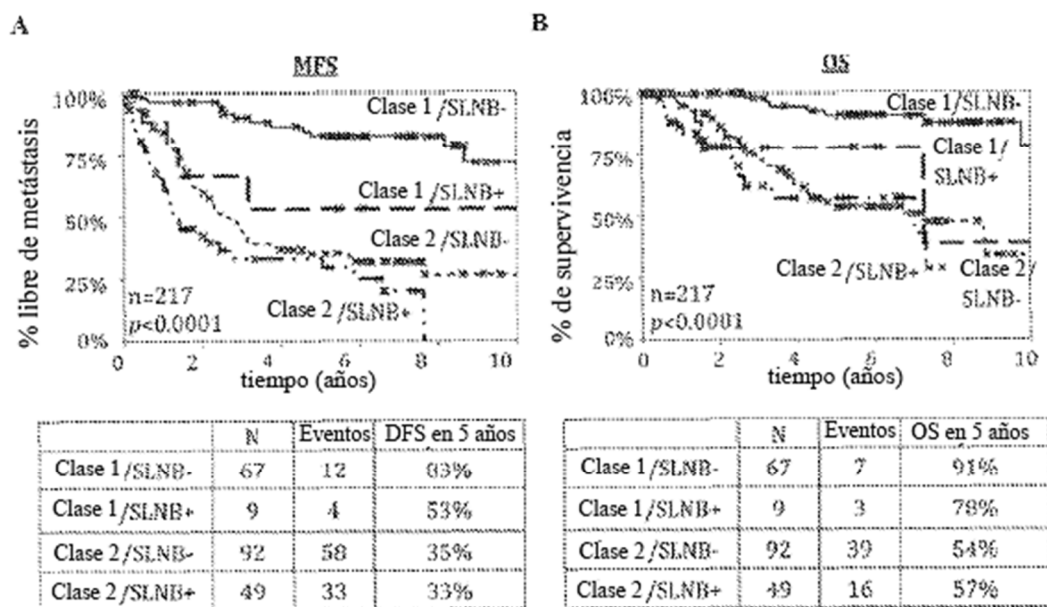
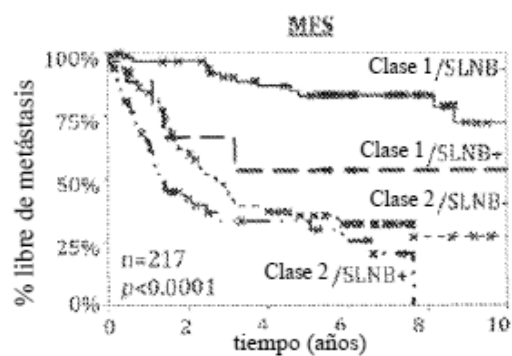


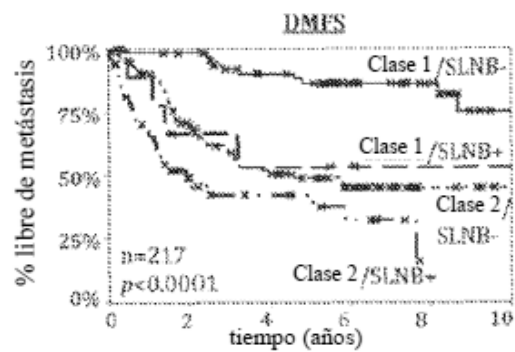
Figura 13

A



	N	Eventos	MFS en 5 años
Clase 1/SLNB-	67	12	83%
Clase 1/SLNB+	9	4	53%
Clase 2/SLNB-	92	58	35%
Clase 2/SLNB+	49	33	33%

B



	N	Eventos	DMFS en 5 años
Clase 1/SLNB-	67	10	86%
Clase 1/SLNB+	9	4	53%
Clase 2/SLNB-	92	43	49%
Clase 2/SLNB+	49	28	42%

Figura 14

