

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 516**

21 Número de solicitud: 201331404

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.09.2013

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.03.2015

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO (50.0%)
Barrio Sarriena, s/n
48940 Leioa (Bizkaia) ES y
ADMINISTRACIÓN GENERAL DE LA
COMUNIDAD AUTÓNOMA DE EUSKADI -
OSAKIDETZA (50.0%)

72 Inventor/es:

BOYANO LÓPEZ, María Dolores;
ARROLLO BERDUGO, Yoana;
ALONSO ALEGRE, Santos;
ASUMENDI MALLEA, Aintzane;
PÉREZ-YARZA PÉREZ-IREZÁBAL, Gorka;
CAREAGA ALZAGA, Jesús María;
GARDEAZÁBAL GARCÍA, Jesús;
IZU BELLOSO, Rosa;
DÍAZ RAMÓN, Jose Luis;
ACEBO MARIÑAS, Elvira;
SÁNCHEZ DÍEZ, Ana;
MARTÍNEZ DE LIZARDUY, Íñigo y
RATÓN NIETO, Juan Antonio

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Método de diagnóstico y pronóstico de melanoma cutáneo**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar melanoma cutáneo y un método in vitro para diferenciar nevus benigno de melanoma en una lesión cutánea basados en determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por BCL3, PIR, PEBP1 y sus combinaciones. Adicionalmente, la invención se refiere a un método in vitro para determinar la probabilidad de metástasis en un sujeto diagnosticado con melanoma cutáneo basado en determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por M-MITF, PIR, BCL2 y sus combinaciones.

ES 2 532 516 A1

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico y pronóstico de melanoma cutáneo

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

5

La presente invención se encuadra, en general, dentro del campo de diagnóstico y pronóstico de enfermedades; en particular, con el diagnóstico y pronóstico de melanoma cutáneo y con el diagnóstico diferencial entre melanoma cutáneo y una lesión cutánea no tumoral.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El melanoma maligno representa la mayor causa de mortalidad asociada al cáncer de piel y su incidencia está incrementando en los últimos años, especialmente entre la población de raza blanca y piel clara, diagnosticándose en el mundo 160.000 nuevos casos al año.

Las alteraciones moleculares implicadas en la patogenia del melanoma maligno se encuentran en constante estudio, lo que ha permitido determinar alteraciones genéticas que afectan a genes reparadores del ADN, oncogenes y genes supresores de tumores, además de genes implicados en las rutas de pigmentación. Sin embargo, estos avances siguen siendo insuficientes para establecer marcadores biológicos y dianas moleculares que faciliten un diagnóstico precoz y permitan desarrollar terapias más eficaces frente a esta neoplasia.

25

Se conocen diversos marcadores tumorales de melanoma, entre ellos LDH sérica, 5-S-CD, S-100 β y MIA (Garbe C. et al Cancer. 2003 Apr 1;97(7):1737-45). Sin embargo, ninguno de estos marcadores tumorales da resultados positivos a menos que el melanoma esté en fase muy avanzada, tal como el estadio IV.

30

El tumor primario de un melanoma maligno tiene un comportamiento biológico donde se distinguen dos fases de crecimiento. La primera fase se denomina de crecimiento radial (FCR), porque los melanocitos proliferan intraepidérmicamente. La FCR puede durar meses o años, hasta que el tumor adquiere la capacidad de invadir la dermis, comenzando así lo que se denomina la fase de crecimiento vertical (FCV). La FCV implica mal pronóstico, dado que la infiltración de las células neoplásicas a las capas

inferiores de la piel posibilita su diseminación a través de los vasos linfáticos a los ganglios linfáticos o, a través de los vasos sanguíneos a cualquier órgano donde las células tumorales pueden proliferar con éxito generando metástasis.

5 En la actualidad la posibilidad de curación del melanoma está estrechamente ligada a la precocidad del diagnóstico y extirpación quirúrgica del tumor. Así, en la actualidad, el pronóstico de la enfermedad se basa fundamentalmente en la evaluación histológica de las biopsias y el tamaño de las lesiones cutáneas. Aproximadamente el 70% de los
10 pacientes con melanoma son diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad (estadios I y II según la clasificación AJCC AJCC; Melanoma Staging Database, 2008), y se les considera pacientes de “bajo riesgo” por su elevada probabilidad de curación mediante la cirugía. Sin embargo, para los casos de melanoma metastásico todavía no existen métodos diagnósticos ni terapias eficaces capaces de mejorar la supervivencia de los pacientes.

15

La probabilidad de supervivencia de los pacientes con melanoma se relaciona con la ausencia de afectación ganglionar y de metástasis. La prueba del ganglio centinela (que consiste en la detección de células tumorales en la cadena de nódulos linfáticos más próxima al tumor) se ha convertido en un poderoso marcador pronóstico para
20 determinar la supervivencia de los pacientes con melanoma maligno cutáneo con lesiones de un tamaño entre 1 y 4 mm.

La mortalidad detectada en los estadios tempranos de la progresión tumoral puede deberse, a menos en parte, a que a los pacientes con lesiones menores de 1 mm no
25 se les realiza la biopsia del ganglio centinela. Por otro lado, un resultado negativo en la biopsia del ganglio centinela no excluye de la posibilidad de desarrollar una metástasis. De hecho, aproximadamente un 10% de los pacientes con ganglio centinela negativo desarrollan metástasis

30 Los únicos marcadores pronósticos utilizados en clínica hasta la fecha son los recogidos en el sistema de estadificación de la AJCC (American Joint Committee of Cancer) que se basa en la clasificación TNM (Tumor, Ganglios linfáticos afectados y Metástasis).

35 En la actualidad, y a diferencia de otros tumores como el carcinoma de colon o el de mama y pulmón, no se ha demostrado ningún marcador molecular que sea de utilidad

en la práctica clínica ya que no permiten predecir el riesgo en estadios tempranos (AJCC estadio I a III).

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico de melanoma y de métodos para determinar la probabilidad de que un sujeto con melanoma desarrolle metástasis, de manera que pueda aplicarse un tratamiento adicional a la extirpación quirúrgica del tumor, en caso de que las células tumorales hayan adquirido ya el fenotipo invasivo.

10 COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se refiere a método *in vitro* para diagnosticar melanoma cutáneo que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *BCL3*, *PIR*, *PEBP1* y sus combinaciones en una muestra de un sujeto, y

b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

en donde un nivel de expresión aumentado de *BCL3* y/o un nivel de expresión disminuido de *PIR* y/o *PEBP1* con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicho sujeto padece un melanoma cutáneo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar la probabilidad de metástasis en un sujeto diagnosticado con melanoma cutáneo que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *M-MITF*, *PIR*, *BCL2* y sus combinaciones en una muestra obtenida de un sujeto, y

b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

en donde un nivel de expresión disminuido de *M-MITF*, *PIR* y/o *BCL2* con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicho sujeto tiene alta probabilidad de desarrollar metástasis.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diferenciar nevus benigno de melanoma en una lesión cutánea que comprende:

a) determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *BCL3*, *PIR*, *PEBP1* y sus combinaciones en una muestra de tejido de dicha lesión cutánea, y

5 b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

en donde un nivel de expresión aumentado de *BCL3* y/o un nivel de expresión disminuido de *PIR* y/o *PEBP1* con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicha lesión cutánea es melanoma.

10 En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende un reactivo capaz de determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *BCL3*, *PIR*, *PEBP1*, *M-MITF*, *BCL2* y sus combinaciones.

15 En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de un kit de la invención para diagnosticar melanoma cutáneo, para determinar la probabilidad de metástasis de un sujeto diagnosticado con melanoma cutáneo o para diferenciar un nevus benigno de melanoma.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20

Figura 1. Expresión relativa del gen *PIR* en líneas de melanoma y cultivos primarios de melanocitos. Todas las líneas de melanoma analizadas muestran una reducción significativa de los niveles de expresión de *PIR* con respecto a los cultivos primarios de los melanocitos. La media de expresión de *PIR* en los cultivos primarios de los melanocitos es de 134 y se indica en la gráfica con una línea de puntos discontinua. El porcentaje (%) de expresión es de al menos un 75% menos respecto a los melanocitos.

30 **Figura 2.** Expresión relativa del gen *PEBP1* en líneas celulares de melanoma y cultivos primarios de melanocitos. La cuantificación de la expresión génica mediante RT-qPCR muestra un silenciamiento del gen *PEBP1* en todas las líneas de melanoma analizadas con respecto a los cultivos primarios de los melanocitos. La media de expresión de *PEBP1* en cultivos primarios de los melanocitos es de 20,9 y se indica en la gráfica con una línea de puntos discontinua. El % de expresión es de al menos un
35 75% menos respecto a los melanocitos.

Figura 3. Expresión relativa del gen *BCL3* en líneas de melanoma y cultivos primarios de melanocitos. Las líneas de melanoma analizadas muestran una sobreexpresión estadísticamente significativa del gen *BCL3* en relación a los niveles encontrados en los cultivos primarios de los melanocitos. La media de expresión de *BCL3* en los cultivos primarios de los melanocitos es de 1,1 y se indica en la gráfica con una línea de puntos discontinua. El % de expresión es de al menos un 75% más que los melanocitos.

Figura 4 .Expresión relativa de *M-MITF* en líneas de melanoma y cultivos primarios de melanocitos. Las líneas con fenotipo invasivo de melanoma A375, Hs294T, HT-144, 1205Lu, WM793B, JSG y RPMI7951 muestran una reducción significativa de *M-MITF*, mientras que las líneas con fetopito proliferativo MEL-HO, MEL-Juso y COLO-800 presenta niveles de ARNm transcritos a partir de este gen similares a los encontrados en los cultivos primarios de los melanocitos. La media de expresión de *M-MITF* en los cultivos primarios de los melanocitos es de 356,1 y se indica en la gráfica con una línea de puntos discontinua. El % de expresión en las líneas invasivas es de al menos un 90% menos respecto a los melanocitos normales y los melanomas no invasivos.

Figura 5. Expresión relativa del gen *BCL2* en líneas de melanoma y cultivos primarios de melanocitos. Las líneas de melanoma con capacidad invasiva A375, Hs294T, HT-144, 1205Lu, WM793B, JSG y RPMI7951 muestran una reducción del gen *BCL2* estadísticamente significativa, mientras que las líneas no invasivas MEL-HO, MEL-Juso y COLO-800 presenta niveles de ARNm para este gen similares a los encontrados en los cultivos primarios de los melanocitos. La media de expresión del gen *BCL2* en los cultivos primarios de los melanocitos es de 16,8 y se indica en la gráfica con una línea de puntos discontinua. El % de expresión en las líneas invasivas es de al menos un 90% menos respecto a los melanocitos normales y los melanomas no invasivos (señalados dentro de la caja).

Figure 6. Distribución de las líneas de melanoma y los cultivos primarios de melanocitos analizados en un diagrama de los componentes mediante rotación ortogonal Varimax. Para el análisis de los componentes principales se han incluido los niveles proteicos obtenidos y los niveles de expresión génica obtenidos mediante RT-qPCR.

35

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han identificado unos nuevos marcadores, concretamente el aumento de expresión de *BCL3* y la disminución de la expresión de *PIR* y *PEBP1*, como marcadores para el diagnóstico de melanoma cutáneo. Asimismo, han identificado la disminución o ausencia de expresión de *PIR*, *M-MITF*, *BCL2* y sus combinaciones como marcador de pronóstico de melanoma cutáneo ya que permite identificar los melanomas cutáneos con capacidad invasiva.

Métodos de la invención

10

En un aspecto la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar melanoma cutáneo (en adelante, "primer método de la invención") que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *BCL3*, *PIR*, *PEBP1* y sus combinaciones en una muestra de un sujeto, y
- b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

15
20 en donde un nivel de expresión aumentado de *BCL3* y/o un nivel de expresión disminuido de *PIR* y/o *PEBP1* con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicho sujeto padece un melanoma cutáneo.

El término "diagnosticar" tal y como se usa en la presente invención se entiende por el procedimiento por el cual se identifica una enfermedad, entidad nosológica, patología o síndrome, a partir de unos indicadores, parámetros o síntomas.

25

Por "melanoma cutáneo" según se emplea en la presente invención, se refiere a un tumor que surge en la piel a partir de células denominadas melanocitos. Estas células se originan en la cresta neural en el desarrollo embriológico y migran hacia la piel, los ojos, el sistema nervioso central y hacia otras partes del organismo durante la vida fetal. Estos tumores aparecen predominantemente en la cubierta cutánea, pero pueden también presentarse en las mucosas, en las capas pigmentadas del globo ocular, etc. El sitio más común en los hombres es en el torso (pecho y espalda). En las mujeres, las piernas son la parte donde se presentan con más frecuencia. El cuello y el rostro son otros sitios comunes. El melanoma presenta una etapa de crecimiento radial, correspondiente al estadio temprano de la enfermedad, donde las células inicialmente se encuentran confinadas a la epidermis; o bien, invaden en forma local a

30
35

la dermis papilar, microinvasión representada desde el punto de vista clínico, por un nódulo tumoral franco. Esta etapa es llamada estadio nodular. No siempre estos nódulos se hacen clínicamente visibles, a pesar de compartir criterios histológicos de crecimiento vertical. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud el melanoma puede ser melanoma *in situ*, lentigo maligno, extensivo superficial, nodular, fusocelular, nevoide, spitzoide, desmoplásico, neurotrofo, con diferenciación neural, regresivo, de células balonizadas, células en anillo de sello y rabdoide.

En otro aspecto la invención se relaciona con un método *in vitro* para determinar la probabilidad de metástasis en un sujeto diagnosticado con melanoma cutáneo (en adelante, "segundo método de la invención") que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *M-MITF*, *PIR*, *BCL2* y sus combinaciones en una muestra obtenida de un sujeto, y
- b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

en donde un nivel de expresión disminuido de *M-MITF*, *PIR*, y/o *BCL2* con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicho sujeto tiene alta probabilidad de desarrollar metástasis.

Por "probabilidad de desarrollar metástasis" tal y como se emplea en la presente invención, se refiere a asignar una probabilidad de que las células tumorales puedan diseminarse y formar metástasis en un sujeto que padece un melanoma cutáneo. Esta asignación tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, e.g., mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del p-valor, test de Student, funciones discriminantes de Fisher, etc. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el p-valor es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diferenciar nevus benigno de melanoma en una lesión cutánea (en adelante, “tercer método de la invención”) que comprende:

- 5 a) determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *BCL3*, *PIR*, *PEBP1* y sus combinaciones en una muestra de tejido de dicha lesión cutánea, y
- b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

10 en donde un nivel de expresión aumentado de *BCL3* y/o un nivel de expresión disminuido de *PIR* y/o *PEBP1* con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicha lesión cutánea es melanoma.

15 Por “nevus benigno”, tal y como se usa en la presente invención, se entiende una proliferación de distintos tipos de células en la piel.

En una realización particular el nevus benigno es una lesión amelanótica benigna, un nevi o una lesión premaligna (nevus displásico y nevus de Spitz).

20 Por “lesión amelanótica” tal y como se usa en la presente invención se entiende una alteración de la piel que carece de pigmento melánico.

25 Por “nevi” tal y como se usa en la presente invención se refiere a pequeñas manchas pigmentada en la piel, de bordes definidos y coloración homogénea parda o marrón claro, constituida por un acúmulo de células névicas con melanina. Los nevi son proliferaciones cutáneas de uno o más componentes normales cutáneos que puede estar presente el nacimiento o aparecer posteriormente. La forma más frecuente son los nevus melanocíticos pero existen otros tipos de nevus incluyendo el nevus epidermico, sebáceo, conectivos y vascular. El nevus melanocítico –lunar- es una lesión que se caracteriza por la proliferación clonal de melanocitos (células névicas)

30 afectando a las diferentes estructuras de la piel. Existen diversas variedades de nevus melanocíticos según sus características, así tenemos nevus melanocítico adquirido, congénito, halo nevus, nevus azul y nevus atípico.

35 Por “nevus displásico” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a lunares atípicos, más grandes que los normales pudiendo medir de 5 a 15 mm, tienen forma

irregular, tienen varios colores incluido el rosa, marrón o negro y su superficie puede ser lisa o abultada.

Por "nevus de Spitz" tal y como se usa en la presente invención se refiere a una lesión
5 solitaria, papular cupuliforme, menor de 1 cm de diámetro, asintomática y que se presenta entre la primera y segunda década de la vida sin diferencias por sexo, localizándose más frecuentemente en cara y cuello, pudiendo estar presente en el resto del cuerpo. Presenta una morfología muy variada, blanda o dura al tacto, de diversos colores y superficie lisa o verrugosa, homogénea y bien delimitada. Su
10 crecimiento puede ser lento o muy rápido.

Los métodos de la invención [primer método de la invención, segundo método de la invención y tercer método de la invención], comprenden en una primera etapa determinar el nivel de expresión de uno o más marcadores en una muestra de un
15 sujeto.

El término "sujeto" o "paciente", tal como se usa aquí, incluye a cualquier animal clasificado como mamífero e incluye, aunque no está restringido a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates
20 no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos, o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un humano hombre o mujer de cualquier edad o raza.

El término "muestra", tal como aquí se usa, se refiera al material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado
25 para determinar el nivel de expresión de *PIR*, *PEBP1*, *BCL3*, *M-MITF* y/o *BCL2*. La muestra puede aislarse de cualquier fluido o tejido biológico adecuado, por ejemplo, tejido, sangre, plasma, suero, orina, etc.

En una realización particular del primer método de la invención y del segundo método
30 de la invención, la muestra es una muestra de tejido. Dicha muestra se puede obtener mediante métodos convencionales, por ejemplo, biopsia, utilizando métodos bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas relacionadas o mediante exéresis quirúrgica. Los métodos para obtener una muestra de la biopsia incluyen partición en trozos grandes de un tumor, o microdissección u otros métodos de separación de
35 células conocidos en la técnica. Las células tumorales se pueden obtener de forma adicional mediante citología por aspiración con una aguja fina. Para simplificar la

conservación y el manejo de las muestras, estas se pueden fijar en formalina y embeber en parafina o congelar primero y después embeber en un medio criosolidificable, tal como compuesto OCT, mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permite la congelación rápida.

5

De acuerdo con el tercer método de la invención, la muestra es un tejido de una lesión cutánea.

Por "lesión cutánea", tal y como se usa en la presente invención se entiende una
10 región melanótica o amelanótica susceptible de ser melanoma maligno.

El primer método de la invención, comprende en una primera etapa determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionados del grupo formado por BCL3, PIR, PEBP1 y sus combinaciones en una muestra de un sujeto.

15

Por "BCL3" tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica para la proteína Bcl3 que actúa como un coactivador transcripcional que se activa mediante su asociación con homodímeros de la proteína NF-κB. En humanos, la proteína Bcl3 corresponde con la secuencia de referencia P20749 en la base de datos
20 Uniprot a fecha 19 de septiembre de 2013.

Por "PIR" tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica para la proteína Pirin, miembro de la superfamilia de cupin, ha sido descrita como un coregulador transcripcional capaz de modular la migración celular y la apoptosis. En
25 humanos la proteína Pirin corresponde con la secuencia de referencia o00625 de la base de datos Uniprot a fecha 19 de septiembre de 2013.

Por "PEBP1" tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica para la proteína 1 de unión a fosfatidiletanolamina, regulador negativo de las vías de
30 señalización MAPK y NF-κ B. En humanos la proteína Pebp1 corresponde con la secuencia con referencia en la base de datos Uniprot P30086 en fecha 19 de septiembre de 2013.

Como entiende el experto en la materia, el primer método de la invención, en una
35 realización particular, comprende determinar el nivel de expresión de uno solo de los marcadores del grupo formado por *BCL3*, *PIR* y *PEBP1*. Por tanto, en una realización

particular, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *BCL3*. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *PIR*. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *PEBP1*.

5

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar los niveles de expresión de 2 marcadores del grupo formado por los marcadores *BCL3*, *PIR* y *PEBP1*. Por tanto, en otra realización particular el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *BCL3* y *PIR*.

10 En otra realización adicional, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *BCL3* y *PEBP1*. En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *PIR* y *PEBP1*.

15 En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los 3 marcadores *BCL3*, *PIR* y *PEBP1*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende, además, determinar el nivel de expresión de un marcador adicional seleccionado del grupo
20 formado por *M-MITF*, *BCL2* y sus combinaciones.

El segundo método de la invención comprende en una primera etapa determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *M-MITF*, *PIR*, *BCL2* y sus combinaciones en una muestra de un sujeto.

25

Por "*MITF*" tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica para el factor de transcripción MITF. Dicho gen da lugar a la transcripción de las isoformas de MITF A, B, C, D, E, H, J, Mc y M. Por simplicidad, en la presente invención se denomina "*M-MITF*" al transcrito del gen *MITF* que da lugar a la isoforma
30 M de *MITF* (M-mitf) específica de melanocitos, es decir, tanto al ARNm que codifica la isoforma M-mitf como el ADNc correspondiente a dicho ARNm. El factor de transcripción asociado con microftalmia (MITF) es un factor de transcripción con un dominio hélice-bucle-hélice básico de cremallera de leucina implicado en el desarrollo de melanocitos y osteoclastos. La isoforma M se diferencia de las demás isoformas en
35 que en que presenta una inserción de 6 aminoácidos antes de la región básica. En

humanos la isoforma M corresponde con la secuencia de referencia O75030 de la base de datos de Uniprot a fecha 19 de septiembre de 2013.

5 Por "BCL2" tal y como se usa en la presente invención se refiere al gen que codifica para la proteína Bcl-2, considerada proto-oncogen que regula procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular. En humanos corresponde con la secuencia de referencia P10415 en la base de datos de Uniprot a fecha 19 de septiembre de 2013.

10 El término PIR ha sido definido anteriormente y es igualmente aplicable al segundo método de la invención.

15 Como entiende el experto en la materia, el segundo método de la invención, en una realización particular, comprende determinar el nivel de expresión de uno solo de los marcadores del grupo formado por *M-MITF*, *PIR* y *BCL2*. Por tanto, en una realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *M-MITF*. En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *PIR*. En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *BCL2*.

20 En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de 2 marcadores del grupo formado por *M-MITF*, *PIR* y *BCL2*. Por tanto, en una realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *M-MITF* y *PIR*. En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *M-MITF* y *BCL2*. En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *PIR* y *BCL2*.

30 En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los 3 marcadores *M-MITF*, *PIR* y *BCL2*.

35 En otra realización particular, el segundo método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de un marcador adicional seleccionado del grupo formado por *BCL2*, *PEBP1* y sus combinaciones.

El tercer método de la invención, comprende en una primera etapa determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *BCL3*, *PIR*, *PEBP1* y sus combinaciones en una muestra de tejido de dicha lesión cutánea.

5

Como entiende el experto en la materia, el tercer método de la invención, en una realización particular, comprende determinar el nivel de expresión de uno solo de los marcadores del grupo formado por *BCL3*, *PIR* y *PEBP1*. Por tanto, en una realización particular, el tercer método de la invención, comprende determinar el nivel de expresión de *BCL3*. En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *PIR*. En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de *PEBP1*.

En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de 2 marcadores del grupo formado por *BCL3*, *PIR* y *PEBP1*. Por tanto, en una realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *BCL3* y *PIR*. En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *BCL3* y *PEBP1*. En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los marcadores *PIR* y *PEBP1*.

En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de los 3 marcadores *BCL3*, *PIR* y *PEBP1*.

25

En otra realización particular, el tercer método de la invención comprende determinar el nivel de expresión de un marcador adicional seleccionado del grupo formado por *M-MITF*, *BCL2* y sus combinaciones.

El término "nivel de expresión" de un marcador, tal como aquí se usa, se refiere a la cantidad medible de producto del gen en una muestra del sujeto, en el que el producto de la transcripción o un producto de la traducción de dicho gen. En consecuencia, dicho nivel de expresión puede corresponder al de un ácido nucleico (tal como ARNm o ADNc) del gen correspondiente o al de una proteína o polipéptido codificado por dicho gen. El nivel de expresión se deriva de la muestra de un sujeto y/o de una

35

muestra o muestras de referencia, y puede ser detectado *de novo* o corresponder a una determinación anterior.

5 Como entiende el experto en la materia, los niveles de expresión de *PIR*, *PEPBP1*, *BCL3*, *M-MITF* y *BCL2* se pueden determinar midiendo los niveles de los ARNm (o sus ADNc correspondientes) de los genes correspondientes o midiendo los niveles de las proteínas codificadas por dichos genes, y los niveles de las variantes de los mismos.

10 A modo ilustrativo, no limitativo, en una realización particular, el nivel de expresión de los marcadores identificados en la presente invención, se determina cuantificando el nivel de los ARNm codificados por los genes en cuestión. El nivel de ARNm de un gen puede cuantificarse mediante el uso de métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden la amplificación del ARNm y la cuantificación del producto de amplificación de dicho ARNm, tales como electroforesis y tinción, o de forma
15 alternativa, por medio de transferencia Northern y el uso de sondas específicas del ARNm de los genes de interés o su correspondiente ADNc/ARNc, mapeo con la nucleasa S1, RT-PCR, hibridación, micromatrices, etc. De forma similar, los niveles del ADNc/ARNc correspondiente a dicho ARNm codificado por los marcadores también se puede cuantificar mediante el uso de técnicas convencionales; en este caso, el método
20 de la invención incluye un paso de síntesis del ADNc correspondiente por medio de transcripción inversa (RT) del correspondiente ARNm seguido por la síntesis (ARN polimerasa) y amplificación del ARNc complementario a dicho ADNc. Los métodos convencionales para cuantificar los niveles de expresión se puede encontrar, por ejemplo, en Sambrook et al., 2001 "Molecular cloning: to Laboratory Manual", 3ª ed.,
25 Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

Para normalizar los valores de expresión de ARNm entre las diferentes muestras, es posible comparar los niveles de expresión del ARNm de interés en las muestras de prueba con la expresión de un ARN control. Un "ARN control" como se usa en el
30 presente documento, se refiere a un ARN cuyos niveles de expresión no cambian o cambian solo en cantidades limitadas. Preferiblemente, el ARN control es ARNm derivado de genes de mantenimiento y que codifica proteínas que se expresan constitutivamente y llevan a cabo funciones celulares esenciales. Los genes de mantenimiento preferidos para su uso en la presente invención incluyen la proteína
35 ribosómica de 18S, β -2-microglobulina, ubiquitina, ciclofilina, GAPDH, PSMB4, tubulina y β -actina.

En una realización particular de los métodos de la invención [primer método de la invención, segundo método de la invención y tercer método de la invención], la determinación de los niveles de expresión de los marcadores se realiza mediante una
5 reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o un array de ADN o ARN.

De forma alternativa, también es posible determinar los niveles de expresión de los marcadores mediante la determinación de los niveles de expresión de las proteínas codificadas por los genes, ya que si la expresión de los genes aumenta, cabe esperar
10 que se produzca un aumento en la cantidad de la proteína correspondiente, y si la expresión de los genes disminuye, cabe esperar que se produzca una disminución de la cantidad de la proteína correspondiente.

A modo ilustrativo, no limitativo, los niveles de dichas proteínas pueden cuantificarse,
15 por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse a dichas proteínas (o a fragmentos de las mismas que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Ejemplos ilustrativos de marcadores que se pueden utilizar incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos
20 quimioluminiscentes, sustratos enzimáticos o cofactores, inhibidores enzimáticos, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (ensayo
25 inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA sandwich con doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras
30 maneras para detectar y cuantificar dichas proteínas, incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a las proteínas diana con alta afinidad para detectar la
35 cantidad de las proteínas diana. Se prefiere sin embargo el uso de un anticuerpo, por ejemplo sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos

monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

En una forma de realización preferida de los métodos de la invención, la determinación
 5 de los niveles de los marcadores se realiza por una técnica inmunológica. En una
 realización más particular el nivel de expresión se determina por inmunohistoquímica,
 Western blot, ELISA o una matriz de proteínas. En una forma de realización más
 preferida, la técnica inmunológica es inmunohistoquímica o "IHC" (del inglés,
 "immunohistochemistry"). En general, la IHC es un procedimiento histopatológico
 10 conocido que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, normalmente
 marcado con un marcador (por ejemplo, una enzima), que puede transformar un
 sustrato en un compuesto visible sin afectar la capacidad del anticuerpo para formar
 un complejo con el antígeno aplicado a una muestra de tejido orgánico. Con la
 utilización de alguna de las técnicas específicas (peroxidasa, antiperoxidasa,
 15 fluoresceína, etc.), el complejo antígeno-anticuerpo formado puede localizarse e
 identificarse en las muestras tisulares o citológicas a estudiar, con lo que se identifican
 los marcadores antigénicos característicos de distintas células y se puede determinar
 el tipo de célula involucrado en la muestra.

20 La muestra a analizar con el fin de detectar la presencia de los marcadores de la
 invención mediante IHC (o análisis inmunohistoquímico) puede ser una muestra
 fresca, una muestra congelada o una muestra embebida en parafina y fijada usando
 un agente protector del tipo de formalina o similar. En una realización particular, el
 análisis inmunohistoquímico se lleva a cabo tiñendo la muestra a analizar con uno o
 25 más anticuerpos específicos frente a uno o más marcadores de la invención y
 determinando la frecuencia de células que se han teñido y la intensidad de la tinción.
 Ventajosamente, la detección mediante IHC de la presencia de los marcadores en la
 muestra a analizar se lleva a cabo en paralelo con muestras tisulares o citológicas que
 sirven como marcador positivo y como marcador negativo, y, si se desea, como
 30 referencia, se pueden usar tejidos sanos del mismo origen que el tumor que se está
 analizando. También es frecuente usar un control de fondo. Típicamente, se asigna a
 la muestra un valor indicativo de la expresión total que se calcula en función de la
 frecuencia de células teñidas y de la intensidad en cada una de las células teñidas.
 Los criterios típicos para asignar valores de expresión a las muestras han sido
 35 descritos en, por ejemplo, Handbook of Immunohistochemistry and In Situ
 Hybridization in Human Carcinomas, M. Hayat Ed., 2004, Academic Press.

La determinación del nivel de expresión de uno o más marcadores de la invención mediante IHC presenta ventajas ya que no altera la rutina clínica de extracción de tejido y procesamiento de las muestras en los laboratorios de anatomía patológica.

5

En aquellos casos en los que se desee analizar un elevado número de muestras (por ejemplo, cuando se desea analizar varias muestras de un mismo paciente o muestras de distintos pacientes), es posible la utilización de formatos matriciales y/o procedimientos automatizados. En una forma de realización, es posible el uso de micromatrices de tejidos (*tissue microarrays* or TMA) que pueden ser obtenidos usando distintas técnicas. Las muestras que forman parte de las micromatrices pueden ser analizadas de distinta manera incluyendo inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, PCR *in situ*, análisis de ARN o de ADN, inspección morfológica y combinaciones de cualquiera de las anteriores. Métodos para el procesamiento de micromatrices de tejido han sido descritos, por ejemplo, en Kononen, J. et al., (Nat. Med. 1987, 4:844-7). Las micromatrices de tejido se preparan a partir de núcleos cilíndricos de 0,6 a 2 mm de diámetro a partir de muestras de tejido embebidas en parafina y vueltas a embeber en un único bloque receptor. De esta forma, el tejido procedente de múltiples muestras puede ser insertado en un único bloque de parafina.

20

Como se ha citado previamente, los niveles de expresión de *PIR*, *PEBP1*, *BCL3*, *M-MITF* y *BCL2* se pueden determinar midiendo tanto los niveles de proteína como los niveles de variantes de las mismas, tales como fragmentos, análogos y/o derivados.

25 Tal como aquí se utiliza, una variante de un marcador (proteína) puede ser (i) un polipéptido o proteína (en general, "péptido") en el que uno o más residuos de aminoácidos es sustituido por un residuo de un aminoácido conservativo o no conservativo, preferiblemente un residuo de un aminoácido conservativo, y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético, (ii) un péptido en el que hay uno o más residuos de aminoácidos modificados, por ejemplo, residuos que están modificados por la unión de grupos sustituyentes, (iii) un péptido en el que la proteína es una variante de "splicing" alternativo de las proteínas identificadas como marcadores en la presente invención, y/o (iv) un fragmento de dichas proteínas. Los fragmentos incluyen proteínas generadas a través del corte proteolítico
35 (incluyendo proteólisis multisitio) de una secuencia original. Dichas variantes pueden

ser identificadas por los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la presente solicitud de patente.

Como se conoce en la técnica, la "identidad" entre dos proteínas se determina comparando la secuencia de aminoácidos de una primera proteína con la secuencia de aminoácidos de una segunda proteína. De acuerdo con la presente invención, una "variante" es un péptido (polipéptido o proteína) que tiene una secuencia de aminoácidos que es, al menos, el 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o incluso superior, idéntica a la secuencia de aminoácidos de las proteínas identificadas como marcadores por esta invención. El grado de identidad entre dos proteínas se puede determinar usando métodos y algoritmos informáticos conocidos por los expertos en la materia. A modo ilustrativo, en una realización particular, el grado de identidad entre 2 secuencias de aminoácidos se determina mediante el uso del algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Las proteínas pueden estar modificadas post-traduccionalmente; tales modificaciones post-traduccionales caen dentro del ámbito de la presente invención e incluyen, a modo ilustrativo, el corte del péptido señal, glicosilación, acetilación, isoprenilación, proteólisis, miristoilación, plegamiento de proteínas y procesamiento proteolítico, etc. Además, las proteínas pueden incluir aminoácidos no naturales formados por las modificaciones postraduccionales o introduciendo aminoácidos no naturales durante la traducción.

Alternativamente, el nivel de expresión de los marcadores de la invención se puede determinar mediante el análisis de la actividad de las proteínas o de una variante funcionalmente equivalente de las mismas.

A modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la actividad de Bcl-3 puede determinar mediante la inhibición de la expresión de IL-10 tal y como se describe en Riemann M. et al, J Immunol. 2005 Sep 15;175(6):3560-8, o mediante la supresión de la activación de p53 tal y como se describe en Kashatus D.e t al., Genes Dev. 2006 Jan 15; 20(2):225-35. Epub 2005 Dec 29.

A modo de ejemplo ilustrativo no limitativo, la actividad de PEBP1 puede determinarse mediante la inhibición de la actividad serina proteasa, tal y como se describe en Hengst U. et al., J Biol Chem. 2001 Jan 5; 276(1):535-40.

- 5 A modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la actividad de Bcl-2 puede determinarse mediante la inhibición de la actividad transcripcional de p53 tal y como se describe en Barbara A. et al., Journal of Biological Chemistry, 274, 6469-6475.

- 10 A modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la actividad de M-mitf puede determinarse mediante la expresión de Dia1 tal y como se describe en Carreira S. et al., Genes Dev. 2006 Dec 15; 20(24):3426-39.

- 15 A modo de ejemplo ilustrativo, no limitativo, la actividad de Pirin puede determinarse mediante la actividad enzimática quercetinasasa tal y como se describe en Adams M. et al., J Biol Chem 2005, 280(31):28675-28682.

La segunda etapa de los métodos de la invención [primer método de la invención, segundo método de la invención y tercer método de la invención] comprende comparar el nivel de expresión con un valor de referencia para dicho marcador.

20

- El término "valor de referencia", como se usa en el presente documento, se refiere a criterios predeterminados usados como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior o inferior, un intervalo de valores, un valor medio, un valor mediana, un valor de media, o un valor comparado con un control particular o valor basal. Un valor de referencia se puede basar en un valor de una muestra individual, tal como, por ejemplo, un valor obtenido de muestra del sujeto que se analiza, pero en un momento anterior en el tiempo. El valor de referencia se puede basar en un gran número de muestras, tal como de una población de sujetos del grupo coincidente de edad cronológica, o basarse en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra que se analiza. En una realización particular el valor de referencia para un marcador es el nivel de expresión de dicho marcador en una muestra de un sujeto o población de sujetos control, es decir que no sufren melanoma. En general, las muestras de referencia típicas se obtendrán de sujetos que están clínicamente bien documentados.
- 30
- 35

Según la presente invención, el nivel de un marcador aumenta cuando el nivel de dicho marcador en una muestra es mayor que un valor de referencia. Los niveles de un marcador se consideran que son mayores que su valor de referencia cuando es al menos el 1,5%, al menos el 2%, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos 15%, al
5 menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%, al menos el 110%, al menos el 120%, al menos el 130%, al menos el 140%, al menos el 150% o más mayores que el valor de
10 referencia.

Asimismo, en el contexto de la presente invención, el nivel de un marcador disminuye cuando el nivel de dicho marcador en una muestra es menor que un valor de referencia. Los niveles de un marcador se consideran que son menores que su valor
15 de referencia cuando es al menos el 5%, al menos el 10%, al menos 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%, al menos el 110%, al menos el 120%, al menos el
20 130%, al menos el 140%, al menos el 150% o más mayores que el valor de referencia.

De acuerdo con el primer método de la invención, un nivel de expresión aumentado de *BCL3*, y/o un nivel de expresión disminuido de *PIR* y/o de *PEBP1*, con respecto al valor de referencia para dicho(s) marcador(es), es indicativo de que dicho sujeto
25 padece un melanoma cutáneo.

En una realización particular del primer método de la invención en la que se determina el nivel de expresión de *BCL3*, *PIR* y *PEBP1*, un nivel de expresión de *BCL3* aumentado al menos un 75% con respecto al valor de referencia para dicho marcador
30 y unos niveles de expresión de *PIR* y de *PEBP1* disminuidos al menos un 75% con respecto al valor de referencia para cada uno de dichos marcadores, es indicativo de que dicho sujeto padece un melanoma cutáneo.

De acuerdo con el segundo método de la invención, un nivel de expresión disminuido
35 de los marcadores *M-MITF*, *PIR* y/o *BCL2* con respecto a los valores de referencia

para cada marcador, es indicativo de que dicho sujeto tiene una alta probabilidad de desarrollar metástasis.

En una realización particular del segundo método de la invención en la que se determinan los niveles de expresión de los marcadores *PIR*, *M-MITF* y *BCL2*, un nivel de expresión del marcador *PIR* disminuido al menos un 75% con respecto al valor de referencia para dicho marcador y unos niveles de expresión de los marcadores *M-MITF* y *BCL2* disminuidos al menos un 90%, más preferiblemente disminuyen más del 90%, con respecto al valor de referencia para cada uno de dichos marcadores, es indicativo de que dicho sujeto tiene una alta probabilidad de desarrollar metástasis.

De acuerdo con el tercer método de la invención, un nivel de expresión de *BCL3* aumentado, y/o unos niveles de expresión de *PIR* y/o *PEBP1* disminuidos, con respecto al valor de referencia para dicho(s) marcador(es) es indicativo de que dicha lesión cutánea es melanoma cutáneo.

Kit de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante "kit de la invención", que comprende, un reactivo capaz de determinar el nivel de expresión de un marcador seleccionado del grupo formado por *BCL3*, *PIR*, *PEBP1*, *M-MITF*, *BCL2* y sus combinaciones.

El término "kit", tal como aquí se utiliza, se refiere a un producto que contiene los distintos reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención empaquetados para permitir su transporte y almacenamiento. Materiales adecuados para el empaquetado de los componentes del kit incluyen cristal, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), botellas, viales, papel, sobres y similares. Adicionalmente, los kits de la invención pueden contener instrucciones para el uso simultáneo, secuencial o separado de los distintos componentes que se encuentran en el kit. Dichas instrucciones pueden encontrarse en forma de material impreso o en forma de un soporte electrónico capaz de almacenar instrucciones de forma que puedan ser leídas por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Adicional o alternativamente, los medios pueden contener direcciones de Internet que proporcionen dichas instrucciones.

Kits que comprenden un solo reactivo tendrán generalmente el reactivo encerrado en un contenedor (por ejemplo, un frasco, ampolla, u otro recipiente de almacenamiento adecuado), aunque los kits incluyendo el reactivo unido a un sustrato (por ejemplo, una superficie interior de un recipiente de reacción de ensayo) también se contemplan. Asimismo, los kits que incluyen más de un reactivo también pueden tener los reactivos en recipientes (por separado o en una mezcla) o pueden tener los reactivos unidos a un sustrato.

10 Por "reactivo capaz de determinar el nivel de expresión", tal y como se usa en la presente invención se entiende un compuesto capaz de detectar el producto génico de un gen o la proteína codificada por dicho gen.

En algunas realizaciones, los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de una o más marcadores de la invención comprenden al menos 50%, al menos 55% al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos el 99%, de la cantidad total de los reactivos que forman el kit.

20 En una realización particular, dicho kit comprende los reactivos necesarios para realizar un inmunoensayo, preferentemente, un análisis inmunohistoquímico, para detectar la presencia de Pirin, PEBP1, Bcl-3, M-mitf y/o Bcl-2; para ello, dicho kit incluirá los anticuerpos que reconocen dichos marcadores.

25 Por tanto, en una realización preferida del kit de la invención, el "reactivo capaz de determinar el nivel de expresión" es un anticuerpo que se une a un marcador de la invención.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente invención puede ser un anticuerpo natural policlonal o monoclonal o un anticuerpo no natural, por ejemplo, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de cadena única de fragmento variable, un microanticuerpo, etc. Métodos para producir tales anticuerpos son bien conocidos en la técnica.

35 En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos para los marcadores de la invención se marcan con un marcador detectable (por ejemplo, un colorante

fluorescente o una enzima detectable), o son modificados para facilitar la detección (por ejemplo, con biotina para permitir la detección con un avidina o estreptavidina). En otras realizaciones, el reactivo no será directamente marcado o modificado.

- 5 En ciertas realizaciones, los kits incluyen los reactivos en la forma de una matriz. La matriz incluye al menos dos reactivos diferentes adecuados para la determinación de los niveles de expresión de una o más proteínas (cada reactivo, específico para una proteína diferente) unidos a un sustrato en un patrón predeterminado (por ejemplo, una rejilla). En consecuencia, la presente invención proporciona matrices que
10 comprenden los reactivos adecuados para la determinación de los niveles de expresión de uno o más marcadores de la invención

La localización de los diferentes reactivos (los "reactivos de captura") permite la medición de los niveles de un número de diferentes marcadores en la misma reacción.

- 15 Kits que incluyen los reactivos en forma matricial son comúnmente en formato sándwich, por lo que tales kits pueden contener también reactivos de detección. Normalmente, en el kit se incluyen diferentes reactivos de detección, cada reactivo de detección específicos para un anticuerpo diferente. Los reactivos de detección en tales realizaciones son normalmente reactivos específicos para las mismas proteínas que
20 los reactivos unidos al sustrato (aunque los reactivos de detección típicamente se unen a una porción diferente o en el sitio en la proteína de los reactivos enlazados al sustrato), y son generalmente reactivos de detección por afinidad. Al igual que con los reactivos de detección de cualquier otro formato de ensayo, los reactivos de detección pueden ser modificados con un resto detectable, modificados para permitir la unión de
25 un resto detectable por separado, o sin modificar se. Los kits de tipo matriz que incluyen reactivos de detección que están modificados o no modificados para permitir la unión de un resto detectable también pueden contener restos adicionales detectables (por ejemplo, restos detectables que se unen al reactivo de detección, tales como anticuerpos marcados que se unen sin modificar reactivos de detección o
30 estreptavidina modificada con un resto detectable para la detección de biotina modificados reactivos de detección).

En otra realización preferida del kit de la invención, el "reactivo capaz de determinar el nivel de expresión" comprende un ácido nucleico.

35

El término “ácido nucleico” tal y como se usa en la presente invención, se refiere a una sonda, cebador, capaz de hibridar específicamente con el polinucleótido que codifica un marcador de la invención.

- 5 En una realización particular, el kit de la invención comprende una matriz de ADN o ARN. Es decir, los ácidos nucleicos, oligonucleótidos, que forman el kit de la invención se encuentran acoplados a una matriz. Las micromatrices comprenden una pluralidad de ácidos nucleicos distribuidas espacialmente y asociadas de forma estable a un soporte (por ejemplo, un biochip). Los ácidos nucleicos tienen una secuencia
10 complementaria a subsecuencias particulares de los marcadores cuya expresión se desea detectar, por lo que son capaces de hibridar con dichos ácidos nucleicos. En los métodos de la invención, se pone en contacto una micromatriz que comprende una matriz de ácidos nucleicos con una preparación de ácidos nucleicos aislada del sujeto objeto de estudio. La incubación de la micromatriz con la preparación de ácidos
15 nucleicos se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la hibridación. Posteriormente, tras la eliminación de los ácidos nucleicos que no han quedado retenidos en el soporte, se detecta el patrón de hibridación lo que proporciona información sobre el perfil genético de la muestra analizada
- 20 La invención contempla una variedad de matrices tanto en cuanto al tipo de sondas como en cuanto al tipo de soporte utilizado. Las sondas incluidas en las matrices que son capaces de hibridar con los ácidos nucleicos pueden ser ácidos nucleicos o análogos de los mismos que mantienen la capacidad de hibridación como, por ejemplo, ácidos nucleicos en los que el enlace fosfodiéster se ha sustituido por un
25 enlace fosforotioato, metilimino, metilfosfonato, forforamidate, guanidina y similares, ácidos nucleicos en los que la ribosa de los nucleótidos se ha sustituido por otra hexosa, ácidos peptidonucleicos (PNA). La longitud de las sondas puede ser de 7, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100 nucleótidos y variar en el rango de 10 a 1000 nucleótidos, preferiblemente en el rango de 15 a 150 nucleótidos, más
30 preferiblemente en el rango de 15 a 100 nucleótidos y pueden ser ácidos nucleicos de cadena sencilla o de cadena doble.

La selección de las sondas específicas para los distintos genes diana se lleva a cabo de forma que se unan de forma específica al ácido nucleico diana con una hibridación
35 mínima a genes no relacionados. Sin embargo, existen sondas de 20 nucleótidos que no son únicas para un ARNm determinado. Por tanto, sondas dirigidas a dichas

secuencias mostrarán una hibridación cruzada con secuencias idénticas que aparecen en ARNm de genes no relacionados. Por otro lado, existen sondas que no hibridan de forma específica con los genes diana en las condiciones utilizadas (a causa de estructuras secundarias o de interacciones con el sustrato de la matriz). Este tipo de sondas no deben ser incluidas en la matriz. Por lo tanto, el experto en la materia advertirá que las sondas que van a incorporarse en una matriz determinada deberán ser optimizadas antes de su incorporación a la matriz. De forma general, la optimización de las sondas se lleva a cabo generando una matriz que contiene una pluralidad de sondas dirigidas a las distintas regiones de un determinado polinucleótido diana. Esta matriz se pone en contacto en primer lugar con una muestra que contiene el ácido nucleico diana de forma aislada y, en segundo lugar, con una mezcla compleja de ácidos nucleicos. De esta forma se seleccionan sondas que muestran una hibridación altamente específica con el ácido nucleico diana pero no baja o ninguna hibridación con la muestra compleja son seleccionadas para su incorporación a las matrices de la invención. Adicionalmente, es posible incluir en la matriz controles de hibridación para cada una de las sondas que va a ser estudiada. En una forma preferida de realización, los controles de hibridación contienen una posición alterada en la región central de la sonda. En el caso de que se observen altos niveles de hibridación entre la sonda estudiada y su control de hibridación, la sonda no se incluye en la matriz.

En una realización particular, las micromatrices que pueden utilizarse en la puesta en práctica de la presente invención contienen una serie de sondas control; a modo ilustrativo, dichas sondas control pueden ser de tres tipos: controles de normalización, controles de niveles de expresión y controles de hibridación.

Controles de normalización son oligonucleótidos que son perfectamente complementarios a secuencias de referencia marcadas que se añaden a la preparación de ácidos nucleicos que se desea analizar. Las señales derivadas de los controles de normalización tras la hibridación proporcionan una indicación de las variaciones en las condiciones de hibridación, intensidad del marcador, eficiencia de la detección y otra serie de factores que puede resultar en una variación de la señal de hibridación entre distintas micromatrices. Preferiblemente, las señales detectadas a partir del resto de sondas de la matriz se dividen por la señal emitida por las sondas control normalizando así las medidas. Prácticamente se puede usar cualquier sonda como control de normalización. Sin embargo, es conocido que la eficacia de la

hibridación varía en función de la composición de nucleótidos y la longitud de la sonda. Por tanto, sondas de normalización preferidas son aquellas que representan la longitud media de las sondas presentes en la matriz, aunque pueden ser seleccionadas de forma que recojan un rango de longitudes que reflejen el resto de sondas presentes en la matriz. Las sondas de normalización pueden ser diseñadas de forma que reflejen la composición media de nucleótidos del resto de sondas presentes en la matriz. Preferiblemente, se utiliza un número limitado de sondas de normalización seleccionadas de forma que hibridan adecuadamente, es decir, no presentar estructura secundaria y no muestran similitud de secuencia con ninguna de las sondas de la matriz. Las sondas de normalización pueden localizarse en cualquier posición en la matriz o en múltiple posiciones en la matriz para controlar de forma eficiente variaciones en la eficiencia de hibridación relacionadas con la estructura de la matriz. Preferiblemente, los controles de normalización se localizan en las esquinas de la matriz y/o en el centro de la misma.

15

Los controles de los niveles de expresión son sondas que hibridan de forma específica con genes que se expresan de forma constitutiva en la muestra que se analiza. Los controles de nivel de expresión están diseñados para controlar el estado fisiológico y la actividad metabólica de la célula. El examen de la covarianza del control del nivel de expresión con el nivel de expresión del ácido nucleico diana indica si las variaciones en los niveles de expresión son debidas a cambios en los niveles de expresión o son debidas a cambios en la tasa transcripcional global en la célula o en su actividad metabólica general. Así, en el caso de células que presentan deficiencias en un determinado metabolito esencial para la viabilidad celular, se espera que se observe una disminución tanto en los niveles de expresión del gen diana como en los niveles de expresión del control. Por otro lado, si se observa un aumento en la expresión de la expresión del gen diana y del gen control, es probable que se deba a un aumento de la actividad metabólica de la célula y no a un aumento diferencial en la expresión del gen diana. Se puede emplear cualquier sonda que corresponda a un gen expresado de forma constitutiva tales como genes que codifican para proteínas que ejercen funciones esenciales de las células tales como β -2-microglobulina, ubiquitina, proteína ribosomal 18S, ciclofilina A, receptor de transferina, actina, GAPDH y similares. En una forma preferida de realización, los controles de los niveles de expresión son *GAPDH*, proteína de activación de la tirosina 3-monooxigenasa/triptófano 5-monooxigenasa (*YWHAZ*), ubiquitina, beta-actina y β -2-microglobulina.

35

Los controles de hibridación se pueden incluir tanto para las sondas dirigidas a los genes diana como para las sondas dirigidas al nivel de expresión o a los controles de normalización. Los controles de error son sondas de oligonucleótidos idénticas a las sondas dirigidas a los genes diana pero que contienen mutaciones en uno o varios nucleótidos, es decir, que contienen nucleótidos en ciertas posiciones que no hibridan con el nucleótido correspondiente en el gen diana. Los controles de hibridación se seleccionan de forma que, aplicando las condiciones adecuadas de hibridación, el gen diana debería hibridar con la sonda específica pero no con el control de hibridación o con una eficiencia reducida. Preferiblemente, los controles de hibridación contienen una o varias posiciones modificadas en el centro de la sonda. Los controles de hibridación proporcionan por tanto una indicación del grado de hibridación inespecífica o de hibridación cruzada a un ácido nucleico en la muestra a una sonda distinta a la que contiene la secuencia exactamente complementaria.

15 Materiales adecuados para su inclusión en un kit ejemplar de acuerdo con la presente invención comprenden uno o más de los siguientes: pares de cebadores específicos para PCR (oligonucleótidos) que hibridan con dominios de la secuencia de ADN o cDNA que flanquean los polimorfismos genéticos de interés; reactivos capaces de amplificar un dominio de una secuencia específica, ya sea en el ADN genómico o cDNA sin el requisito de la realización de PCR; reactivos necesarios para discriminar entre los distintos alelos en la secuencia de los dominios amplificados por PCR y PCR-no amplificación (por ejemplo, las endonucleasas de restricción, oligonucleótidos que hibridan preferentemente a un alelo del polimorfismo, incluidos los modificados para contener enzimas o grupos químicos fluorescentes que amplifican la señal de los oligonucleótidos y que hacen la discriminación de los alelos más robusta); reactivos necesarios para separar físicamente los productos derivados de los diferentes alelos (por ejemplo agarosa o poliacrilamida y un tampón para ser utilizado en la electroforesis, columnas de HPLC, geles SSCP, geles formamida o un soporte de la matriz de MALDI-TOF), o incluso, reactivos capaces de identificar polipéptidos y sus variantes según la invención, por ejemplo, anticuerpos (incluyendo los anticuerpos monoclonales, policlonales o intactos y fragmentos de los mismos, así como anticuerpos recombinantes, etc) capaces de reconocer y unirse a dichos polipéptidos o variantes del mismo.

35 Usos de los kits de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso del kit de la invención para diagnosticar melanoma cutáneo, para determinar la probabilidad de metástasis de un sujeto diagnosticado con melanoma cutáneo o para diferenciar un nevus benigno de melanoma.

5

La invención se describe ahora en detalle por medio de los siguientes ejemplos que se deben considerar como meramente ilustrativos y no limitantes del ámbito de la invención.

10

EJEMPLO 1

Identificación de marcadores para el diagnóstico y pronóstico de melanoma cutáneo

Para la realización de este Ejemplo se han utilizado los Materiales y Métodos que se describen a continuación.

15

1.1 Materiales y Métodos

Líneas celulares

20

Las líneas celulares de melanoma maligno fueron:

25

– 1205Lu (ATCC CRL-2812): línea celular de melanoma establecida por M. Herlyn. Deriva de una metástasis pulmonar tras inyección subcutánea de la línea celular comercial de melanoma humano WM793B en un ratón inmunodeficiente. Las células 1205Lu son altamente invasivas y muestran metástasis espontáneas en pulmón e hígado. Esta línea fue adquirida en 2007 a través de la American Type Culture Collection (ATCC).

30

– A375 (ATCC CRL-1619): línea celular de melanoma establecida por D.J. Giard en 1973, a partir de un tumor sólido en una mujer de 54 años de edad. Esta línea presenta un cariotipo hiperploide con un número modal de cromosomas de 62 y es capaz de producir tumores subcutáneos amelanocíticos cuando es inoculada en ratones atímicos. Esta línea fue adquirida en 1996 a través de la ATCC.

35

– COLO-800 (ACC 193): línea celular de melanoma aislada por G. E. Moore en 1990 a partir de un nódulo subcutáneo de un tumor en un varón de 14 años de

edad. Esta línea fue adquirida en 2010 a través de la empresa Innoprot (Bizkaia).

- 5 – Hs294T (ATCC HTB-140): línea celular de melanoma establecida por A. Creasey en 1969, a partir de un melanoma metastático de un nódulo linfático en una mujer caucasoide de 56 años de edad. Es una línea celular hiperploide con un número modal de cromosomas de 65 en al menos el 44% de las células. Esta línea fue adquirida en 1996 a través de la ATCC.
- 10 – HT-144 (ATCC HTB 63): línea celular de melanoma establecida por J. Fogh, a partir de un melanoma maligno metastático en un varón de 26 años de edad. Análisis citogenéticos muestran poliploidía con anormalidades que incluyen fragmentos acrocéntricos y constricciones secundarias. Esta línea fue adquirida en 1996 a través de la ATCC.
- 15 – MEL-HO (ACC62): línea celular de melanoma establecida por H. W. L. Ziegler-Heitbrock en 1976, a partir de un melanoma primario en una mujer de edad desconocida. Esta línea fue adquirida en 2010 a través de la empresa Innoprot (Bizkaia).
- 20 – MEL-Juso (ACC74): línea celular de melanoma establecida por H. W. L. Ziegler-Heitbrock en 1977, a partir de un melanoma primario en una mujer de 58 años de edad. Esta línea fue adquirida en 2010 a través de la empresa Innoprot (Bizkaia).
- 25 – RPMI7951 (ACC76): línea celular de melanoma establecida por H. Kirchner en 1971, a partir de una metástasis en ganglio linfático de una mujer caucasoide de 18 años de edad. Esta línea fue adquirida en 2010 a través de la empresa Innoprot (Bizkaia).
- 30 – WM793B (ATCC CRL-2806): línea celular de melanoma establecida por M. Herlyn en 1983, a partir de un melanoma primario en crecimiento vertical localizado a la altura del esternón de un varón de 37 años de edad. Muestra una translocación entre los cromosomas 1 y 19, además de poseer una copia extra del cromosoma 7. Esta línea fue adquirida en 2007 a través de la ATCC.
- 35 – M980513: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en 1998 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de una metástasis de nódulo linfático ilíaco encontrada en una mujer de 42 años de edad.
- M080423: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en 2008 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir

de una metástasis de nódulo linfático hepatoduodenal encontrada en una mujer de 65 años de edad.

- 5 – M050829: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en 2005 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de una metástasis cutánea retroauricular encontrada en un varón de 39 años de edad.
- 10 – M000921: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en el año 2000 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de una metástasis epigástrica encontrada en una mujer de 52 años de edad.
- M010817: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en 2001 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de una metástasis cutánea localizada en la extremidad superior izquierda de una mujer de 37 años de edad.
- 15 – M080201: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en el año 2008 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de un melanoma primario encontrado en una mujer de 64 años de edad.
- M080310: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en el año 2008 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de un melanoma primario encontrado en una mujer de 71 años de edad.
- 20 – M080214: línea celular de melanoma establecida por el grupo del Dr. Hoek en 2.008 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de una metástasis subcutánea localizada en el muslo izquierdo de una mujer de 55 años de edad.
- 25 – M080307: línea celular de melanoma establecida por Dr. Hoek en 2.008 (Hospital Universitario de Zurich, Suiza). Esta línea fue obtenida a partir de una metástasis axilar encontrada en un varón de 55 años de edad.
- 30 – JSG: línea de melanoma obtenida en el laboratorio de los inventores en 1997 (Dra. Boyano, Universidad del País Vasco, Bizkaia). Esta línea fue establecida a partir de un tumor primario localizado en el pie de un varón de 71 años de edad. El tumor fue diagnosticado en estadio IIB según la clasificación de AJCC. La evolución de la enfermedad no fue buena, apareciendo metástasis ganglionar 5 meses después de la extirpación del tumor primario. Tres meses después se detectaron metástasis en tránsito y a distancia, y transcurridos 5
- 35 meses el paciente falleció.

Las líneas celulares de melanocitos de piel son las siguientes:

- La mayoría de las líneas de melanocitos epidérmicos humanos utilizadas en el presente trabajo fueron adquiridas a través de Cascade Biologics en 2007.
- HEMn-LP (C-002-5C): melanocitos aislados de piel de neonato con baja pigmentación.
- HEMn-MP (C-102-5C): melanocitos aislados de piel de neonato con pigmentación media.
- HEMn-DP (C-202-5C): melanocitos aislados de piel de neonato con alta pigmentación.
- La última línea de melanocito HEM (P10853) fue adquirida en 2010 a través de la empresa Innoprot (Bizkaia). Al igual que HEMn-LP, se trata de un cultivo primario de melanocitos humanos aislados de piel de un individuo neonato con baja pigmentación.

Los melanocitos humanos primarios fueron adquiridos de Invitrogen (Cat No. C-002-5C de prepucio neonatal ligeramente pigmentado, HEMn-LP; Cat. No. C-102-5C de prepucio neonatal moderadamente pigmentado, HEMn-MP; y Cat No. C-202-5C de prepucio neonatal pigmentación oscura, HEMn-DP) y de Innoprot (Cat. No. P10853 de prepucio neonatal ligeramente pigmentada) .

Todos los melanocitos humanos primarios crecieron en Cascade Media 254 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) suplementado con suplemento de crecimiento de melanocitos humanos Cascade (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), en ausencia de antibióticos. Las líneas celulares de melanoma A375 (ATCC CRL-1619), Hs294T (ATCC HTB-140), JSG (aislado por Boyano MD), RPMI7951 (ACC76) se cultivaron en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), L-glutamina 2 mM, 50 mg/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin. La línea celular de melanoma HT-144 (ATCC HTB-63) se mantuvo en medio 5A de Mc Coy complementado con FBS al 10%, 0,22 g/L de L-glutamina y bicarbonato de sodio. La líneas celulares de melanoma WM793B (ATCC CRL-2806) y 1205Lu (ATCC CRL-2812) se cultivaron en 2% del tumor mediano que contiene una mezcla 4:1 de medio MCDB 153 con 1,5 g/L de bicarbonato de sodio y medio L-15 de Leibovitz con L-glutamina 2 mM, y a continuación, suplementado con 2% de FBS, 0,005 mg/ml de insulina bovina y 1,68 mM de CaCl₂. Las líneas celulares de melanoma COLO-800 (ACC193), MEL-HO (ACC62), y MEL-Juso (ACC74) se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS, 5% de glutamina y

piruvato de sodio 1 mM. Las líneas celulares de melanoma A375, Hs294T, HT-144, WM793B y 1205Lu fueron adquiridas a la ATCC (Rockville, MD, EE.UU.); RPMI7951, COLO-800, MEL-HO (ACC62) y MEL-Juso (ACC74) se obtuvieron de Innoprot (Derio, Bizkaia, España). Todos los melanocitos humanos primarios y líneas celulares de melanoma se cultivaron 95% de confluencia a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

La Tabla 1 muestra las diferentes condiciones de cultivo de las líneas celulares de melanoma y melanocitos.

10

Tabla 1

Línea celular	Condiciones de cultivo
A375, Hs294T, JSG, RPMI7951	Medio DMEM 10% FCS L-glutamina 2 mM Penicilina 100 UI/ml estreptomycin 100 µg/ml
HT-144	Medio McCoy's 5 ^a Bicarbonado sódico L-glutamina 0,22 g/L FCS 10%
1205Lu, WM793B	Dilución 4:1 de medio MCDB 153 con 1,5 g/L bicarbonato sódico Medio Leibovitz's L-15 con 2 mM L-glutamina más insulina bovina 0,005 mg/ml CaCl ₂ 1,68 mM FCS 2%
COLO-800, MEL-HO, MEL-JUSO	Medio RPMI 1640 con GlutaMax HEPES 25 mM FCS 10%
M980513, M080423, M050829, M000921, M010817, M080201, M080310, M080214, M080307	Medio RPMI 1640 piruvato sódico 1 mM FCS 10% Glutamina 5 mM
HEMn-LP, HEMn-MP, HEMn-DP,	Medio 254 Suplemento de crecimiento de melanocito humano 1%

15 Expresión génica por RT-PCR cuantitativa

El ARN total fue aislado utilizando RNeasy Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Alemania) y para cada muestra, el ADNc se sintetizó a partir de 1 mg de ARN total usando el kit de síntesis de *ADNc iScript™* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos de RT-PCR en tiempo real se llevaron a cabo utilizando una plataforma PCR iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). La mezcla de reacción contenía 0,1 µl de ADNc a partir de la reacción de transcripción inversa, junto con cebadores directos e inversos específicos y *IQ™ SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.) en un volumen final de reacción de 20 µl. La reacción de PCR se inició con calentamiento a 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, a la temperatura correspondiente para cada gen (56-61°C) durante 20 s y extensión a 72°C durante 30 s. Cada ensayo incluyó un control negativo que consistió en la ausencia de ADNc. Los datos de expresión se generaron a partir de 2 reacciones de amplificación con las muestras y los controles ejecutados por triplicado. Los datos ópticos obtenidos por PCR en tiempo real fueron analizados utilizando el *MyiQ Single-Color de Real-Time PCR System Software Detection, Version 1.0* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.). Se determinó la curva de fusión de cada ensayo de PCR y se analizaron en electroforesis en gel de agarosa 1,5% muestras seleccionadas al azar para confirmar la especificidad de los productos de amplificación. La expresión de tres genes constitutivos (*ACTB*, *GAPDH*, y *RPS15*) también se analizó para normalizar los datos de expresión utilizando *Gene Expression Macro Software Version 1.1* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.), donde se calcularon los valores de expresión relativa por el método comparativo Ct (Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. *Genome Biol.* 2002 Jun 18; 3(7)).

La Tabla 2 muestra los parejas de cebadores utilizados en los ensayos de RT-qPCR.

Tabla 2

Genes de referencia				
Gen	Secuencia cebadores	Tamaño del amplicón (pb)	Tm (°C)	Optimización curva estándar
<i>β-actina</i> (<i>ACTB</i>)	Fw 5'-AGATGACCCAGATCATGTTTGAG-3' (SEQ ID NO: 1) Rev 5'-GTCACCGGAGTCCATCACG-3' (SEQ ID NO: 2)	119	60	r = 0,999 Ef = 93%
<i>GAPDH</i>	Fw 5'-CCTGTTTCGACAGTCAGCCG-3' (SEQ ID NO: 3) Rev 5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3'(SEQ ID NO: 4)	102	56	r = 0,999 Ef = 95,5%
<i>RPS15</i>	Fw 5'-TTCCGCAAGTTCACCTACC-3' (SEQ ID NO: 5) Rev 5'-CGGGCCGGCCATGCTTTACG-3' (SEQ ID NO: 6)	360	60	r = 0,999 Ef = 90%

Genes de estudio				
Gen	Secuencia cebadores	Tamaño del amplicón (pb)	Tm (°C)	Optimización curva estándar
<i>BCL2</i>	Fw 5'-GGGGAGGATTGTGGCCTTC-3' (SEQ ID NO: 7) Rev 5'-CAGGGCGATGTTGTCCACC-3' (SEQ ID NO: 8)	94	61	r = 0,998 Ef = 99,7%
<i>BCL3</i>	Fw 5'-AACCTGCCTACACCCCTATACC-3' (SEQ ID NO: 9) Rev 5'-GCACCACAGCAATATGGAGAG-3'(SEQ ID NO: 10)	120	55	r = 0,997 Ef = 93%
<i>M-MITF</i>	Fw 5'-CTCGAAAACCCACCAAGTA-3' (SEQ ID NO: 11) Rev 5'-GACATGGCAAGCTCAGGACT-3' (SEQ ID NO: 12)	115	55	r = 0,992 Ef = 93%

	ID NO: 12)			
<i>PEBP1</i>	Fw 5'-AATAGACCCACCAGCATTTTCG-3' (SEQ ID NO: 13) Rev 5'-GTGCCACTGCTGATGTCATTG-3' (SEQ ID NO: 14)	161	61	r = 0,998 Ef = 94,5%
<i>PIR</i>	Fw 5'-GGAGCCTCAGTACCAGGAACT-3' (SEQ ID NO: 15) Rev 5'-CTTGGACTTTATTCCCAGGGC-3' (SEQ ID NO: 16)	106	61	r = 0,999 Ef = 97%

Análisis estadístico

- 5 El nivel de significación estadística entre las medias de las muestras se determinó a través de la prueba t de Student. El valor p fue considerado estadísticamente significativo cuando $p < 0,05$ y límite significativo cuando $p > 0,05$ y $< 0,01$.

10 Con todos los datos obtenidos de los marcadores tumorales analizados se realizó un análisis de los componentes principales. El análisis de componentes principales es un procedimiento matemático que transforma un conjunto de variables posiblemente correlacionadas en un conjunto menor de variables no correlacionadas llamadas "componentes principales". Así, dadas "n" observaciones de "p" variables, el objetivo del análisis de componentes principales es determinar "r" nuevas variables no correlacionadas llamadas componentes principales que representen la mayor variabilidad posible de las variables originales. Teniendo en cuenta el amplio conjunto de variables analizadas en el presente trabajo (niveles proteicos y expresión génica a nivel transcripcional), se realizó un análisis de componentes principales con el fin de facilitar la interpretación del conjunto de datos. De esta manera, se puede determinar

15 cómo se agrupan las líneas tumorales en función de los nuevos componentes principales y evaluar si la clasificación obtenida puede ser útil para el diagnóstico y/o pronóstico clínico.

25 El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS versión 19. Para ello, los datos obtenidos de la cuantificación proteica por Western blot y de la expresión génica

por RT-qPCR fueron normalizados para generar variables con media cero y varianza uno. A continuación, con el fin de facilitar la interpretación del significado de los factores seleccionados se llevo a cabo una rotación de los ejes factoriales. Uno de los métodos más corrientes, y el que se ha utilizado en el presente trabajo, es la rotación
 5 ortogonal Varimax, que fue desarrollada por Kaiser. El objetivo de la rotación Varimax es conseguir que la correlación de cada una de las variables sea lo más próxima a 1 con sólo uno de los factores y próxima a cero con todos los demás.

1.2 Resultados

10

En las Figuras 1 y 2 se muestran los niveles de ARNm de *PIR* y *PEBP1* en líneas celulares de melanoma. Dichos genes están reprimidos de manera significativa en comparación con la expresión de dichos genes en las células de melanocitos normales (los valores de p son 0,00084 y 5,11E-08, respectivamente). Por el contrario, en la
 15 Figura 3 puede verse que *BCL3* está sobreexpresado en líneas celulares de melanoma (valor de $p = 0,0033$).

Los resultados sugieren que la actividad transcripcional del gen *PIR* podría ser utilizada como marcador de la progresión maligna del melanoma, ya que su expresión
 20 está reprimida en todas las líneas celulares de melanoma ensayadas. Además, las líneas celulares de melanoma se caracterizan por la represión de la actividad transcripcional del gen *PEBP1*, junto con la sobre expresión del gen *BCL3*. Por lo tanto, el estudio de los niveles de transcripción de estos genes puede servir como marcadores que diferencian a células de melanoma de melanocitos y nevus.

25

Se analizó la expresión de *M-MITF* (una isoforma específica de melanocitos) en todas las líneas celulares de melanoma y melanocitos normales. Este factor de transcripción contiene una hélice-bucle-hélice de base de dominio de cremallera de leucina involucrado en el desarrollo y la supervivencia de melanocitos. Sin embargo, se
 30 encontró una supresión transcripcional de los niveles de *M-MITF* en el 70% de líneas celulares de melanoma evaluadas, mientras que las tres líneas de células restantes expresaban niveles similares de *M-MITF* a las encontradas en cultivos primarios de melanocitos (Figura 4).

35 Por lo tanto, se concluyó que los niveles de expresión de *M-MITF* son elevados en líneas celulares de melanoma que se encuentran en un período de proliferación, en el

que al mismo tiempo actúa como un factor de transcripción de genes implicados en la progresión del ciclo celular y como un represor transcripcional de genes implicados en la invasión. Mientras que los niveles de expresión de *M-MITF* disminuyen cuando las células tumorales adquieren la capacidad de invadir (Koludrovic y Davidson, Future
5 Oncol. 2013 Feb; 9(2):235-44).

A pesar de la evidencia que muestra una disminución de la expresión del gen *M-MITF* en células de melanoma, la expresión de este factor de transcripción es esencial para la supervivencia y la proliferación celular a través de regulación de la transcripción de
10 diferentes genes, como *BCL2* (McGill et al. Cell. 2002 Jun 14; 109(6):707-18). De hecho, en las líneas celulares de melanoma analizadas, la expresión de *BCL2* se correlaciona directamente con la expresión de *M-MITF* (Figura 5). Por lo tanto, las líneas celulares de melanoma proliferativo MEL-HO, MEL-Juso y COLO-800 expresaban los genes *M-MITF* y *BCL2* igual que los melanocitos. Por el contrario, las
15 líneas celulares de melanoma invasivo A375, Hs294T, HT144, 1205Lu, WM793B, JSG y RPMI7951 mostraron una expresión reprimida de *M-MITF* y de *BCL2* en comparación con melanocitos normales y líneas de melanoma proliferativas (véanse las Figuras 4 y 5).

Por otro lado, a pesar de que todas las líneas celulares de melanoma evaluadas mostraban niveles de *PIR* por debajo de los niveles encontrados en cultivos primarios de melanocitos, existe cierta heterogeneidad entre las líneas de células tumorales que nos permite hacer dos grupos. Así, los cultivos primarios de melanocitos mostraban una alta actividad transcripcional del gen *PIR*, a los que los inventores denominaron
25 "Pir+++". Sin embargo, dentro de las líneas celulares de melanoma ensayadas, había un grupo con poca/ninguna expresión de *PIR*, denominado por los inventores "Pir-", y otro grupo de líneas celulares de melanoma que expresan niveles intermedios de *PIR* entre Pir- y melanocitos Pir+++ , a las que los inventores denominaron "Pir+".

En cuanto a los datos obtenidos, los inventores han encontrado que las líneas celulares de melanoma Pir+ mostraban una mayor expresión de los genes *M-MITF* y *BCL2* que las líneas celulares de Pir-. Esta correlación de los niveles de expresión se puede explicar debido a que ambos *BCL2* y *PIR* son objetivos transcripcionales de *M-MITF*. Por tanto, a las líneas celulares de melanoma MEL-HO, MEL-Juso y COLO-800 que expresan *M-MITF*, *BCL2* y *PIR* se les asigna un fenotipo proliferativo, mientras
35 que las líneas celulares de melanoma A375, Hs294T, HT-144, 1205Lu, WM793B, JSG

y RPMI7951, con baja actividad transcripcional de los genes *M-MITF*, *BCL2* y *PIR*, se agrupan en un fenotipo invasivo.

Los datos sugieren que la disminución de la expresión de *M-MITF*, *BCL2* y *PIR* en las células del melanoma da lugar a que las células tumorales adquieran capacidad de migración e invasión.

La Tabla 3 muestra un resumen de los cambios observados en la expresión génica en líneas celulares de melanoma en comparación con cultivos primarios de melanocitos.

Tabla 3

Gen	Alteración	Nºde melanomas	Student's t-test (p-value)
<i>PEBP1</i>	Disminuye	17/19	5,11E-08
<i>PIR</i>	Disminuye	19/19	0,00084
<i>M-MITF</i>	Disminuye	7/10	0,011
<i>BCL2</i>	Disminuye	7/10	0,014
<i>BCL3</i>	Aumenta	10/10	0,0033

La Tabla 3 muestra por columnas: los genes analizados mediante RT-qPCR, el tipo de alteración que presentan los niveles de ARNm en las líneas de melanoma respecto a los melanocitos; el número de líneas de melanoma que presentan un cambio estadísticamente significativo con respecto al total de las líneas analizadas; y el p-valor obtenido tras realizar la prueba t de Student.

Finalmente, se realizó un análisis de componentes principales con los datos normalizados de expresión relativa correspondientes a los genes *PIR*, *BCL2*, *BCL3*, *PEBP1* y *M-MITF* de 6 líneas celulares de melanoma invasivo (A375, HS294T, HT144, 1205LU, WM793B y JSG), 3 líneas celulares de melanoma proliferativos (MEL-HO, MEL-JUSO y COLO-800) y 3 cultivos de melanocitos primarios humanos sanos (HEMn-LP, HEMn-MP y HEMn-DP).

Los resultados indican que el primer componente principal recoge el 78,7% de la varianza total del experimento (Tabla 4), mientras que los restantes ejes contribuyen de manera poco significativa a la varianza total explicada.

Tabla 4
Varianza total explicada

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
1	3,935	78,700	78,700	3,935	78,700	78,700
2	0,531	10,613	89,313			
3	0,406	8,129	97,443			
4	0,092	1,831	99,274			
5	0,036	0,726	100,000			

Método de extracción: Análisis de Componentes principales.

Los coeficientes de cada gen para el cálculo de las coordenadas sobre el primer componente se muestran en la Tabla 5.

5

Tabla 5
Matriz de coeficientes para el cálculo de las puntuaciones en las componentes

	Componente	
	1	
<i>PIR</i>	0,228	
<i>PEBP</i>	0,240	
<i>1</i>	0,228	
<i>BCL2</i>	-0,201	
<i>M-</i>	0,228	
<i>MITF</i>		

Método de extracción: Análisis de componentes principales.

Método de rotación: Normalización Varimax con Kaiser.

Puntuaciones de componentes.

Un sistema basado en la expresión de estos genes usando la matriz de coeficientes para este primer eje principal permite clasificar visualmente los distintos tipos de melanocitos (Figura 6).

10

TRADUCCIÓN AL CASTELLANO DE LOS TÉRMINOS DE LA LISTA DE SECUENCIAS

El término "Sequence listing" en la lista de secuencias se refiere a "Lista de
5 secuencias", "Artificial Sequence" a "Secuencia artificial" y el término "DNA" se refiere
a "ADN".

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para diagnosticar melanoma cutáneo que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión del marcador PIR en una muestra de un sujeto, y
- b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

en donde un nivel de expresión disminuido de PIR con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicho sujeto padece un melanoma cutáneo.

2. Método *in vitro* según la reivindicación 1, que comprende además, determinar el nivel de expresión de los marcadores BCL-3 y/o PEBP1.

3. Método *in vitro* para determinar la probabilidad de metástasis en un sujeto diagnosticado con melanoma cutáneo que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión del marcador PIR en una muestra obtenida de un sujeto, y
- b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

en donde un nivel de expresión disminuido de PIR, con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicho sujeto padece alta probabilidad de desarrollar metástasis.

4. Método *in vitro* según la reivindicación 3, que comprende además determinar el nivel de expresión de los marcadores M-MITF y BCL2.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la muestra es una muestra de tejido.

6. Método *in vitro* para diferenciar nevus benigno de melanoma en una lesión cutánea que comprende:

- a) determinar el nivel de expresión del marcador PIR, en una muestra de tejido de dicha lesión cutánea, y
- b) comparar el nivel obtenido en la etapa a) con un valor de referencia para dicho marcador,

en donde un nivel de expresión disminuido de PIR con respecto al valor de referencia para dicho marcador es indicativo de que dicha lesión cutánea es melanoma.

7. Método según la reivindicación 6, en donde el nevus benigno es nevus displásico o nevus de Spitz.

8. Método *in vitro* según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7, que comprende además, determinar el nivel de expresión de BCL-3 y/o PEBP1.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el nivel de expresión del marcador se determina por medio de inmunohistoquímica, Western blot, ELISA o una matriz de proteínas.
- 5 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el nivel de expresión del marcador se determina mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o por medio de una matriz de ADN o de ARN o mediante técnicas de hibridación de nucleótidos.
11. Kit que comprende un anticuerpo monoclonal específico para el marcador PIR o una pareja de cebadores que hibrida específicamente con el polinucleótido que codifica PIR.
- 10 12. Uso de un kit según la reivindicación 11, para diagnosticar melanoma cutáneo, para determinar la probabilidad de metástasis de un sujeto diagnosticado con melanoma cutáneo o para diferenciar un nevus benigno de melanoma.

.....

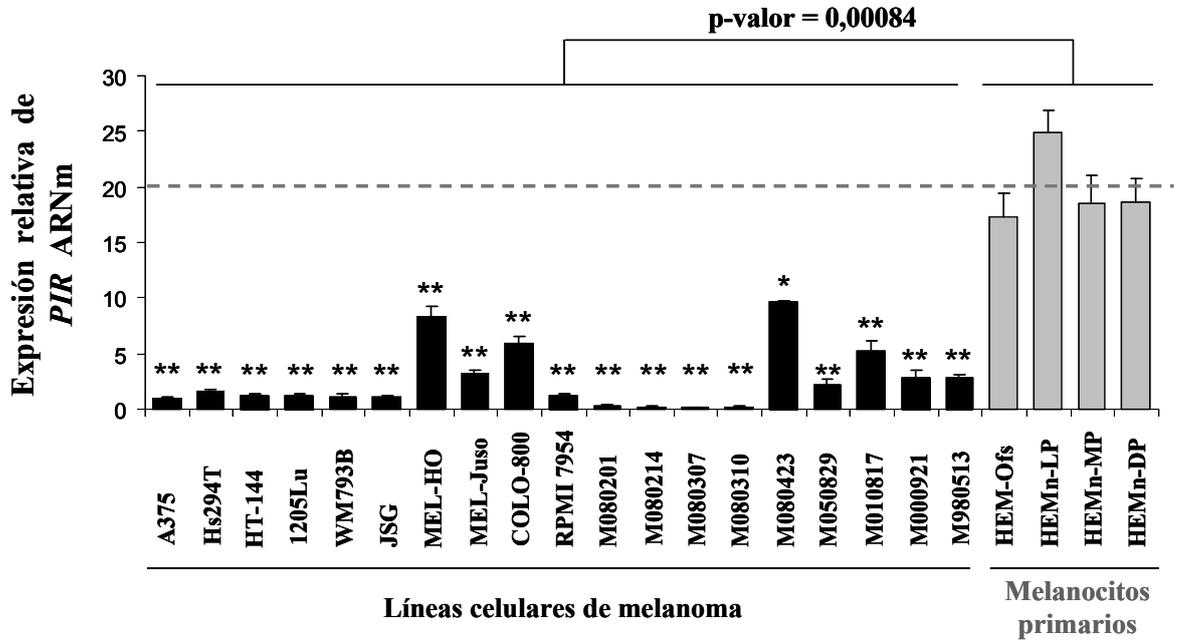


Fig. 1

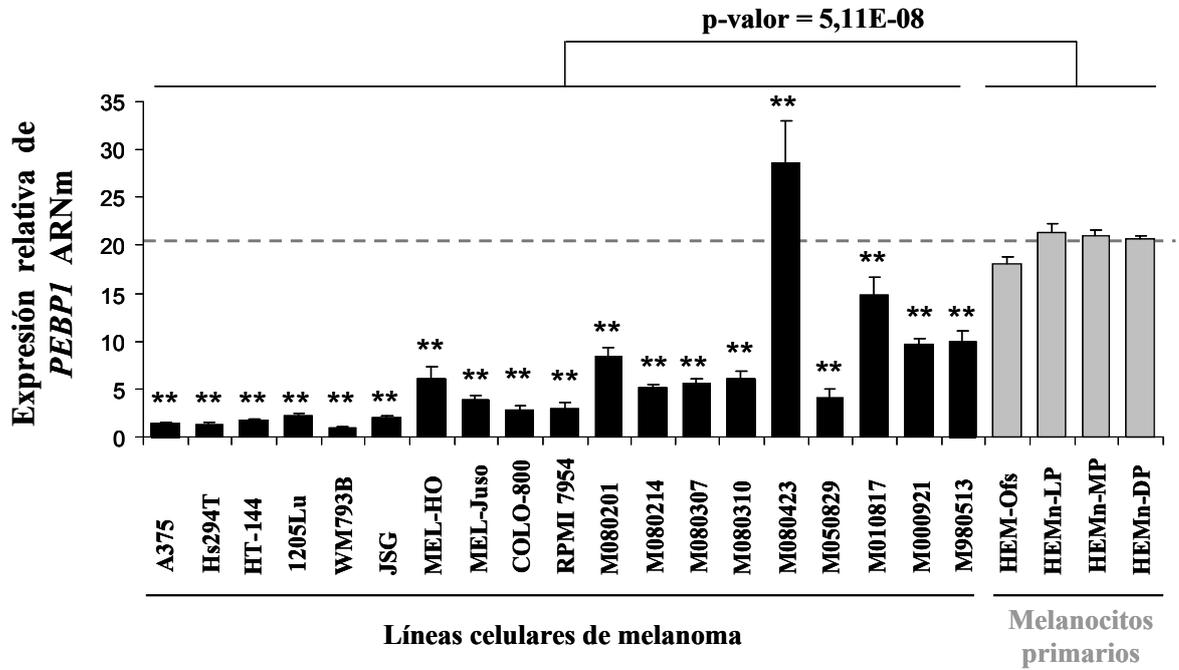


Fig. 2

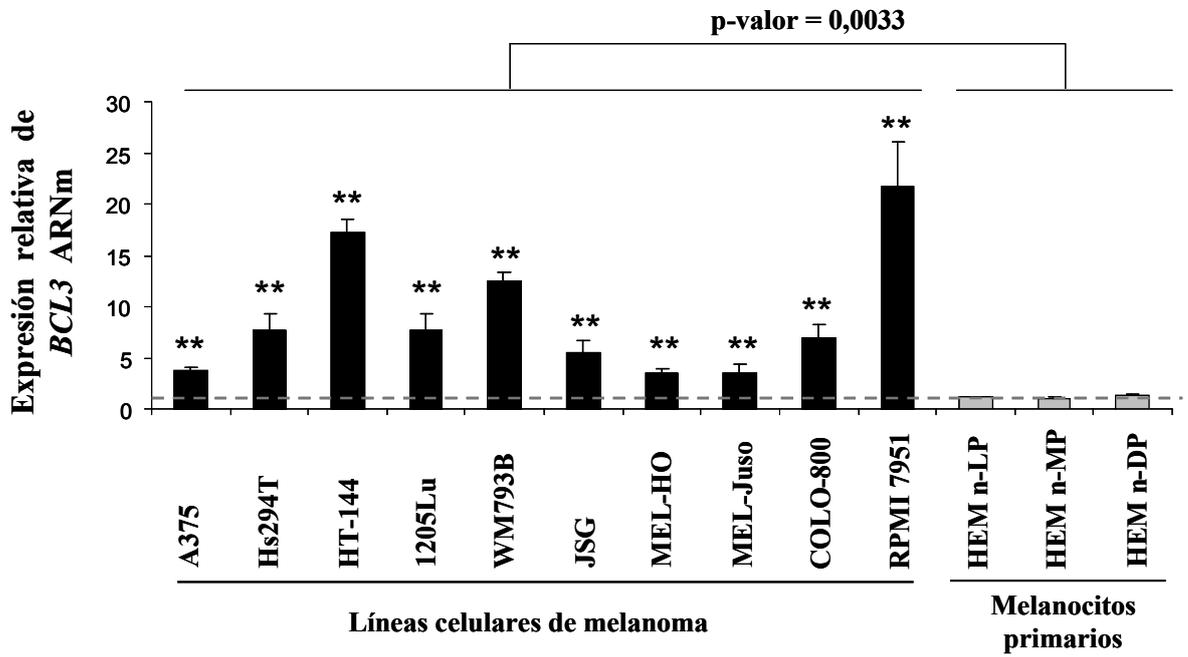


Fig. 3

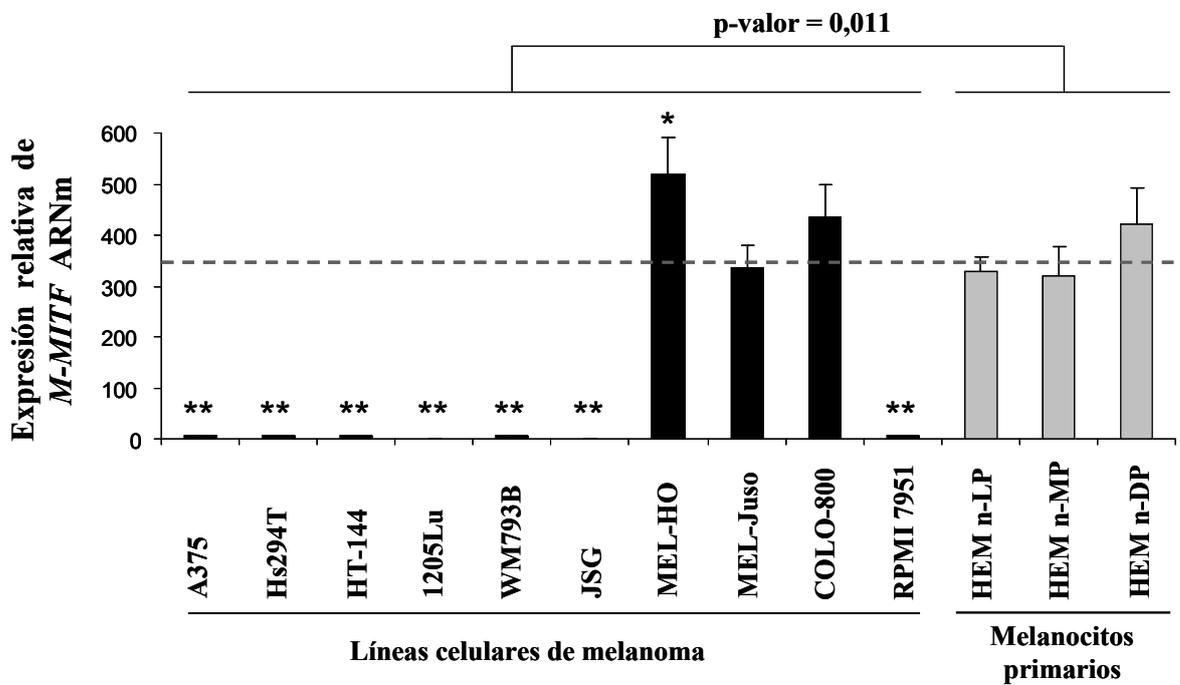


Fig. 4

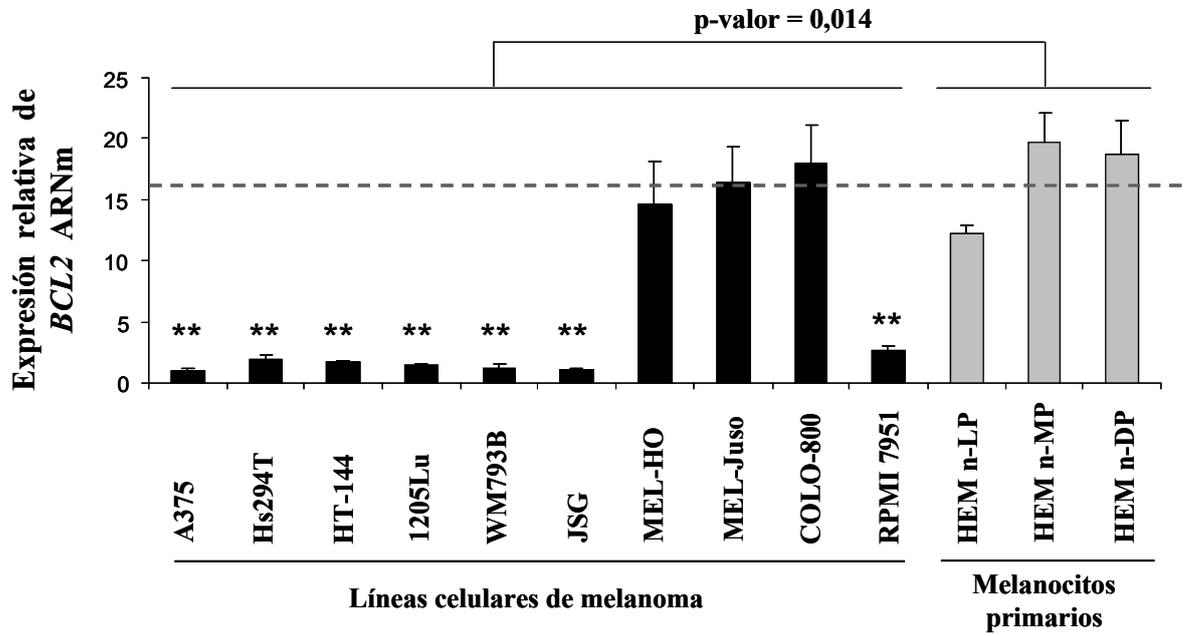


Fig. 5

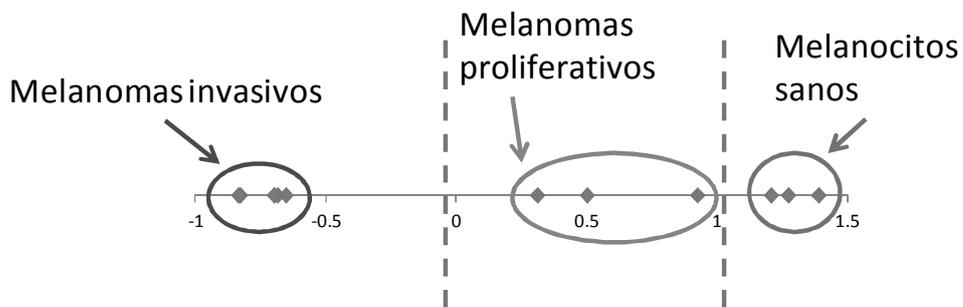


Fig. 6

ÁÁÁÁÁ

LISTAS DE SECUENCIAS

<110> Universidad del País Vasco

Administración General de la Comunidad Autónoma de Euskadi -
Osakidetza

<120> Método de diagnóstico y pronóstico de melanoma cutáneo

<130> P10196ES00

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo beta actina

<400> 1

agatgaccca gatcatgttt gag

23

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 532 516 A1

<220>

<223> Cebador reverso beta actina

<400> 2

gtcaccggag tccatcacg

19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo GAPDH

<400> 3

cctgttcgac agtcagccg

19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador reverso GAPDH

<400> 4

cgaccaaadc cgttgactcc

20

ES 2 532 516 A1

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo Rig/S15

<400> 5

ttccgcaagt tcacctacc

19

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador reverso Rig/S15

<400> 6

cgggccggcc atgctttacg

20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 532 516 A1

<220>

<223> Cebador directo BCL2

<400> 7

ggggaggatt gtggccttc

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador reverso BCL2

<400> 8

cagggcgatg ttgtccacc

19

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo BCL3

<400> 9

aacctgccta caccctata cc

22

ES 2 532 516 A1

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador reverso BCL3

<400> 10

gcaccacagc aatatggaga g

21

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo M-MITF

<400> 11

ctcgaaaacc ccaccaagta

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

ES 2 532 516 A1

<220>

<223> Cebador reverso M-MITF

<400> 12

gacatggcaa gctcaggact

20

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo PEBP1

<400> 13

aatagaccca ccagcatttc g

21

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador reverso PEBP1

<400> 14

gtgccactgc tgatgtcatt g

21

ES 2 532 516 A1

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador directo PIR

<400> 15

ggagcctcag taccaggaac t

21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Cebador reverso PIR

<400> 16

cttggacttt attcccaggg c

21



21 N.º solicitud: 201331404

22 Fecha de presentación de la solicitud: 26.09.2013

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)
G01N33/574 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LICCIULLI, S., LUISE, C., SCAFETTA, G et al. Pirin Inhibits Cellular Senescence in Melanocytic Cells. The American Journal of Pathology (05.2011). Vol 178, páginas 2397-2406.	1,3,5-7,9-12
X	WENDLER, W., KREMMER, E., FÖRSTER, R. et al. Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. Journal of Biological Chemistry (1997). Vol 272, páginas 8482-8489.	11
A	CARDILE, V., MALAPONTE, G., LORETO, C. et al. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and phospho-RKIP expression in melanomas. Acta histochemica (17.04.2013). Vol 115, páginas 795-802.	1-12
A	ZHUANG, L., LEE, C.S., SCOLYER, R.A et al. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. Modern Pathology (2007) Vol 20, páginas 416-426.	1-12
A	PALMIERI, G., CAPONE, M., ASCIERTO, M. L. et al. Main roads to melanoma. Journal of translational medicine, (14.10.2009), Vol 7, N° 1, páginas 1-17.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.02.2015

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES,WPI, TXTUS0-US5,TXTAU1,TXTCA1, TXTEP1, TXTWO1,TXTG1, TXTGB1, TXTSG1,BIOSIS, MEDLINE, XPESP, XPESP2, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.02.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 2,4,8	SI
	Reivindicaciones 1,3,5-7,9-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	LICCIULLI, S., LUISE, C., SCAFETTA, G et al. Pirin Inhibits Cellular Senescence in Melanocytic Cells. The American Journal of Pathology (05.2011). Vol 178, páginas 2397-2406.	05.2011
D02	WENDLER, W., KREMMER, E., FÖRSTER, R. et al. Identification of pirin, a novel highly conserved nuclear protein. Journal of Biological Chemistry (1997). Vol 272, páginas 8482-8489.	1997
D03	CARDILE, V., MALAPONTE, G., LORETO, C. et al. Raf kinase inhibitor protein (RKIP) and phospho-RKIP expression in melanomas. Acta histochemica (17.04.2013). Vol 115, Páginas 795-802.	17.04.2013
D04	ZHUANG, L., LEE, C.S., SCOLYER, R.A et al. Mcl-1, Bcl-XL and Stat3 expression are associated with progression of melanoma whereas Bcl-2, AP-2 and MITF levels decrease during progression of melanoma. Modern Pathology (2007) Vol 20, paginas 416-426.	2007
D05	PALMIERI, G., CAPONE, M., ASCIERTO, M. L. et al. Main roads to melanoma. Journal of translational medicine, (14.10.2009), Vol 7, Nº 1, páginas 1-17.	14.10.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud tiene por objeto un método in vitro para diagnosticar melanoma cutáneo que comprende determinar el nivel de expresión del marcador PIR en una muestra de sujeto, en donde un nivel de expresión disminuido de PIR es indicativo de que dicho sujeto padece un melanoma cutáneo. Así mismo, también es objeto de la presente solicitud un método de para determinar la probabilidad de metástasis en un sujeto diagnosticado con melanoma, que comprende determinar el nivel de expresión de PIR en una muestra de sujeto, en donde un nivel de expresión disminuido de PIR es indicativo de que dicho sujeto tiene alta probabilidad de padecer metástasis. Otro objeto de la presente solicitud es un kit que comprende un anticuerpo monoclonal de PIR o una pareja de cebadores que hibrida específicamente con PIR, así como el uso del mismo para diagnosticar melanoma.

D01 tiene por objeto un estudio sobre el papel de Pirin en relación con la senescencia celular en células melanocíticas.

D02 tiene por objeto el estudio de Pirin. Se llevan a cabo estudios de expresión de Pirin en distintos tejidos y estudios de inmunohistoquímica que revelan que Pirin es una proteína nuclear.

D03 tiene por objeto un estudio sobre la expresión de RKIP (PEBP1) en melanomas vs melanocitos normales. Se llevan a cabo estudios de inmunohistoquímica y por Western Blot observándose que existe una reducción considerable en la expresión de RKIP en melanomas vs melanocitos normales.

D04 tiene por objeto un estudio que analiza la expresión de diversos genes en melanomas metastásicos, no metastásicos y nevus. Entre estos, se analizan la expresión de los genes Bcl-2 y MITF concluyendo que los niveles de ambos disminuyen durante la progresión del melanoma (ver figura 2 y páginas 423-424).

D05 hace una revisión bibliográfica sobre los principales genes implicados en melanoma, entre los que se hace referencia a MITF.

NOVEDAD (Artículo 6.1 de la Ley de patentes 11/86)

El objeto de las reivindicaciones 1-12 es nuevo en el sentido del artículo 6.1 de la Ley de patentes 11/86.

ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículo 8.1 Ley 11/86)**REIVINDICACIONES 1, 3,5-7**

D01 se considera el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la presente solicitud.

En D01 se analizan los niveles de expresión de PIR en melanomas metastásicos y melanomas primarios frente a melanocitos normales. Se observa que la expresión de PIR en melanomas primarios y melanomas metastásicos es inferior al nivel de expresión de PIR en melanocitos normales (ver figura 2 A), existiendo una disminución del nivel de expresión respecto de los melanocitos normales de más de tres veces en 6/8 y 3/9 melanomas primarios y metastásicos respectivamente (ver página 2402). Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D01, un experto en la materia intentaría con una expectativa razonable de éxito utilizar PIR para llevar a cabo un método de diagnóstico de melanoma que comprendiese la determinación de su expresión.

De la misma manera, y más concretamente, puesto que los niveles de expresión de PIR son inferiores en todas las líneas celulares de melanomas metastásicos analizadas con respecto a la expresión en melanocitos normales, un experto en la materia intentaría utilizar PIR para llevar a cabo un método para determinar la probabilidad de metástasis del melanoma que comprendiese la determinación de su expresión.

Por lo tanto sobre la base de lo divulgado en D01 se considera que el objeto de las reivindicaciones 1,3 y 5-7, no implicaría actividad inventiva para el experto en la materia.

REIVINDICACIONES 9-10

En D01 los niveles de expresión de PIR se determinan por Western blot o por RT-PCR (ver páginas 2401-2402), por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 9-10 no implicaría actividad inventiva para el experto en la materia sobre la base de lo divulgado en D01.

REIVINDICACIONES 11-12

En D01 se utilizan anticuerpos policlonales anti-PIR. De la misma forma, el uso de cebadores que hibridan específicamente con el polinucleótido que codifica PIR está implícito puesto que se lleva a cabo una RT-PCR para amplificar la expresión de PIR.

El documento D02 divulga la utilización y un método de producción de anticuerpos monoclonales anti-PIRIN, así como cebadores específicos para PIR (Página 8483).

Por lo tanto, sobre la base de lo divulgado en D01 y D02, puesto que ya se conocen parejas de cebadores que hibridan con PIR así como anticuerpos anti-PIR, la inclusión de estos elementos en un kit se considera que no implica actividad inventiva para el experto en la materia.

Sobre la base de lo expuesto anteriormente, el uso de dicho kit para diagnosticar melanoma cutáneo tampoco implicaría actividad inventiva sobre la base de lo divulgado en D01.

REIVINDICACIONES 2, 4 y 8

Ninguno de los documentos citados contiene información suficiente o sugerencias que dirijan al experto en la materia a combinar el uso concreto de los marcadores reivindicados en los métodos objeto de las reivindicaciones 2, 4 y 8. Por lo tanto se considera que el objeto de las reivindicaciones 2,4 y 8 implicaría actividad inventiva para el experto en la materia en el sentido del artículo 8.1 de la Ley de patentes 11/86.

En conclusión, se considera que las reivindicaciones 1,3,5-7,9-12 carecen de actividad inventiva, mientras que las reivindicaciones 2, 4 y 8 si tienen actividad inventiva según el artículo 8.1 de la Ley de patentes 11/86.