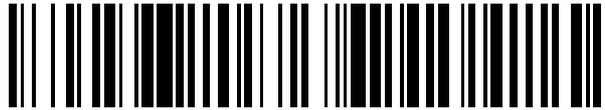


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 753**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12717232 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2694973**

54 Título: **Una firma pronóstica y terapéutica para melanoma maligno**

30 Prioridad:

01.04.2011 EP 11002747

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

04.05.2016

73 Titular/es:

**MEYER, STEFANIE (33.3%)
Liebigstrasse 17
93055 Regensburg, DE;
ETH ZURICH (33.3%) y
UNIVERSITÄT ZÜRICH (33.3%)**

72 Inventor/es:

**MEYER, STEFANIE;
BOSSERHOFF, ANJA;
WILD, PETER y
FUCHS, THOMAS**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 568 753 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Una firma pronóstica y terapéutica para melanoma maligno

- 5 La presente invención se refiere a un método de predecir el curso de enfermedad en un paciente que tiene un melanoma maligno, el método comprende determinar en células de melanoma comprendidas en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno la presencia o cantidad de al menos cinco biomarcadores seleccionados del grupo que comprende o consiste en MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1, en donde la ausencia o cantidad disminuida de MTAP y β -catenina y/o la presencia o cantidad aumentada de PTEN, Bax, Bcl-X, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1 se asocia con un curso desventajoso de la enfermedad. La presente invención se refiere además a un método de preparar una composición farmacéutica a medida para un paciente que tiene un melanoma maligno, un kit para predecir el curso de la enfermedad en un paciente que tiene un melanoma maligno, un kit para preparar una composición farmacéutica a medida para un paciente que tiene un melanoma maligno, así como una composición farmacéutica para uso en tratar o prevenir melanoma maligno.
- 10
- 15 En esta especificación, se citan un número de documentos incluyendo solicitudes de patente y manuales de fabricante.
- 20 El melanoma maligno cutáneo (MM) representa la causa más común de muerte de cáncer de piel y, aparte del cáncer de pulmón femenino, es la entidad tumoral con el mayor aumento de incidencia en el mundo¹. El melanoma maligno se caracteriza por una etiología multifactorial. Se han propuesto la exposición al sol y la susceptibilidad genética como factores etiológicos y de predisposición principales y pueden explicar el aumento descrito de incidencia en algún grado².
- 25 El estadio metastásico IV del melanoma maligno con un índice de supervivencia media a 10 años que varía del 9% al 15% (dependiendo de su patrón de metástasis)³ no se puede curar todavía y la mejora en la supervivencia global entre estos pacientes permanece un fin elusivo. A pesar de enfoques terapéuticos novedosos, el pronóstico de los pacientes que padecen melanoma maligno metastásico de estadio IV permanece desfavorable⁴.
- 30 De hecho, el pronóstico de pacientes con melanoma maligno puede solo en parte derivar de parámetros clínicos e histológicos. Según la clasificación de la AJCC 2009⁵, los descubrimientos de espesor tumoral vertical⁶, ulceración tumoral⁷ y biopsia de ganglios centinela⁸ representan los factores pronósticos más dominantes. En melanomas de estadio pT1 (espesor $\leq 1,00$), el índice mitótico (histológicamente definido como mitosis/mm²) se tiene que considerar como parámetro pronóstico adicional⁵. Estos métodos de estadificación actuales tales como espesor tumoral, ulceración e invasión del ganglio centinela se sabe que son parámetros pronósticos en pacientes con melanoma maligno. Sin embargo, perfiles de marcadores moleculares predictivos para estratificación de riesgo y optimización de terapia no están aún disponibles para evaluación clínica rutinaria.
- 35
- 40 Rothberg *et al.* 2009⁹ describen un metaanálisis de bibliografía publicada para identificar asociaciones entre expresión inmunohistoquímica y desenlaces de supervivencia en melanoma. Los marcadores prometedores identificados por Rothberg y colaboradores incluyen MUC18, MMP-2, Ki-67, PCNA y P16/INK4A. Los autores concluyen que estos resultados requieren validación en estudios con poder estadístico adecuado.
- 45 Rothberg y Rimm 2010¹⁰ describen el análisis de datos no elegibles para el metaanálisis realizado en Rothberg *et al.* 2009⁹ pero no obstante de potencial valor en proporcionar una lista priorizada de candidatos proteínas para estudios adicionales con el fin de identificar marcadores pronósticos prospectivos. Los autores proporcionan una lista de proteínas que recomiendan como un conjunto prioritario para su inclusión en estudios de pronóstico de melanoma.
- 50 Alonso *et al.* 2004¹² describen perfiles de expresión de proteínas en los diferentes estadios de evolución de melanoma maligno. Se estableció un modelo de predicción para supervivencia, que incluía las proteínas p16^{INK4A}, Ki67, P21^{CIP1} y Bcl-6. Las proteínas BCLX-L, MLH-1 y TOP2A, aunque analizadas, no se consideraron adicionalmente en el modelo pronóstico.
- 55 Wild *et al.* 2006¹³ describen una expresión reducida de MTAP en melanomas malignos primarios y en metástasis de melanomas comparados con nevos benignos. Sin embargo, en la cohorte global, la expresión de MTAP no se asoció con pronóstico. En su lugar, se encontró que la expresión de MTAP se correlacionaba con sensibilidad a terapia de interferón.
- 60 En un estudio posterior basado en una cohorte de pacientes mayor, Meyer *et al.* 2010⁴⁰ investigaron adicionalmente si la expresión de MTAP es de relevancia pronóstica o terapéutica en pacientes con melanoma. Se mostró una asociación entre inmunorreactividad de MTAP y supervivencia global, así como supervivencia sin recaída en este grupo de pacientes.
- 65 Meyer *et al.* 2009¹⁴ describen un estudio para correlacionar inmunorreactividad de Cox-2 en tumores con el desenlace de pacientes con melanoma maligno. Se encontró que la expresión de Cox-2 estaba significativamente aumentada de nevos a melanoma maligno primario y metástasis y la positividad de Cox-2 se asociaba con

supervivencia sin recaída más corta de los pacientes. Los autores concluyeron que la expresión de Cox-2 en melanoma maligno primario indica un riesgo aumentado de recaída tumoral. Sin embargo, no se pudo mostrar asociación con supervivencia sin evolución más larga en pacientes con metástasis de melanoma maligno que habían recibido terapia biomoduladora. Por tanto, los autores concluyen que Cox-2 podría principalmente contribuir a los pasos tempranos en la evolución de melanoma, tal como crecimiento e invasión de melanoma maligno primario, pero podría ser menos esencial en el marco metastásico avanzado de la enfermedad de melanoma. No obstante, un estudio diferente por Reichle *et al.* 2007³³ describe un ensayo de fase II que muestra efectos beneficiosos de un inhibidor de Cox-2 en pacientes con melanoma en estadio IV (es decir, metastásico).

El documento WO 2008/141275 describe una gran cantidad de marcadores moleculares expresados en ciertos estadios de melanoma maligno e indica que dichos marcadores se pueden emplear para predecir el potencial maligno de un melanoma maligno y para determinar la pauta de tratamiento correcta. Sin embargo, no se muestra correlación de marcadores moleculares con el curso de enfermedad, tal como supervivencia sin recaída o supervivencia global, en el documento WO 2008/141275.

El documento US2007/0099209 describe composiciones y métodos para tratar, caracterizar, y diagnosticar cáncer basado en perfiles de expresión génica asociados con células madre de tumores sólidos.

El documento US 2003/0152923 describe la sobreexpresión de genes marcadores incluyendo Wnt5a como útiles para la identificación de formas más agresivas de melanoma maligno y sugiere el uso de inhibidores de la actividad Wnt5a en el tratamiento de formas agresivas de melanoma maligno.

El documento WO 2008/069881 describe un método para determinar un conjunto de datos de perfil para un sujeto con cáncer de piel o una afección relacionada con cáncer de piel basado en una muestra del sujeto.

A pesar del hecho de que cientos de estudios buscaban evaluar el valor pronóstico potencial de marcadores moleculares en predecir el curso de melanoma maligno cutáneo, según el último metaanálisis de revisión^{9,10}, no hay perfiles moleculares predictivos para asociación de riesgo u optimización de terapia aplicables para evaluación clínica de rutina de melanoma maligno. Además, la variabilidad del comportamiento clínico en pacientes con melanoma maligno se puede explicar solo parcialmente por datos clínicos e histológicos y, por tanto, hay una necesidad de identificar perfiles de marcadores biológicos para uso en asignar pacientes a un grupo de riesgo específico.

Esta necesidad se aborda por la provisión de las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

Según esto, la presente invención se refiere a un método de predecir el curso de enfermedad en un paciente que tiene un melanoma maligno, el método comprende determinar en células de melanoma comprendidas en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno la presencia o cantidad de al menos cinco biomarcadores seleccionados del grupo que comprende o consiste en MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-20, CD49d y MLH1, en donde la ausencia o cantidad disminuida de MTAP y β -catenina y/o la presencia o cantidad aumentada de PTEN, Bax, Bcl-X, CD20, Cox-20, CD49d y MLH1 se asocia con un curso desventajoso de la enfermedad.

Según la presente invención, el término "predecir el curso de la enfermedad" se refiere a la provisión de una evaluación de si el melanoma maligno tiene una evolución/desenlace favorable o una evolución/desenlace desfavorable. El término enfermedad, a este respecto, se refiere a melanoma maligno. Una evolución/desenlace favorable, también denominado en el presente documento como un curso ventajoso de la enfermedad, se refiere a ningún riesgo o un riesgo bajo de recaída del melanoma maligno y/o un tiempo largo de supervivencia sin enfermedad, tal como, por ejemplo, más de 5 años. Una evolución/desenlace desfavorable, también denominado en el presente documento un curso desventajoso de la enfermedad, se refiere a un alto riesgo de recaída del melanoma maligno, incluyendo, por ejemplo, la formación de melanoma maligno local, así como la formación de metástasis regionales o distales, y/o un tiempo corto de supervivencia sin enfermedad, tal como, por ejemplo, menos de 5 años y/o un tiempo de supervivencia global corto. El término "recaída", como se usa en el presente documento, se refiere al brote repetido de melanoma maligno, o una evolución del melanoma maligno tal como, por ejemplo, en términos de formación de metástasis del melanoma maligno analizado, pero independientemente de si la enfermedad se curó antes de dicho brote o evolución.

Como se usa en el presente documento, el término "melanoma maligno" se refiere a un tipo de cáncer de piel bien conocido en las artes médicas. Melanoma es el tipo de cáncer de piel que tiene el mayor grado de malignidad. Entre las células que componen la piel, las células productoras del pigmento melanina se denominan células de pigmento o melanocitos. Cuando estos melanocitos se vuelven cancerosos, se desarrolla un melanoma maligno. El melanoma maligno se estadifica según la gravedad de la enfermedad en estadio 0 a estadio 4. Estadio 0 se refiere a melanoma in situ con supervivencia del 99,9%. Estadio I/II se refiere a melanoma invasivo con supervivencia del 85 al 99% y se divide adicionalmente en T1a (espesor del tumor primario menor de 1,00 mm, sin ulceración y mitosis $< 1/\text{mm}^2$), T1b (espesor del tumor primario menor de 1,00 mm, con ulceración o mitosis $\geq 1/\text{mm}^2$) y T2a (espesor del tumor primario de 1,00 a 2,00 mm, sin ulceración). Estadio II se refiere a melanoma de alto riesgo con supervivencia del 40 al 85% y se divide adicionalmente en T2b (espesor del tumor primario de 1,00 a 2,00 mm, con ulceración), T3a (espesor del

tumor primario menor de 2,00 a 4,00 mm, sin ulceración), T3b (espesor del tumor primario de 2,00 a 4,00 mm, con ulceración), T4a (espesor del tumor primario mayor de 4,00 mm, sin ulceración) y T4b (espesor del tumor primario mayor de 4,00 mm, con ulceración). Estadio III se refiere a metástasis regional con supervivencia del 25 al 60% y se divide adicionalmente en N1 (ganglio linfático positivo único), N2 (de 2 a 3 ganglios linfáticos positivos o metástasis de piel/en tránsito regional) y N3 (cuatro ganglios linfáticos positivos o ganglio linfático y metástasis regional piel/en tránsito). Por último, estadio IV se refiere a metástasis distantes con supervivencia de solo el 9 al 15%. El estadio IV se divide adicionalmente en M1a (metástasis de piel distante y lactato deshidrogenasa normal), M1b (metástasis pulmonar, lactato deshidrogenasa normal) y M1c (otras metástasis distantes o cualquier metástasis distante con lactato deshidrogenasa elevada).

El término “células de melanoma”, como se usa en el presente documento, se refiere a melanocitos que se han convertido en cancerosos. Los melanocitos, incluyendo células de melanoma, los conoce bien el experto en la materia y se pueden identificar fácilmente en una muestra debido a su localización en el estrato basal de la epidermis, así como a través de marcadores específicos de melanocitos incluyendo, pero no limitados a Melan-A, HMB45, proteína S100, DCT y TRP2.

El término “biomarcador seleccionado del grupo [...]” según la presente invención se refiere a los marcadores enumerados en cualquiera de sus formas naturales, incluyendo moléculas de ácido nucleico tal como, por ejemplo, ADN, incluyendo ADNc o ADN genómico, y ARN, así como proteínas.

Como se usa en el presente documento, el término “determinar la [...] presencia” se refiere a determinar si el biomarcador analizado está presente o ausente en células de melanoma comprendidas en la muestra investigada. El biomarcador se considera presente según la presente invención cuando se detecta en cantidades que superan el error de procedimiento estándar, tal como, por ejemplo, observado en la forma de tinción de fondo obtenida en análisis inmunohistoquímicos o de inmunotransferencia. El experto en la materia sabe cómo determinar tales errores de procedimiento, por ejemplo, analizando muestras control sin enfermedad u omitiendo ciertos pasos o compuestos en el procedimiento, tal como, por ejemplo, un anticuerpo primario en tinciones inmunohistoquímicas o un molde en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, etc. En el caso de que la cantidad de biomarcador detectado corresponda a o sea menor que el error de procedimiento estándar, por ejemplo, la tinción de fondo en un análisis inmunohistoquímico, se considera que el biomarcador no está presente en la muestra.

Como se usa en el presente documento, el término “determinar la [...] cantidad” se refiere a determinar cuantitativa o semicuantitativamente cantidades de los respectivos biomarcadores. Análisis cuantitativo se refiere a la determinación de valores absolutos o normalizados (por ejemplo, comparados a un marcador de referencia que no cambia) de cantidades de biomarcador, tal como, por ejemplo, números de copias de ácidos nucleicos o intensidades de tinciones en técnicas inmunohistoquímicas o de inmunotransferencia. Además, se puede evaluar el número de células teñidas frente a células no teñidas. Análisis semicuantitativo se refiere a la determinación de cantidades relativas, tal como, por ejemplo, por análisis visual de muestras inmunohistoquímicamente teñidas por un experto, tal como, por ejemplo, un dermatohistopatólogo o un patólogo quirúrgico. Como se describe en los ejemplos adjuntos, tales análisis se pueden realizar basándose en un sistema de puntuación escalonado que asigna diferentes puntuaciones a muestras que contienen, por ejemplo, ninguna tinción, tinción débil, tinción moderada, tinción fuerte, tinción muy fuerte, etc.

El término “cantidad disminuida”, como se usa en el presente documento, se refiere a menores niveles de expresión del biomarcador de interés en células de melanoma en la muestra obtenida del melanoma maligno comparado con los niveles de expresión observados en una muestra control, tal como, por ejemplo, tejidos no malignos. Preferiblemente, el término se refiere a menores niveles de expresión estadísticamente significativos del biomarcador de interés en células de melanoma en la muestra obtenida del melanoma maligno comparado con los niveles de expresión observados en los tejidos control. Los niveles de expresión observados en tejidos no malignos se pueden, por ejemplo, analizar en un experimento control paralelo basado en una muestra sin enfermedad, tal como, por ejemplo, en nevos benignos obtenidos del mismo paciente. Se considera que la cantidad de biomarcador está disminuida cuando su cantidad es al menos el 10% menor en la muestra de melanoma maligno que en tejidos no malignos, tal como, por ejemplo, al menos el 20% menor, al menos el 30% menor, al menos el 40% menor, al menos el 50% menor, al menos el 75% menor, al menos el 100% menor (es decir, dos veces menor), al menos el 200% menor, al menos el 300% menor, al menos el 500% menor, etc.

El término “cantidad aumentada”, como se usa en el presente documento, se refiere a mayores niveles de expresión del biomarcador de interés en células de melanoma en la muestra obtenida del melanoma maligno comparado con los niveles de expresión observados en una muestra control, tal como, por ejemplo, tejidos no malignos. Preferiblemente, el término se refiere a mayores niveles de expresión estadísticamente significativos del biomarcador de interés en células de melanoma en la muestra obtenida del melanoma maligno comparado con los niveles de expresión observados en los tejidos control. Los niveles de expresión observados en tejidos no malignos se pueden, por ejemplo, analizar en un experimento control paralelo basado en una muestra sin enfermedad, tal como, por ejemplo, en nevos benignos obtenidos del mismo paciente. Se considera que la cantidad de biomarcador está anormalmente aumentada cuando su cantidad es al menos el 10% mayor en la muestra de melanoma maligno que en tejidos no malignos, tal como, por ejemplo, al menos el 20% mayor, al menos el 30% mayor, al menos el

40% mayor, al menos el 50% mayor, al menos el 75% mayor, al menos el 100% mayor (es decir, dos veces mayor), al menos el 200% mayor, al menos el 300% mayor, al menos el 500% mayor, etc.

El término "nivel de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor de expresión de un marcador particular en una muestra de interés. El nivel de expresión de un marcador corresponde al número de copias del producto de expresión del gen correspondiente, sea a nivel de ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) o a nivel de proteína. Por tanto, la determinación del nivel de expresión de un marcador particular se puede, por ejemplo, llevar a cabo a nivel de ácido nucleico o a nivel de la proteína respectiva codificada por dicho gen.

Los métodos para la determinación de los niveles de expresión de una proteína a nivel de aminoácidos incluyen, pero no están limitados a métodos inmunohistoquímicos como se describen en los ejemplos adjuntos, pero también, por ejemplo, inmunotransferencia o electroforesis en gel de poliácridamida junto con técnicas de tinción de proteínas tal como azul brillante de Coomassie o tinción con plata. Para estos últimos métodos, la proteína total se carga en un gel de poliácridamida y se separan por electroforesis. Después de ello, las proteínas separadas se transfieren a una membrana, por ejemplo, una membrana de difluoruro de polivinilo (PVDF), aplicando una corriente eléctrica. Las proteínas en la membrana se exponen a un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína de interés. Después de lavar, típicamente se aplica un segundo anticuerpo que reconoce específicamente el primer anticuerpo y que tiene un sistema de lectura tal como un colorante fluorescente. La cantidad de la proteína de interés con frecuencia se determina comparando la intensidad de fluorescencia de la proteína derivada de una muestra del paciente de interés con la intensidad de fluorescencia obtenida con la proteína derivada de una muestra control. También de uso en la cuantificación de proteínas es la técnica de bioanalizador de Agilent.

Los métodos para determinar los niveles de expresión a nivel de ácido nucleico incluyen, pero no están limitados a, transferencia Northern, PCR, RT-PCR, o RT-PCR real. La PCR se conoce bien en la técnica y se emplea para hacer grandes números de copias de una secuencia diana. Esto se hace en un dispositivo ciclador automático, que puede calentar y enfriar recipientes con la mezcla de reacción en un tiempo muy corto. La PCR, generalmente, consiste en muchas repeticiones de un ciclo que consiste en: (a) un paso de desnaturalización, que funde ambas hebras de una molécula de ADN y termina todas las reacciones enzimáticas previas; (b) un paso de hibridación, que está destinado a permitir que los cebadores hibriden específicamente con las hebras fundidas de la molécula de ADN; y (c) un paso de extensión, que alarga los cebadores hibridados usando la información proporcionada por la hebra molde. Generalmente, la PCR se puede realizar, por ejemplo, en una mezcla de reacción de 50 µl que contiene 5 µl de tampón de PCR 10x con MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, 0,5 µl de cada cebador (10 µM), aproximadamente de 10 a 100 ng de ADN molde y de 1 a 2,5 unidades de Taq polimerasa. Los cebadores para la amplificación pueden estar marcados o sin marcar. La amplificación de ADN se puede realizar, por ejemplo, con ciclador térmico modelo 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA): 2 min a 94°C, seguido por 30 a 40 ciclos que consisten en la hibridación (por ejemplo 30 s a 50°C), extensión (por ejemplo, 1 min a 72°C, dependiendo de la longitud del molde de ADN y la enzima usada), desnaturalización (por ejemplo, 10 s a 94°C) y un paso final de hibridación a 55°C durante 1 min, así como un paso final de extensión a 72°C durante 5 min. Las polimerasas adecuadas para uso con un molde de ADN incluyen, por ejemplo, ADN polimerasa I de E. coli o su fragmento Klenow, ADN polimerasa de T4, Tth polimerasa, Taq polimerasa, una ADN polimerasa estable al calor aislada de Thermus aquaticus Vent, Amplitaq, Pfu y KOD, algunas de las cuales muestran función correctora de pruebas y/o diferente temperatura óptima. El experto en la materia sabe cómo optimizar las condiciones de PCR para la amplificación de moléculas específicas de ácido nucleico con cebadores de diferente longitud y/o composición o cómo disminuir o aumentar el volumen de la mezcla de reacción. La "transcripción inversa reacción en cadena de la polimerasa" (RT-PCR) se usa cuando el ácido nucleico que se va a amplificar consiste en ARN. El término "transcriptasa inversa" se refiere a una enzima que cataliza la polimerización de desoxirribonucleósidos trifosfato para formar productos de extensión de cebador que son complementarios a un molde de ácido ribonucleico. La enzima inicia la síntesis en el extremo 3' del cebador y sigue hacia el extremo 5' del molde hasta que la síntesis termina. Los ejemplos de agentes de polimerización adecuados que convierten la secuencia diana de ARN en una secuencia complementaria, ADN copia (ADNc) son la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar y ADN polimerasa de Thermos thermophilus, una ADN polimerasa termoestable con actividad transcriptasa inversa comercializada por Perkin Elmer. Típicamente, el molde dúplex ARN genómico/ADNc se desnaturaliza por calor durante el primer paso de desnaturalización después del paso inicial de transcripción inversa que deja la hebra de ADN disponible como un molde de amplificación. La RT a alta temperatura proporciona mayor especificidad de cebador y eficacia mejorada. La solicitud de patente en EE UU con número de serie 07/746.121, presentada el 15 de agosto, 1991, describe una "RT-PCR homogénea" en la que los mismos cebadores y polimerasa bastan tanto para la transcripción inversa como para los pasos de amplificación de PCR, y las condiciones de reacción se optimizan de modo que ambas reacciones se producen sin cambio de reactivos. La ADN polimerasa de Thermus thermophilus, una ADN polimerasa estable que puede funcionar como una transcriptasa inversa, se puede usar para todos los pasos de extensión de cebador, independientemente del molde. Ambos procesos se pueden hacer sin tener que abrir el tubo para cambiar o añadir reactivos; solo se ajusta el perfil de temperatura entre el primer ciclo (molde de ARN) y el resto de los ciclos de amplificación (molde de ADN). La reacción de RT se puede realizar, por ejemplo, en una mezcla de reacción de 20 µl que contiene: 4 µl de tampón AMV-RT 5x, 2 µl de oligo dT (100 µg/ml), 2 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de ARN total, 10 unidades de transcriptasa inversa de AMV y H₂O hasta el volumen final de 20 µl. La reacción se puede, por ejemplo, realizar, usando las siguientes condiciones: la reacción se mantiene a 70°C durante 15 minutos para permitir la transcripción inversa. La temperatura de reacción se sube después a 95°C

durante 1 minuto para desnaturalizar el dúplex ARN-ADNc. A continuación, la temperatura de reacción experimenta dos ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 20 segundos seguido por 38 ciclos de 90°C durante 15 segundos y 60°C durante 20 segundos. Por último, la temperatura de reacción se mantiene a 60°C durante 4 minutos para el paso final de extensión, se enfría a 15°C, y se mantiene a esa temperatura hasta el procesamiento adicional de la muestra amplificada. Cualquiera de las condiciones de reacción mencionadas anteriormente se puede aumentar a escala según las necesidades del caso particular. Los productos resultantes se pueden cargar en un gel de agarosa y se comparan las intensidades de las bandas después de tefir las moléculas de ácidos nucleicos con un tinte intercalante tal como bromuro de etidio o SybrGreen.

La PCR en tiempo real emplea una sonda específica, en la técnica también denominada sonda TaqMan, que tiene un colorante indicador unido covalentemente en el extremo 5' y un extinguidor en el extremo 3'. Después de que la sonda TaqMan haya hibridado en el paso de hibridación de la reacción de PCR al sitio complementario del polinucleótido que se amplifica, el fluoróforo en 5' se corta por la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa en la fase de extensión de la reacción de PCR. Esto aumenta la fluorescencia del donante en 5', que estaba anteriormente extinguido debido a la proximidad al aceptor en 3' en la secuencia de la sonda TaqMan. Por tanto, el proceso de amplificación se puede seguir directamente y en tiempo real, lo que permite una determinación significativamente más precisa de los niveles de expresión que la PCR de punto final convencional. También de uso en los experimentos de RT-PCR a tiempo real es un colorante intercalante de ADN tal como SybrGreen para seguir la síntesis de novo de moléculas de ADN bicatenarias.

El experto en la materia sabe que mutaciones y/o variaciones en los genes que codifican los biomarcadores según la presente invención, así como en los elementos reguladores de dichos genes (por ejemplo, promotores, potenciadores, etc.) puede ser causantes o estar asociadas con un cambio de los niveles de expresión de dichos biomarcadores. Por ejemplo, mutaciones y deficiencias en *PTEN* son prevalentes en muchos tipos de cánceres humanos, que producen una pérdida de proteína *PTEN* funcional en esos cánceres (Mirmohammadsadegh *et al.* 2006⁴³; Lahtz *et al.* 2010⁴⁴; Zhou *et al.* 2000⁴⁵; Zhang y Yu 2010²⁸). Además, se ha mostrado que la hipermetilación del promotor produce una pérdida de expresión de *MTAP* (Behrmann *et al.* 2003). Por tanto, también se prevé en el presente documento que la determinación de la presencia o cantidad de los biomarcadores según la presente invención se base en la detección de mutaciones (es decir, cambios genéticos) o variaciones (cambios epigenéticos) de dichos biomarcadores. Los métodos para determinar mutaciones y/o variaciones en genes se conocen bien en la técnica e incluyen, sin estar limitados, técnicas basadas en PCR, técnicas basadas en secuenciación de ADN, técnicas basadas en hibridación, análisis de polimorfismo de conformación monocatenario (SSCA), electroforesis en gel en gradiente desnaturizante (DGGE), detección de corte de mal emparejamiento, análisis de heterodúplex, técnicas basadas en extensión de cebador, técnicas basadas en ensayo de 5' nucleasa, usando anticuerpos o proteínas que se unen a ADN de secuencia específica, así como PCR cebada arbitrariamente sensible a metilación (por ejemplo, Gonzalgo *et al.* 1997, *Cancer Res.* 57:594-599), PCR específica de metilación cuantitativa (Q-MSP; como se describe, por ejemplo, en *Current Protocols in Human Genetics*, DOI: 10.1002/0471142905.hg1006s61), análisis de restricción sensible a metilación (por ejemplo, Singer-Sam *et al.* 1990, *Nucl. Acids Res.* 18:687), metilación-cuantificación de ADN resistente a endonucleasa (Bettstetter *et al.* 2008⁴²) o métodos de secuenciación sensibles a metilación (tal como, por ejemplo, secuenciación de ADN bisulfito; Frommer *et al.* 1992, *PNAS* 89:1827-1831).

Tales técnicas las conoce el experto en la materia.

Los ejemplos no limitantes para ensayos de amplificación de ácidos nucleicos y medios para realizar tales incluyen PCR (incluyendo, PCR anidada, RT-PCR, detección en tiempo real cuantitativa, ensayos de extensión de PCR, amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), PCR de polimorfismo de conformación monocatenario (SSCP), análisis de PCR-polimorfismo de longitud de fragmento de enzima de restricción (RFLP)), sistemas de mutación resistentes a amplificación (ARMSTM) y ensayos de extensión lineal de sistema de mutación resistente a amplificación (ALEXTM). Los detalles de tales métodos se pueden encontrar en la técnica, véase, por ejemplo, Newton *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 17 (1989) 2503-2516; Agrawal (Ed.), "Protocols for Oligonucleotides and Analogs: Synthesis and Properties (Methods in Molecular Biology, 20)", Humana Press, 1993; Haque *et al.*, *Diagn. Mol. Pathol.* 7 (1998) 248-252; Innis *et al.* (Ed.), "PCR Applications: Protocols for Functional Genomics", Academic Press, 1999; Chen y Janes (Ed.), "PCR Cloning Protocols: From Molecular Cloning to Genetic", 2ª edición, Humana Press, 2002; Pissard *et al.*, *Clin. Chem.* 48 (2002) 769-772; Blondal *et al.*, *Nucleic Acids Res* 31 (2003) e155; Steemers *et al.*, *Nature Meth.* 3 (2006) 31-33; Kakavas *et al.*, *J. Clin. Lab. Anal.* 20 (2006) 1-7.

Los ejemplos de ensayos de secuenciación comprenden sin limitación enfoques de análisis de secuencia por secuenciación directa, SSCP fluorescente en un secuenciador automático de ADN y pirosecuenciación. Estos procedimientos son comunes en la técnica, véase, por ejemplo, Adams *et al.* (Ed.), "Automated DNA Sequencing and Analysis", Academic Press, 1994; Alpey, "DNA Sequencing: From Experimental Methods to Bioinformatics", Springer Verlag Publishing, 1997; Ramon *et al.*, *J. Transl. Med.* 1 (2003) 9; Meng *et al.*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90 (2005) 3419-3422.

Los ejemplos para ensayos de hibridación comprenden sin limitación ensayos de transferencia Northern y Southern, análisis de heterodúplex, detección de mutaciones por hibridación de oligonucleótidos específicos de secuencia,

hibridación de oligonucleótidos específicos de alelo en chips de ADN, ensayos basados en tecnología Illumina®s®, ensayos basados en la tecnología BeadArray®, véase, por ejemplo, Barnes et al., *Nucleic Acids Res.* 33 (2005) 5914-5923; Fan et al., *Biotechniques* 39 (2005) 583-588; Shen et al., *Mutat. Res.-Fund. Mol. M.* 573 (2005) 70-82; Steemers y Gunderson, *Pharmacogenomics*, 6 (2005) 777-782.

El término “al menos cinco biomarcadores”, como se usa en el presente documento, se refiere a cinco o más biomarcadores. Preferiblemente, dicho término se refiere a al menos seis biomarcadores, más preferiblemente al menos siete biomarcadores. El término también se refiere a al menos ocho biomarcadores o al menos nueve biomarcadores. El término abarca además exactamente cinco o exactamente seis o exactamente siete o exactamente ocho o exactamente nueve biomarcadores. Según este método de la invención, se determina la presencia o cantidad de al menos cinco biomarcadores seleccionados de la lista enumerada. También está abarcado por el método que se analicen biomarcadores adicionales y/o marcadores de referencia, en donde dichos biomarcadores adicionales pueden o no estar seleccionados de la lista enumerada de biomarcadores. En otras palabras, mientras que los al menos cinco biomarcadores se tienen que elegir de MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1, se pueden analizar además biomarcadores y/o marcadores de referencia diferentes adicionales según la presente invención.

El término “marcador de referencia”, como se usa en el presente documento, se refiere a un marcador que está presente en melanocitos a niveles sustancialmente constantes. En otras palabras, el nivel de expresión de un marcador de referencia no debe diferir (aparte de desviaciones causadas por los límites de precisión de los métodos de detección establecidos) entre muestras de diferente origen y entre muestras benignas y malignas. Debido a las cantidades esencialmente sin cambiar de tales marcadores de referencia en diferentes muestras, se pueden emplear para normalizar valores de cantidades de biomarcadores, por ejemplo, por comparación entre los niveles de expresión de dicho marcador de referencia que no cambia con el nivel de expresión del biomarcador de interés. Con frecuencia, se usan genes de mantenimiento como marcadores de referencia. Los ejemplos de marcadores de referencia incluyen, sin ser limitantes, GAPDH, RPLP0, PGK1, HSP90AB1, ciclofilina, actina y muchos más. Se detallan ejemplos adicionales, por ejemplo, en Eisenberg *et al.* 2003 (*Trends Genet* 19:362-5) y Velculescu *et al.* 1999 (*Nat Genet* 23:387-8.).

Según la presente invención, el término “normalizar valores de cantidades de biomarcadores” o “normalizar los niveles de expresión” se refiere a una corrección del valor medido. Esta corrección habitualmente se lleva a cabo para controlar para el sesgo introducido durante el proceso de recogida de muestras y análisis, que puede surgir, por ejemplo, debido a variaciones basadas en diferentes laboratorios y/o diferentes máquinas usadas, a diferencias en protocolos de tinción o diferencias entre protocolos de extracción que pueden copurificar inhibidores, y debido a diferentes eficacias de transcripción inversa y PCR. De forma importante, la normalización permite una comparación directa de valores obtenidos de pacientes individuales y/o en diferentes laboratorios.

Se conocen varias estrategias para la normalización en la técnica. Por ejemplo, en el caso de métodos inmunohistoquímicos o medida por PCR cuantitativa, la normalización se puede llevar a cabo contra el/los nivel(es) de expresión de (un) gen(es) de referencia interno(s)/proteína(s) de referencia, que se determina en la misma muestra; contra el tamaño de muestra; contra cantidad total de ARN o ADN genómico o proteína; o contra una molécula artificialmente introducida de cantidad conocida.

La normalización preferiblemente se logra dividiendo matemáticamente los valores de expresión del marcador que se va a investigar por los valores de expresión de un marcador de referencia. Esto es particularmente preferido si los valores de expresión se dan en una escala lineal. Si los valores de expresión se expresan en una escala logarítmica, la normalización se logra restando el valor de expresión del marcador de referencia del valor de expresión del marcador de interés. En el caso de análisis de micromatrices se podrían usar técnicas de normalización incluyendo, sin estar limitado a, RMA, GCRMA, MAS5, dChip y VSN y otras para procesar datos sin elaborar para alcanzar comparabilidad. Se pueden encontrar detalles de estos métodos en Stafford (2008) "Methods in microarray Normalisation" (ISBN-13: 978-1420052787) y Quakenbush *Nat. Gene.* 2002 (*Nat Genet*;32 Supl:496-501)).

Según la presente invención, el término “MTAP” se refiere a S-metil-5'-tioadenosina fosforilasa, que desempeña un papel principal en el metabolismo de poliaminas y es importante para la recuperación tanto de adenina como de metionina. La proteína MTAP se caracteriza por el número EC 2.4.2.28. La MTAP humana, por ejemplo, está representada por Entrez Gene ID 4507 y UniProt ID Q13126 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 1 y 2. MTAP se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Behrmann *et al.*, 2003.

Como se usa en el presente documento, el término “PTEN” se refiere a la fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa y proteína fosfatasa de especificidad dual, que desempeña un papel principal como un supresor tumoral. PTEN actúa como proteína fosfatasa de especificidad dual, desfosforilando proteínas fosforiladas en tirosina, serina y treonina. PTEN también actúa como una lípido fosfatasa, eliminando el fosfato en la posición D3 del anillo de inositol de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato, fosfatidilinositol-3-fosfato e inositol-1,3,4,5-tetrakisfosfato. La proteína PTEN se caracteriza por los números EC 3.1.3.16, 3.1.3.48 y 3.1.3.67. La PTEN humana está representada, por ejemplo, por Entrez Gene ID 5728 y UniProt ID P60484 y se muestra, por ejemplo, en las SEQ ID NO: 3 y 4. PTEN se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Zhang y Yu 2010²⁸.

El término “Bax”, como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína X asociada a BCL2, que acelera la muerte celular programada uniéndose a, y antagonizando el represor de apoptosis BCL2 o su homólogo de adenovirus proteína E1B 19k. Bax también induce la liberación de citocromo c, la activación de CASP3, y por tanto apoptosis. Bax humana, por ejemplo, está representada por Entrez Gene ID 581 y UniProt ID Q07812 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 5 y 6. Bax se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Lowe *et al.*, 2004.

Como se usa en el presente documento, el término “Bcl-X” se refiere a la proteína 1 similar a Bcl-2, que es un potente inhibidor de muerte celular e inhibe la activación de caspasas. Bcl-X humana, por ejemplo, está representada, por Entrez Gene ID 598 y UniProt ID Q07817 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 7 y 8. Bcl-X se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Lowe *et al.*, 2004.

Como se usa en el presente documento, el término “β-catenina” se refiere a CTNNB1, que está implicada en la regulación de la adhesión celular. La mayor parte de β-catenina está localizada en la membrana celular y es parte de los complejos de adhesión E-cadherina/catenina que se propone que acoplan cadherinas al citoesqueleto de actina. También está implicada en la transducción de señales a través de la ruta Wnt y la β-catenina nuclear está implicada en regulación transcripcional por asociación con factores de transcripción de la familia TCF/LEF. La β-catenina humana está representada, por ejemplo, por Entrez Gene ID 1499 y UniProt ID P35222 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 9 y 10. β-Catenina se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Delmas *et al.*, 2007.

El término “CD20”, como se usa en el presente documento, se refiere al antígeno de superficie celular de linfocitos B B1, que también tiene el nombre de MS4A1. Se considera que CD20 desempeña un papel importante en la regulación de la activación y proliferación de células B. CD20 humano está representado, por ejemplo, por Entrez Gene ID 931 y UniProt ID P11836 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 11 y 12. CD20 se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Zabierowski y Herlyn 2008.

Según la presente invención, el término “Cox-2” se refiere a prostaglandina-endoperóxido sintasa 2, también denominada PTGS2. Cox-2 media la formación de prostaglandinas a partir de araquidonato y también puede tener un papel como un mediador principal de inflamación y/o un papel para la señalización prostanoide en plasticidad dependiente de actividad. La proteína Cox-2 está caracterizada por el número EC 1.14.99.1. CD20 humana está representada, por ejemplo, por Entrez Gene ID 5743 y UniProt ID P35354 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 13 y 14. Cox-2 se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Meyer *et al.*, 2009.

Como se usa en el presente documento, el término “CD49d” se refiere a integrina alfa 4, también denominada ITGA4, antígeno CD49D o subunidad alfa 4 del receptor VLA-4. Las integrinas alfa-4/beta-1 (VLA-4) y alfa-4/beta-7 son receptores para fibronectina. Reconocen uno o más dominios en las regiones CS-1 y CS-5 de ajuste alternativo de fibronectina. También son receptores para VCAM1. La integrina alfa-4/beta-1 reconoce la secuencia Q-I-D-S en VCAM1. La integrina alfa-4/beta-7 también es un receptor para MADCAM1. Reconoce la secuencia L-D-T en MADCAM1. En células endoteliales activadas la integrina VLA-4 desencadena agregación homotípica para la mayoría de las líneas celulares de leucocitos positivos para VLA-4. También puede participar en las interacciones de células T citotóxicas con células diana. CD49d humano está representado, por ejemplo, por Entrez Gene ID 3676 y UniProt ID P13612 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 15 y 16. CD49d se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Kuphal *et al.*, 2005.

El término “MLH1”, como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína de reparación de mal emparejamiento de ADN Mlh1, que heterodimeriza con PMS2 para formar MutL alfa, un componente del sistema de reparación de mal emparejamiento de ADN post-replicativo. También heterodimeriza con MLH3 para formar MutL γ, que desempeña un papel en meiosis y se ha implicado además en la señalización de daño a ADN, un proceso que induce parada del ciclo celular y que puede producir apoptosis en casos de daños importantes a ADN. MLH1 humana está representada, por ejemplo, por Entrez ID 4292 y UniProt ID P40692 y se muestra, por ejemplo, en SEQ ID NO: 17 y 18. MHL1 se ha descrito en la técnica, por ejemplo, en Korabiowska *et al.*, 2006.

Según este método de la presente invención, la ausencia o cantidad disminuida de MTAP y/o β-catenina se asocia con un curso desventajoso de la enfermedad, es decir, el melanoma maligno. En otras palabras, cuando se encuentra que uno o ambos de estos marcadores están ausentes o disminuidos en células de melanoma comprendidas en una muestra obtenida de un paciente, entonces esto aumenta la probabilidad de que dicho paciente tenga una recaída de la enfermedad. La presencia de uno o ambos de estos marcadores o niveles elevados de los mismos, sin embargo, hacen más probable que el paciente no tenga una recaída de la enfermedad. Además, según este método de la invención, la presencia o cantidad aumentada de PTEN, Bax, Bcl-X, CD20, Cox-2, CD49d y/o MHL1 se asocia con un curso desventajoso de la enfermedad. Por tanto, cuando se encuentra que uno o más de estos marcadores están expresados o elevados en células de melanoma comprendidas en una muestra obtenida de un paciente, entonces esto hace más probable que el paciente tenga una recaída de la enfermedad mientras que la ausencia de uno o más de estos marcadores o niveles disminuidos de los mismos aumenta la probabilidad de que dicho paciente no tenga una recaída de la enfermedad.

Según la presente invención, se encontró que un conjunto de 9 marcadores específicos permite la caracterización de células de melanoma comprendidas en una muestra de tejido de un melanoma maligno, proporcionando de esta manera un modelo de predicción independiente para el desenlace clínico y opciones de terapia dirigida, individualizada en pacientes con melanoma maligno. Una puntuación pronóstica basada en los niveles de expresión de dicho conjunto limitado de marcadores logró una precisión pronóstica mayor que cualquier otra combinación previamente usada de marcadores pronósticos en melanoma maligno y, por tanto, facilitará mucho la terapia adaptada al riesgo de pacientes de melanoma maligno. En otras palabras, basado en un análisis sencillo y económico de marcadores seleccionados de este conjunto limitado, es posible ahora obtener una evaluación del riesgo de un paciente individual de melanoma maligno para ser un paciente de mal pronóstico (curso desventajoso de la enfermedad), es decir, mostrar un alto riesgo de recaída de la enfermedad o ser un paciente de buen pronóstico (curso ventajoso de la enfermedad), es decir, mostrar un bajo riesgo de recaída de la enfermedad. El conocimiento de estos perfiles de expresión de marcadores permite además el tratamiento adaptado al riesgo, que es de beneficio para pacientes con melanoma maligno. Por ejemplo, un diagnóstico de expresión de MTAP permite a los médicos identificar pacientes que se pueden beneficiar del tratamiento con interferón, proporcionando de esta manera una nueva base para un uso dirigido claro de este caro agente inmunoterapéutico y la prevención de un índice considerable de efectos secundarios.

En particular, usando micromatrices de tejido (TMA), se analizaron retrospectivamente muestras de 364 pacientes con melanoma maligno primario. Se investigó un panel de 70 anticuerpos inmunohistoquímicos (IHC) para proteínas implicadas en ciclo celular, apoptosis, reparación de mal emparejamiento de ADN, diferenciación, proliferación, adhesión celular, señalización y metabolismo. Se empleó un procedimiento de selección de marcadores basado en regresión de Cox univariable y corrección para prueba múltiple para correlacionar los datos de expresión de IHC con el seguimiento clínico (supervivencia global y sin recaída). El modelo se evaluó rigurosamente con dos experimentos diferentes de validación cruzada, una prueba de permutación y un análisis de regresión de Cox multivariable. El poder predictivo de la firma de marcadores identificada se validó en una segunda cohorte de prueba externa independiente (n=225), dando de esta manera un total de 589 pacientes. Este estudio se adhiere a las recomendaciones descritas para estudios pronósticos de marcadores tumorales, es decir, implementa las directrices REMARK (J Natl Cancer Institute 2005; 97:1180-4).

Se evaluó el poder pronóstico de estos 70 marcadores, dando los 11 marcadores MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d, MLH1, TOP2A y Frizzled 7, que estaban significativamente asociados con supervivencia global. Mientras que los once marcadores estaban significativamente asociados con supervivencia global, fue posible reducir más el número de marcadores requeridos para una evaluación pronóstica a nueve (MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1) basado en los coeficientes de regresión de Cox y corrección para prueba múltiple con FDR. Estos nueve marcadores se correlacionaban con muerte por cualquier causa. Dos de estos marcadores eran marcadores protectores (asociados con un cociente de riesgos de menos de 1,00) y siete eran marcadores de riesgo (asociados con un cociente de riesgos de más 1,00) (Fig. 4).

Por viabilidad clínica y ahorro de costes, cualquier conjunto de marcadores adecuados para la evaluación clínica rutinaria debe comprender un número limitado de marcadores. Por tanto, el fin era proporcionar un máximo de información pronóstica y terapéuticamente relevante mediante tan pocos marcadores como fuera posible, combinados en una firma clara. Según esto, se mostró que una reducción adicional de la firma de nueve marcadores aún produce información pronóstica y terapéuticamente relevante. Como prueba de principio, esto se llevó a cabo usando una firma de siete marcadores (Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, MTAP, PTEN), que se encontró que también proporcionaba información pronóstica y terapéuticamente relevante. Las muestras de TMA teñidas inmunohistoquímicamente que ilustran la firma de siete marcadores para un paciente con melanoma de alto riesgo y un paciente de bajo riesgo se muestran en la tabla 3.

Además, la reducción adicional del conjunto de siete marcadores en uno o dos marcador(es), respectivamente, es decir, CD20 y PTEN, produjo un conjunto de seis/cinco marcadores que se correlacionaba significativamente con supervivencia global y sin recaída, como se muestra en los ejemplos 5 y 6, y las figuras 6 y 7 posteriormente.

Los datos obtenidos para la firma de siete marcadores se pueden extender razonablemente a conjuntos de marcadores que comprenden solo cinco marcadores o seis marcadores, debido a la alta coincidencia y correlación de algunos de los marcadores, tal como, por ejemplo, la expresión de Bax y Cox-2 en las muestras de melanoma analizadas (véase la figura 5). En otras palabras, cuando un primer marcador muy correlacionado está comprendido en el conjunto de marcadores analizados, entonces la información proporcionada por un segundo marcador correlacionado a dicho primer marcador podría estar limitada y, consecuentemente, tales marcadores se pueden omitir.

Con un total de 24.674 muestras de sacabocados de melanoma maligno primario analizadas por IHC, este estudio de TMA es más extenso que estudios previos descritos en la técnica (según el conocimiento de los inventores). La firma detectada podría servir como una herramienta pronóstica que permite a los médicos elegir selectivamente, en el momento del diagnóstico y la cirugía inicial, el subconjunto de pacientes en estadio I-II con alto riesgo de recaída para terapia adyuvante. El tratamiento selectivo de esos pacientes que es más probable que desarrollen enfermedad

metastásica distante podría potencialmente disminuir la carga de melanoma metastásico intratable y fomentar el tratamiento terapéutico de melanoma maligno.

5 Los medios y métodos para obtener una estimación de riesgo se conocen bien en la técnica y, basándose en la información proporcionada según la presente invención, el experto en la materia puede obtener una estimación de riesgo.

Un método ejemplar se basa en el siguiente cálculo de puntuación pronóstica:

$$10 \text{ puntuación}(x) = \left(\sum_{i=1}^D (\beta_i x_i) \alpha_i \right) / \left(\sum_{i=1}^D \alpha_i \right), \quad \alpha_i = \begin{cases} 1, & \text{si } x_i \text{ existe} \\ 0, & \text{si } x_i \text{ falta} \end{cases}$$

15 en donde D es el número de marcadores analizados, β_i son los coeficientes del modelo de Cox univariable, por ejemplo -0,621 para MTAP, -0,34 para β -catenina, 0,547 para CD20, 0,391 para Bcl-X, 0,297 para COX-2, 0,272 para PTEN, 0,407 para CD49d, 0,254 para MLH1 y 0,441 para Bax como se muestra en la figura 3F y x_i es el valor determinado para el marcador individual i en el paciente x. α_i corrige para marcadores no presentes en dicho paciente o no evaluados. Basado en este cálculo de puntuación, un paciente es diagnosticado que tiene un curso ventajoso de enfermedad cuando la puntuación está por debajo de una puntuación de referencia y que tiene un curso desventajoso de enfermedad cuando la puntuación está por encima de dicha puntuación de referencia.

20 Según la presente invención, el término "puntuación de referencia" se refiere a un valor de corte por encima o por debajo del cual se puede hacer un diagnóstico del curso de la enfermedad, es decir, como curso ventajoso o desventajoso. Dicha puntuación de referencia puede ser, por ejemplo, una puntuación media, es decir, promedio, determinada basado en una cohorte de pacientes de melanoma maligno que comprende pacientes con curso ventajosos de la enfermedad, así como curso desventajoso de la enfermedad sin ningún sesgo hacia uno de estos grupos. Tales cohortes de pacientes no sesgadas estarán disponibles en hospitales y se pueden analizar para obtener una puntuación de referencia. Preferiblemente, una puntuación pronóstica significativamente por debajo de la puntuación de referencia es indicativa de un curso ventajoso de la enfermedad y una puntuación pronóstica significativamente por encima de la puntuación de referencia es indicativa de un curso desventajoso de la enfermedad.

30 Por ejemplo, basado en el cálculo de puntuación anterior y en una escala para x_i que varía desde -0,5 a +0,5, un paciente se diagnostica que tiene un curso ventajoso de la enfermedad cuando la puntuación basada en la firma de siete marcadores (Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, MTAP, PTEN) está por debajo de 0,1346739 y que tiene un curso desventajoso de la enfermedad cuando la puntuación está por encima de 0,1346739, como se muestra en la figura 1A.

35 Alternativamente, el experto en la materia puede determinar inicialmente en un grupo de pacientes suficientemente grande, tal como, por ejemplo, al menos 10, más preferiblemente al menos 75 y lo más preferiblemente al menos 100 pacientes, la presencia y cantidad de los marcadores MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1. Preferiblemente, el grupo de pacientes es un grupo representativo de pacientes de melanoma maligno pronosticado por métodos convencionales que son pacientes con mal pronóstico o buen pronóstico. Los datos obtenidos de este grupo se pueden correlacionar después con la evolución de la enfermedad, como se detalla en los ejemplos posteriormente. Por ejemplo, después de la medida de al menos 10, más preferiblemente al menos 75 y lo más preferiblemente al menos 100 pacientes en un grupo pronóstico heterogéneo y la determinación de los valores marcadores mencionados anteriormente, la correlación de los datos de seguimiento con los valores marcadores usando el modelo de Cox univariable produce la obtención de coeficientes específicos. Las puntuaciones calculadas (suma de los valores de marcadores multiplicado por los coeficientes) se pueden clasificar debido a su magnitud. Los valores de corte se deben seleccionar debido a la relevancia clínica. Por ejemplo, las magnitudes se pueden separar en el percentil 50, mientras que una puntuación menor es indicativa de buen pronóstico y una puntuación mayor es indicativa de mal pronóstico. Alternativamente, los pacientes se pueden agrupar en más de dos grupos, dependiendo de la información clínica requerida. El experto en la materia entenderá que tal determinación inicial de la presencia y cantidad de marcadores no necesita llevarse a cabo cada vez, sino que más bien se puede llevar a cabo cuando se establece por primera vez el método de predecir el curso del melanoma maligno en pacientes. Los datos obtenidos por tales experimentos iniciales también se pueden almacenar en bases de datos accesibles a otros investigadores, obviando de esta manera la necesidad de estos investigadores de establecer tales datos iniciales.

60 Alternativamente, también se puede evaluar el riesgo de un paciente individual basado en un cálculo de puntuación simplificado en donde los coeficientes de los modelos de riesgo proporcional de Cox univariables se usan en una combinación lineal ponderada para predecir la puntuación de riesgo para cada paciente como se muestra en la figura 3F. Tal cálculo de puntuación simplificado sería: $-0,6*MTAP - 0,3*\beta\text{-catenina} + 0,5*CD20 + 0,4*BCLX +$

0,4*Bax + 0,3*PTEN + 0,3*COX2. En otras palabras, la puntuación obtenida para MTAP se multiplica por -0,6, la puntuación obtenida para β -catenina se multiplica por -0,3, la puntuación obtenida para CD20 se multiplica por 0,5 y así sucesivamente. La suma de todas estas puntuaciones ponderadas proporciona una puntuación de riesgo pronóstico para cada paciente. Por ejemplo, y como se muestra en los ejemplos adjuntos, cuando se empleó un sistema de puntuación de 0 a 4, se encontró que una puntuación de riesgo por debajo de 0,135 era indicativa de un buen pronóstico para dicho paciente mientras que se encontró que una puntuación de riesgo por encima de 0,135 era indicativa de un mal pronóstico para dicho paciente.

En una forma de realización preferida del método de la invención, los al menos cinco marcadores incluyen PTEN y/o MTAP.

Por tanto, el conjunto de biomarcadores empleado según esta forma de realización preferida comprende al menos PTEN o MTAP, más preferiblemente PTEN y MTAP.

Se mostró que la expresión de MTAP según la presente invención era el marcador más fuerte para un desenlace favorable de la enfermedad (coeficiente de -0,621) y es, además, de relevancia terapéutica. En el tratamiento adyuvante de melanoma maligno, interferón alfa es actualmente el único agente terapéutico clínicamente aceptado que proporciona un beneficio de supervivencia (sin recaída) significativo para un porcentaje de pacientes pequeño, pero claro³⁴. Debido a los efectos secundarios graves y el alto coste de la terapia, es ventajoso determinar esos pacientes con una posibilidad realista de beneficiarse del tratamiento con interferón. Se ha mostrado recientemente que hay una clara asociación entre la expresión de MTAP en el melanoma primario y la evolución del melanoma e, incluso de forma más importante, respuesta a tratamiento con interferón^{13,28,35}. Los biomarcadores como MTAP podrían, por tanto, permitir a los médicos evaluar qué pacientes se pueden beneficiar del tratamiento con interferón y, por tanto, podría proporcionar una nueva base para un uso dirigido claro de este caro agente inmunoterapéutico y prevenir los efectos secundarios graves asociados con el tratamiento con interferón.

La fosfatasa supresora de tumores y homólogo de tensina PTEN se identificó como otra proteína de firma. PTEN contrarresta una de la rutas que fomentan cáncer más críticas²⁸, la ruta de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Atk. Una consecuencia establecida de la inactivación de PTEN es la activación anómala constitutiva de la ruta de señalización de PI3K que dirige el crecimiento, proliferación y supervivencia celular incontrolados (Zhang y Yu, 2010²⁸). Por tanto, incluir PTEN en el análisis no solo proporciona una herramienta diagnóstica, sino que también puede ser de relevancia predictiva. En general, las células cancerosas contienen múltiples anomalías genéticas y epigenéticas. A pesar de esta complejidad, su crecimiento y supervivencia con frecuencia se puede alterar por la inactivación de un único oncogén. Este fenómeno, llamado "adicción oncogénica", proporciona un fundamento para la terapia molecular dirigida. La eficacia de esta estrategia requiere métodos novedosos, incluyendo genómica integrante y biología de sistemas, para identificar el estado de la adicción oncogénica (es decir, el "talón de Aquiles") en cánceres específicos. También se puede requerir terapia de combinación para prevenir el escape de cánceres de un estado determinado de adicción oncogénica (Weinstein y Joe 2008⁴⁷). Por tanto, incluir PTEN en el análisis no solo proporciona una herramienta diagnóstica, sino que también es de relevancia terapéutica.

En otra forma de realización preferida del método de la invención, se determinan al menos siete biomarcadores.

En una forma de realización más preferida, los al menos 7 biomarcadores son MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20 y Cox-2.

Según la presente invención, se ha mostrado que este conjunto de siete biomarcadores está fielmente asociado con el pronóstico de pacientes con melanoma maligno y, por tanto, puede servir como un factor de predicción independiente para supervivencia global y sin recaída en pacientes con melanoma maligno.

Entre los 362 pacientes de la cohorte primaria, los pacientes con dicha firma de siete marcadores de alto riesgo tuvieron una supervivencia global mediana más corta que los pacientes con una firma de siete marcadores de bajo riesgo (88 meses frente a no alcanzada) y la diferencia entre los dos grupos de pacientes era muy significativa ($p=0,000000042$) (Fig. 1D). La firma de siete marcadores de alto riesgo se asoció con una supervivencia sin recaída mediana de 33 meses, mientras que la firma de siete marcadores de bajo riesgo se asoció con una supervivencia sin recaída mediana de 88 meses (LTR $p=0,00034$) (Fig. 1E). Según un análisis de regresión de Cox multivariable, la puntuación de riesgo de siete marcadores, espesor tumoral, sexo, y edad estaban asociados significativamente con muerte por cualquier causa entre los 356 pacientes (6 observaciones se eliminaron debido a valores que faltaban) (Tabla 1). Además, un análisis de subgrupo de 253 pacientes con una profundidad tumoral de ≤ 2 mm reveló que esos 148 pacientes con una firma de marcadores de alto riesgo tenían una supervivencia global ($p=0,0053$) (Fig. 3A) y supervivencia sin recaída ($p=0,008$) más cortas que los 105 pacientes con una firma de marcadores de bajo riesgo (Fig. 3B).

	Alto riesgo (N=181)	Bajo riesgo (N=181)	Valor p: riesgo alto frente a bajo	Análisis de regresión de Cox multivariable	
				Cociente de riesgos (IC al	Valor p

				95%	
Puntuación de riesgo de 7 marcadores	0,267 ± 0,0092	0,0017 ± 0,12	<<0,0001 ^{#1}	13,54 (4,27-42,97)	0,0000098 ^{***}
Edad – años	59,5 ± 15,0	57,7 ± 14,9	0,263 ^{#1}	1,03 (1,02-1,05)	0,0000027 ^{***}
Sexo- No. de pacientes (%)					
Hombre	105 (58)	89 (49,2)	1 ^{#2}	1,98 (1,36-2,89)	0,00034 ^{***}
Mujer	76 (42)	92 (50,8)			
Espesor tumoral - mm	2,52 ± 2,38	1,40 ± 2,21	0,00000646 ^{#1}	1,17 (1,12-1,23)	0,0000000023 ^{***}

^{#1} Prueba de t de dos muestras de Welch

^{#2} Prueba exacta de Fisher

^{***} valor p<0,001

5 **Tabla 1. Características clínicas de la cohorte primaria de pacientes con MM (TMA 1).** Comparar pacientes de alto riesgo (primera columna) con pacientes de bajo riesgo (segunda columna) basado en su puntuación de riesgo de siete marcadores muestra diferencia significativa en espesor tumoral (p<0,001) y ninguna diferencia en sexo (p=1) y edad (p=0,263). Además, se describen cocientes de riesgos y valores p para un modelo de regresión de Cox multivariable que comprende todas las variables enumeradas. Respecto a la supervivencia global la puntuación de riesgo de siete marcadores es estadísticamente significativa (p<0,001) independientemente de sexo, edad y espesor tumoral. Se describen las variables continuas con media y desviación estándar y se enumeran las variables categóricas con número de cuentas y porcentajes.

15 Notablemente, el poder predictivo de la firma se validó cuidadosamente y se confirmó en una cohorte de prueba externa secundaria, independiente que incluía muestras de melanoma de 225 pacientes de un hospital diferente. En esta cohorte de prueba externa se confirmó que los pacientes con una firma de marcadores de alto riesgo tenían una esperanza de supervivencia significativamente (p=0,000017) diferente y supervivencia global mediana más corta comparados con los pacientes con una firma de bajo riesgo (95 meses frente a no alcanzada) (Fig. 2A). Según la regresión de Cox multivariable que incluye sexo, edad, espesor tumoral, ulceración y estado ganglionar, la firma de siete marcadores estaba significativamente asociada con supervivencia global (p=0,0000098, Tabla 1). Además, la supervivencia sin recaída difería significativamente entre los dos grupos de riesgo (p=0,004; Fig. 2B).

25 Por tanto, la firma de siete marcadores (Bax, Bcl-X, β-catenina, CD20, COX-2, MTAP, PTEN) está estrechamente asociada con el pronóstico de pacientes con melanoma maligno, ya que se encontró que la firma era un factor de predicción independiente para supervivencia global y sin recaída en pacientes con melanoma maligno. La firma de siete marcadores también podría predecir pacientes con alto riesgo de recaída con melanoma maligno localizado de estadio pT1-2 (espesor tumoral ≤2,00 mm) y peor pronóstico. En particular, se mostró que tres de estos marcadores (CD20, COX-2, MTAP) ofrecían implicaciones terapéuticas directas.

30 En una forma de realización preferida adicional del método de la invención, se determinan al menos nueve biomarcadores.

Al aumentar el número de biomarcadores analizados, se puede aumentar la sensibilidad y especificidad del análisis.

35 Según esta forma de realización, se determinan los nueve biomarcadores MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β-catenina, CD20, COX-2, CD49d y MLH1.

40 Se encontró, según la presente invención, que este conjunto de nueve biomarcadores está estrechamente asociado con el pronóstico de pacientes con melanoma maligno y, por tanto, puede servir como factor de predicción independiente para supervivencia global y sin recaída en pacientes con melanoma maligno.

45 La tabla 1 resume las características de 362 pacientes en el estudio. Entre estos 362 pacientes de la cohorte primaria, los tumores asociados con puntuaciones de alto riesgo también expresaban marcadores de riesgo, mientras que los tumores asociados con puntuaciones de bajo riesgo expresaban marcadores protectores (Fig. 1A). Los pacientes con una firma de nueve marcadores de alto riesgo tenían supervivencia global mediana menor que los pacientes con una firma de nueve marcadores de bajo riesgo (90 meses frente a no alcanzada) (Fig. 1B). Los pacientes con tumores con una firma de marcadores de alto riesgo se asociaron con una supervivencia sin recaída mediana menor que los pacientes con una firma de genes de bajo riesgo (36 meses frente a 88) (Fig. 1C).

50 La presente invención se refiere además a un método de preparar una composición farmacéutica a medida para un paciente que tiene un melanoma maligno, el método comprende (i) determinar en células de melanoma comprendidas en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno la presencia o cantidad de al menos cinco biomarcadores seleccionados del grupo que comprende o consiste en MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β-catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1, en donde la ausencia o cantidad disminuida de β-catenina y MTAP y/o la presencia o cantidad aumentada de PTEN, Bax, Bcl-X, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1 se asocia con un curso desventajoso de la enfermedad; (ii) derivar una pauta de tratamiento para el paciente individual basado en la presencia o cantidad de

marcadores determinados en el paso (i); y (iii) proporcionar al menos un compuesto farmacéutico basado en la pauta de tratamiento derivada en el paso (ii).

5 Según esta forma de realización, el curso de la enfermedad se determina para un paciente que tiene un melanoma maligno y, además, los datos obtenidos determinando la presencia o cantidad de al menos cinco biomarcadores seleccionados del grupo que comprende o consiste en MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1 se emplea para derivar una pauta de tratamiento para el paciente individual, es decir, para preparar una composición farmacéutica a medida.

10 El término "composición farmacéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición para la administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. La composición farmacéutica de la invención comprende un compuesto terapéutico, tal como, por ejemplo, un compuesto seleccionado de los compuestos enumerados posteriormente, solo o en combinación. Puede comprender, opcionalmente, moléculas adicionales capaces de alterar las características de estos compuestos, por ejemplo, estabilizando, modulando y/o activando de esta manera su función. La composición puede estar, por ejemplo, en forma sólida o líquida y puede estar, entre otras, en la forma de (un) polvo(s), (un) comprimido(s), (una) solución(es) o (un) aerosol(es). La composición farmacéutica de la presente invención puede, opcional y adicionalmente, comprender un soporte farmacéuticamente aceptable. Mediante "soporte farmacéuticamente aceptable" se quiere decir un relleno, diluyente, material encapsulante no tóxico, sólido, semisólido o líquido o formulación auxiliar de cualquier tipo. Los ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tal como emulsiones de agua/aceite, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, solventes orgánicos incluyendo DMSO, etc. Las composiciones que contienen tales soportes se pueden formular por métodos convencionales bien conocidos.

25 Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada. La pauta posológica será determinada por el médico y factores clínicos. Como se sabe bien en las artes médicas, las dosis para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, edad, el compuesto particular que se va administrar, sexo, tiempo y ruta de administración, salud general, y otros fármacos que se administran al mismo tiempo. La cantidad terapéuticamente eficaz para una situación determinada se determinará fácilmente por experimentación rutinaria y está dentro de las capacidades y juicio del clínico o médico normal. El experto en la materia sabe que la cantidad eficaz de una composición farmacéutica administrada a un individuo dependerá, entre otros, de la naturaleza del compuesto. Por ejemplo, si dicho compuesto es un polipéptido, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de una composición farmacéutica administrada por vía parenteral por dosis estará en el intervalo de aproximadamente 1 μ g de proteína/kg/día hasta 10 mg de proteína/kg/día de peso corporal del paciente, aunque, como se ha indicado anteriormente, esto será objeto de discreción terapéutica. Más preferiblemente, esta dosis es al menos 0,01 mg/kg/día, y lo más preferiblemente para seres humanos entre aproximadamente 0,01 y 1 mg de proteína/kg/día. Además, si por ejemplo dicho compuesto es un agente de ARNi, tal como un ARNi, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de la composición farmacéutica administrada típicamente será menor de aproximadamente 75 mg por kg de peso corporal, tal como, por ejemplo, menos de aproximadamente 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001 o 0,0005 mg por kg de peso corporal. Más preferiblemente, la cantidad será menor de 2000 nmol de agente de ARNi (por ejemplo, aproximadamente 4,4 x 1.016 copias) por kg de peso corporal, tal como, por ejemplo, menos de 1.500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015 nmol de agente de ARNi por kg de peso corporal. La duración del tratamiento necesaria para observar cambios y el intervalo después del tratamiento para que se produzcan respuestas varía dependiendo del efecto deseado. Las cantidades particulares se pueden determinar por pruebas convencionales que conoce bien el experto en la materia.

50 Las composiciones farmacéuticas como se describen se pueden, por ejemplo, administrar por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intraperitoneal, tópica (mediante polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico), yugal, o como un spray nasal. El término "parenteral" como se usa en el presente documento se refiere a modos de administración, que incluyen inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

55 El compuesto terapéutico, como se ha descrito se puede, por ejemplo, seleccionar del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros, ARNi, ARNh, miARN, ribozimas, moléculas de ácido nucleico antisentido, y una molécula pequeña. Los compuestos terapéuticos incluyen, además, pero no están limitados a, por ejemplo, péptidos tal como péptidos solubles, incluyendo péptidos de fusión con colas de Ig y miembros de bibliotecas de péptidos aleatorios (véase, por ejemplo, Lam et al. (1991) Nature 354: 82-84; Houghten et al. (1991) Nature 354: 84-86) y bibliotecas moleculares derivadas de química combinatoria hechas de aminoácidos en configuración D y/o L o fosfopéptidos (por ejemplo, miembros de bibliotecas de fosfopéptidos dirigidos, aleatorios y parcialmente degenerados, véase, por ejemplo, Songyang et al. (1993) Cell 72: 767-778).

65 El término "anticuerpo" como se usa según la presente invención comprende anticuerpos policlonales y monoclonales, así como derivados o fragmentos de los mismos, que aún retienen la especificidad de unión. Fragmentos o derivados de anticuerpos comprende, entre otros, fragmentos Fab o Fab' así como fragmentos Fd, F(ab')₂, Fv o scFv; véase, por ejemplo, Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. El término "anticuerpo" también incluye formas de realización tal como anticuerpos quiméricos (dominio constante humano, dominio variable no humano), monocatenarios y humanizados (anticuerpo humano con la excepción de CDR no humanas). El término anticuerpos también abarca peptidomiméticos.

5 Varias técnicas para la producción de anticuerpos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit. Además, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, entre otros, patente en EE UU 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios específicos para la diana de esta invención. Además, se pueden usar animales o plantas transgénicos (véase, por ejemplo, la patente en EE UU 6.080.560) para expresar anticuerpos (humanizados) específicos para la diana de esta invención. Lo más preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, tal como un anticuerpo humano o humanizado. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuos. Los ejemplos de tales técnicas se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit. e incluyen la técnica del hibridoma (Köhler y Milstein Nature 256 (1975), 495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor, Immunology Today 4 (1983), 72) y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. (1985), 77-96). Se puede usar resonancia de plasmón de superficie como se emplea en el sistema BIAcore para aumentar la eficacia de anticuerpos de fagos que se unen a un epítipo de los biomarcadores (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmborg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). También se prevé en el contexto de esta invención que el término "anticuerpo" comprenda construcciones de anticuerpos que se pueden expresar en células, por ejemplo, construcciones de anticuerpos que se pueden transfectar y/o transformar a través, entre otros, de virus o vectores plásmidos.

25 Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico o moléculas de péptido que se unen a una molécula diana específica. Los aptámeros se crean habitualmente seleccionándolos de un gran grupo de secuencias aleatorias, pero también existen aptámeros naturales en ribointerruptores. Los aptámeros se pueden usar tanto para investigación básica como para fines clínicos como fármacos macromoleculares. Los aptámeros se pueden combinar con ribozimas para autocortarse en presencia de su molécula diana. Estas moléculas compuestas tienen aplicaciones en investigación, industriales y clínicas adicionales (Osborne et. al. (1997), Current Opinion in Chemical Biology, 1:5-9; Stull & Szoka (1995), Pharmaceutical Research, 12, 4:465-483).

Más específicamente, los aptámeros se pueden clasificar como aptámeros de ácido nucleico, tal como aptámeros de ADN o ARN, o aptámeros peptídicos. Mientras que los primeros normalmente consisten en hebras (habitualmente cortas) de oligonucleótidos, los últimos preferiblemente consisten en un dominio peptídico variable corto, unido en ambos extremos de una andamiaje proteico.

Los aptámeros de ácido nucleico son especies de ácido nucleico que, como regla, se han manipulado mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o equivalentemente, SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial) para unirse a varias dianas moleculares tal como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos, e incluso células, tejidos y organismos.

Los aptámeros peptídicos habitualmente son péptidos o proteínas que se diseñan para interferir con otras interacciones de proteínas dentro de las células. Típicamente consisten en un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un andamiaje proteico. Esta restricción estructural doble aumenta mucho la afinidad de unión del aptámero peptídico a niveles comparables a un anticuerpo (intervalo nanomolar). El bucle peptídico variable típicamente comprende de 10 a 20 aminoácidos, y el andamiaje puede ser cualquier proteína que tiene buenas propiedades de solubilidad. Actualmente, la proteína bacteriana tiorredoxina-A es la proteína de andamiaje más comúnmente usada, el bucle peptídico variable se inserta en el sitio redox activo, que es un bucle -Cys-Gly-Pro-Cys- en la proteína salvaje, las dos cadenas laterales de cisteína pueden formar un puente disulfuro. La selección de aptámeros peptídicos se puede hacer usando diferentes sistemas, pero el más ampliamente usado actualmente es el sistema del doble híbrido en levaduras.

Los aptámeros ofrecen la utilidad para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con las de las biomoléculas comúnmente usadas, en particular anticuerpos. Además de su reconocimiento discriminado, los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos ya que se pueden manipular por completo en un tubo de ensayo, se producen fácilmente por síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Los aptámeros no modificados se depuran rápidamente del torrente sanguíneo, con una semivida de minutos a horas, principalmente debido a la degradación por nucleasas y depuración del cuerpo por los riñones, un resultado de peso molecular inherentemente bajo del aptámero. Las aplicaciones de aptámeros sin modificar actualmente se enfocan en tratar afecciones transitorias tal como coagulación de la sangre, o tratar órganos tal como el ojo donde el posible la administración local. Esta depuración rápida puede ser una ventaja en aplicaciones tal como imagenología diagnóstica *in vivo*. Varias modificaciones, tal como pirimidinas sustituidas en 2' con flúor, enlace con polietilenglicol (PEG), fusión a albúmina u otras proteínas que extienden la semivida, etc., están disponibles para los científicos de modo que la semivida de aptámeros se puede aumentar durante varios días o incluso semanas.

El término “péptido” como se usa en el presente documento describe un grupo de moléculas que consisten en hasta 30 aminoácidos, mientras que el término “proteína” como se usa en el presente documento describe un grupo de moléculas que consisten en más de 30 aminoácidos. Péptidos y proteínas pueden además formar dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula que pueden ser idénticas o no idénticas. Las correspondientes estructuras de orden superior se denominan, consecuentemente, homo- o heterodímeros, homo o heterotrímeros, etc. Los términos “péptido” y “proteína” (en donde “proteína” se usa de forma intercambiable con “polipéptido”) también se refieren a péptidos/proteínas modificados de forma natural en donde la modificación se efectúa, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, fosforilación y similares. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica.

Los anticuerpos o aptámeros se pueden usar además como una fracción de direccionamiento para administrar compuestos terapéuticamente activos, tal como fármacos anticancerosos conocidos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos tal como decarbacina, fotemustina o cisplatino) a las células de melanoma maligno de un paciente.

Según la presente invención, el término “ARN interferente pequeño (ARNip)”, también conocido como ARN interferente corto o ARN silenciador, se refiere a una clase de moléculas de ARN bicatenario de 18 a 30, preferiblemente de 19 a 25, lo más preferido de 21 a 23 o incluso más preferiblemente de 21 nucleótidos de longitud que desempeñan una variedad de papeles en biología. Lo más notablemente, el ARNip está implicado en la ruta de interferencia por ARN (iARN) donde el ARNip interfiere con la expresión de un gen específico. Además de su papel en la ruta de iARN, los ARNip también actúan en rutas relacionadas con iARN, por ejemplo, como un mecanismo antivírico o en dar forma a la estructura de la cromatina de un genoma.

Los ARNip encontrados de forma natural tienen una estructura bien definida: una corta doble cadena de ARN (ARNbc) con extensiones en 3' de 2 nt en cualquier extremo. Cada hebra tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo (-OH) 3'. Esta estructura es el resultado del procesamiento por parte de una enzima que convierte ARNbc largos o ARN horquillados cortos en ARNip. Los ARNip también se pueden introducir exógenamente (artificialmente) en células para provocar el silenciamiento específico de un gen de interés. Esencialmente cualquier gen cuya secuencia se conoce se puede, por tanto, atacar basado en la complementariedad de secuencia con un ARNip apropiadamente hecho a medida. La molécula de ARN bicatenario o un producto de procesamiento metabólico de la misma es capaz de mediar modificaciones de ácido nucleico específicas de diana, particularmente interferencia de ARN y/o metilación de ADN. Los ARNip exógenamente introducidos pueden carecer de extensiones en sus extremos 3' y 5', sin embargo, es preferido que al menos una hebra de ARN tenga una extensión en 5' y/o 3'. Preferiblemente, un extremo de la doble hebra tiene una extensión en 3' de 1-5 nucleótidos, más preferiblemente de 1-3 nucleótidos y lo más preferiblemente 2 nucleótidos. El otro extremo puede ser romo o tener hasta 6 nucleótidos de extensión en 3'. En general, se prevé en la presente invención cualquier molécula de ARN adecuada para actuar como ARNip. El silenciamiento más eficaz se obtuvo hasta ahora con dúplex de ARNip compuestos de hebras sentido de 21 nt y antisentido de 21 nt, emparejadas de una manera que tengan extensiones 3' de 2 nt en cada extremo. La secuencia de la extensión en 3' de 2 nt hace una pequeña contribución a la especificidad del reconocimiento de la diana restringida al nucleótido desapareado adyacente al primer par de base (Elbashir et al., 2001). Los 2'-desoxinucleótidos en las extensiones 3' son tan eficaces como los ribonucleótidos, pero con frecuencia son más baratos de sintetizar y probablemente más resistentes a nucleasa. La administración de ARNip se puede lograr usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, combinando el ARNip con solución salina y administrando la combinación por vía intravenosa o intranasal o formulando el ARNip en glucosa (tal como, por ejemplo, glucosa al 5%) o lípidos catiónicos y polímeros se pueden usar para la administración de ARNip *in vivo* a través de rutas sistémicas sea por vía intravenosa (IV) o intraperitoneal (IP) (Fougerolles *et al.* (2008), *Current Opinion in Pharmacology*, 8:280-285; Lu *et al.* (2008), *Methods in Molecular Biology*, vol. 437: Drug Delivery Systems — Capítulo 3: Delivering Small Interfering RNA for Novel Therapeutics).

Un ARN horquillado corto (ARNhc) es una secuencia de ARN que hace un giro horquillado cerrado que se puede usar para típicamente silenciar la expresión génica a través de interferencia de ARN. El ARNhc puede usar, por ejemplo, un vector introducido en células, en cuyo caso se utiliza el promotor U6 para asegurar que el ARNhc se expresa siempre. Este vector habitualmente se pasa a las células hijas, lo que permite que el silenciamiento génico se herede. La estructura horquillada del ARNhc es cortada por la maquinaria celular a ARNip, que después se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Este complejo se une a y corta ARNm que coinciden con el ARNip que está unido a ellos.

Preferiblemente, los ARNip/hc que se van a usar en la presente invención se sintetizan químicamente usando métodos convencionales que, por ejemplo, protegen apropiadamente ribonucleósidos fosforamiditas y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los suministradores de reactivos de síntesis de ARN son Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, EE UU), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, EE UU), Glen Research (Sterling, VA, EE UU), ChemGenes (Ashland, MA, EE UU), y Cruachem (Glasgow, UK). Lo más convenientemente, los ARNip o ARNhc se obtienen de suministradores de síntesis de oligo ARN comerciales, que venden productos de síntesis de ARN de diferente calidad y coste. En general, los ARN

aplicables en la presente invención se sintetizan convencionalmente y se proporcionan fácilmente en una calidad adecuada para iARN.

5 Moléculas adicionales que efectúan iARN incluyen, por ejemplo, microARN (miARN). Dichas especies de ARN son moléculas de ARN monocatenario que, como moléculas de ARN endógenas, regulan la expresión génica. Unirse a un transcrito de ARNm complementario desencadena la degradación de dicho transcrito de ARNm mediante un proceso similar a la interferencia de ARN. Según esto, se puede emplear miARN como un inhibidor de los biomarcadores según la presente invención.

10 Una ribozima (de enzima de ácido ribonucleico, también llamada enzima de ARN o ARN catalítico) es una molécula de ARN que cataliza una reacción química. Muchas ribozimas naturales catalizan su propio corte o el corte de otros ARN, pero también se ha encontrado que catalizan la actividad aminotransferasa del ribosoma. Los ejemplos no limitantes de ARN autocatalítico pequeño bien caracterizados son las ribozimas de cabeza de martillo, horquilla, virus delta de la hepatitis, y las dependientes de plomo seleccionadas *in vitro*, mientras que el intrón de grupo I es un ejemplo de ribozimas más grandes. El principio del autocorte catalítico se ha convertido en bien establecido en los últimos 10 años. Las ribozimas de cabeza de martillo son las mejor caracterizadas entre las moléculas de ARN con actividad ribozima. Puesto que se mostró que las estructuras de cabeza de martillo se pueden integrar en secuencias de ARN heterólogo y que la actividad de la ribozima se puede transferir de esta manera a estas moléculas, parece que se pueden crear secuencias antisentido catalíticas para casi cada cualquier secuencia diana, siempre que la secuencia diana contenga un potencial sitio de corte coincidente. El principio básico de construir ribozimas de cabeza de martillo es como sigue: se selecciona una región interesante del ARN, que contiene el triplete GUC (o CUC). Se toman dos hebras de oligonucleótidos, cada una habitualmente con 6 a 8 nucleótidos, y la secuencia de cabeza de martillo catalítica se inserta entre ellas. Se sintetizaron moléculas de este tipo para numerosas secuencias diana. Mostraron actividad catalítica *in vitro*. Los mejores resultados se obtienen habitualmente con ribozimas y secuencias diana cortas.

Un desarrollo reciente, también útil según la presente invención, es la combinación de un aptámero que reconoce un compuesto pequeño con una ribozima de cabeza de martillo. Se supone que el cambio conformacional inducido en el aptámero tras la unión de la molécula diana que regula la función catalítica de la ribozima.

30 El término "molécula de ácido nucleico antisentido" se conoce en la técnica y se refiere a un ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico diana. Una molécula antisentido según la invención es capaz de interactuar con el ácido nucleico diana, más específicamente es capaz de hibridar con el ácido nucleico diana. Debido a la formación del híbrido, la transcripción del/de los gen(es) diana y/o la traducción del ARNm diana se reduce o bloquea. Se han descrito métodos estándar referidos a la tecnología antisentido (véase, por ejemplo, Melani et al., Cancer Res. (1991) 51:2897-2901).

Una "molécula pequeña" según la presente divulgación puede ser, por ejemplo, una molécula orgánica. Moléculas orgánicas se refiere o pertenece a la clase de compuestos químicos que tiene una base de carbono, los átomos de carbono unidos por enlaces carbono-carbono. La definición original de término orgánico se refiere a la fuente de compuesto químicos, siendo compuestos orgánicos esos compuestos que contienen carbono obtenidos de fuentes vegetales, animales o microbianas, mientras que los compuestos inorgánicos se obtenían de fuentes minerales. Los compuestos orgánicos pueden ser naturales o sintéticos. Alternativamente, la "molécula pequeña" según la presente invención puede ser un compuesto inorgánico. Los compuestos inorgánicos derivan de fuentes minerales e incluyen todos los compuestos sin átomos de carbono (excepto dióxido de carbono, monóxido de carbono y carbonatos). Preferiblemente, la molécula pequeña tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 2000 uma, o menos de aproximadamente 1000 uma tal como menos de aproximadamente 500 uma, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 250 uma. El tamaño de una molécula pequeña se puede determinar por métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, espectrometría de masas. Se pueden diseñar las moléculas pequeñas, por ejemplo, basadas en la estructura cristalina de la molécula diana, donde sitios presumiblemente responsables para la actividad biológica, se pueden identificar y verificar en ensayos *in vivo* tal como ensayos de cribado de alta resolución (HTS) *in vivo*. Tales moléculas pequeñas pueden ser particularmente adecuadas para inhibir la interacción proteína-proteína bloqueando sitios de unión específicos de la molécula diana. Las moléculas pequeñas adecuadas empleadas actualmente en el tratamiento de cáncer incluyen, sin ser limitantes, inhibidores de molécula pequeña para inhibir la familia del inhibidor de apoptosis Bcl-2 (Azmi y Mohammad, 2009).

También están abarcadas en el presente documento versiones modificadas de estos compuestos terapéuticos.

60 El término "versiones modificadas de estos compuestos terapéuticos" según la presente invención se refiere a versiones de los compuestos que están modificadas para alcanzar i) espectro modificado de actividad, especificidad de órgano, y/o ii) potencia mejorada, y/o iii) toxicidad disminuida (índice terapéutico mejorado), y/o iv) efectos secundarios disminuidos, y/o v) inicio modificado de la acción terapéutica, duración de efecto, y/o vi) parámetros farmacocinéticos modificados (resorción, distribución, metabolismo y excreción), y/o vii) parámetros fisicoquímicos modificados (solubilidad, higroscopia, color, gusto, olor, estabilidad, estado), y/o viii) especificidad general modificada, especificidad de órgano/tejido, y/o ix) forma y ruta de aplicación optimizada por (a) esterificación de grupos carboxilo, o (b) esterificación de grupos hidroxilo con ácidos carboxílicos, o (c) esterificación de grupos

hidroxilo a, por ejemplo, fosfatos, pirofosfatos o sulfatos o hemisuccinatos, o (d) formación de sales farmacéuticamente aceptables, o (e) formación de complejos farmacéuticamente aceptables, o (f) síntesis de polímeros farmacológicamente activos, o (g) introducción de fracciones hidrofílicas, o (h) introducción/intercambio de sustituyentes en aromáticos o cadenas laterales, cambios del patrón de sustituyentes, o (i) modificación por introducción fracciones isostéricas o bioisostéricas, o (j) síntesis de compuestos homólogos, o (k) introducción de cadenas laterales ramificadas, o (l) conversión de sustituyentes alquilo a análogos cíclicos, o (m) derivación de grupos hidroxilo a quelatos, acetatos, o (n) N-acetilación a amidas, fenilcarbonatos, o (o) síntesis de bases de Mannich, iminas, o (p) transformación de cetonas o aldehídos a bases de Schiff, oximas, acetales, cetales, enolésteres, oxazolidinas, tiazolidinas; o combinaciones de las mismas.

Los varios pasos enumerados anteriormente generalmente se conocen en la técnica. Incluyen o se basan en análisis de la relación cuantitativa estructura-acción (QSAR) (Kubinyi, "Hausch-Analysis and Related Approaches", VCH Verlag, Weinheim, 1992), bioquímica combinatoria, química clásica y otros (véase, por ejemplo, Holzgrave y Bechtold, *Deutsche Apotheker Zeitung* 140(8), 813-823, 2000).

El término "composición farmacéutica a medida" según la presente invención, se refiere a una composición farmacéutica que se ajusta a las necesidades individuales de un paciente particular. En otras palabras, una composición farmacéutica a medida es una medicación específica del paciente. Para el médico, la evaluación de los marcadores según la invención proporciona una herramienta útil para responder a la pregunta esencial "a quién tratar, y cómo tratar", especialmente en el marco adyuvante después de la recesión quirúrgica de melanoma maligno primario de estadio temprano y localizado (estadio I a IIa).

Se ha mostrado previamente que varios de los marcadores empleados según la presente invención son dianas o indicadores adecuados en el tratamiento de cánceres. Por tanto, compuestos terapéuticos que se dirigen a dichos marcadores o que se dirigen a rutas asociadas con dichos marcadores ya están disponibles en la técnica. Por ejemplo, CD20, COX-2 y MTAP son tres marcadores de la presente invención que ofrecen implicaciones terapéuticas directas, ya que los fármacos correspondientes han sido aprobados por la FDA.

El antígeno CD20 se sabe que es una diana terapéutica eficaz en el tratamiento de pacientes con linfomas no hodgkinianos de células B positivos para CD20. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal quimérico Rituximab se ha descrito para inmunoterapia²⁹. El anticuerpo se une específicamente al antígeno CD20 presentado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y causa una muerte citotóxica celular y mediada por complemento de estas células. Según un pequeño ensayo piloto en fase II en pacientes de melanoma de estadio IV recientemente presentado en la reunión de la ASCO (2010), el anticuerpo anti-CD20 Rituximab puede ser potencialmente adecuado para el inmunoataque de subpoblaciones de melanoma positivo para CD20. Consecuentemente, la presencia de CD20 en células de melanoma de un paciente determinado con el método de la presente invención es indicativo para un tratamiento terapéutico de dicho paciente con compuestos que se dirigen a CD20, tal como, por ejemplo, Rituximab. Inhibidores adicionales de CD20 son, por ejemplo, el anticuerpo murino 2138 marcado con itrio-[90] designado Y2B8 (patente en EE UU No. 5.736.137), IgG2a 131 murina opcionalmente marcada con 131I para generar el anticuerpo 131 I-B1 (BEXXAR®) (patente en EE UU No. 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino 1F5 (Press et al. *Blood* 69(2): 584-591 (1987)); anticuerpo quimérico 2H7 (patente en EE UU No. 5.677.180); y anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1 133, B—Cl o NU-B2 disponibles de International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., *En: Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)).

La ciclooxigenasa 2 representa otra diana terapéutica prometedora. Las ciclooxigenasas (COX) catalizan el primer paso limitante de velocidad en la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas. En contraste a COX-1, la isoenzima COX-2 no es detectable en la mayoría de los tejidos normales y se induce rápidamente por varios estímulos tal como reacciones inflamatorias³⁰. También se expresa en varios tipos de tumores y se ha mostrado que los niveles de expresión de COX-2 se correlacionan con invasividad y pronóstico en algunas entidades tumorales, incluyendo cáncer de piel epitelial y melanocítico^{14,31}. Estudios epidemiológicos mostraron que la inhibición prolongada de COX-2 mediante ácido acetilsalicílico u otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) podría ofrecer alguna protección contra cáncer de colon y algunas otras neoplasias malignas³². Hasta ahora el beneficio de los inhibidores de COX-2 no se ha estudiado en el tratamiento adyuvante de melanomas de estadio temprano para prevenir metástasis. En el tratamiento de segunda línea de enfermedad de melanoma metastásico avanzado, sin embargo, se mostró un beneficio de supervivencia para terapia combinada dirigida usando inhibidores de COX-2 y agonistas de PPARG para tratamiento antiinflamatorio junto con quimioterapia metronómica de dosis baja³³. Considerando esta observación y el hecho de que los pacientes de melanoma con tumores primarios positivos para COX-2 tienen un riesgo significativamente mayor de recaída tumoral¹⁴, se concluye que la presencia de COX-2 en células de melanoma de un paciente determinado con el método de la presente invención es indicativo para un tratamiento terapéutico de dicho paciente con compuestos que se dirigen a COX-2, tal como, por ejemplo, inhibidores de COX-2 incluyendo, pero no limitados a, Celecoxib, Etoricoxib o Parecoxib para tratamiento primario adyuvante de estos pacientes.

Además, en el tratamiento adyuvante de melanoma maligno, interferón alfa es actualmente el único agente terapéutico clínicamente aceptado que proporciona un beneficio de supervivencia (sin recaída) significativo para un pequeño pero claro porcentaje de pacientes³⁴. Debido a los graves efectos secundarios y los altos costes de la

terapia, es ventajoso determinar esos pacientes con una posibilidad realista de beneficiarse del tratamiento con interferón. Se ha mostrado recientemente que hay una clara asociación entre la expresión de MTAP en el melanoma primario y la evolución del melanoma e, incluso de forma más importante, respuesta a tratamiento con interferón^{13,28,35}. Los biomarcadores como MTAP podrían, por tanto, permitir a los médicos evaluar qué pacientes se pueden beneficiar del tratamiento con interferón y podrían, por tanto, proporcionar una nueva base para un uso dirigido claro de este caro agente inmunoterapéutico y prevenir las graves efectos secundarios asociados con el tratamiento con interferón.

También Bcl-X ha sido objetivo en ensayos preclínicos y varios agentes de direccionamiento están en la fase en ensayo clínico ahora³⁶. Bcl-X está relacionado con la familia de proteínas Bcl-2 antiapoptóticas. La sobreexpresión de estas proteínas antiapoptóticas protege las células cancerosas contra señales de muerte por apoptosis. De forma interesante, los tumores que expresan altos niveles de Bcl-2 o Bcl-X con frecuencia se encuentra que son resistentes a agentes quimioterapéuticos o terapia de radiación³⁷. En los últimos años, ha habido un crecimiento exponencial en la identificación y síntesis de "inhibidores de molécula pequeña" (SIM) permeables a células no peptídicos contra proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o Bcl-X (véase, por ejemplo, Azmi y Mohammad 2009). Los SMI inhiben distintas interacciones proteína-proteína bloqueando sitios de unión específicos de la molécula diana, apoyando de esta manera la maquinaria apoptótica³⁶. La inhibición de Bcl-X puede ejercer un efecto sinérgico con tratamientos convencionales como quimioterapia o terapia de radiación y con respecto a la terapia de melanoma, este efecto podría ser un éxito terapéutico decisivo.

Para PTEN la adicción de la ruta oncogénica, como se ha descrito en el presente documento anteriormente, se ha descrito en detalle en la bibliografía, por ejemplo, en Weinstein y Joe 2008⁴⁷, Zhang y Yu 2010²⁸, Mirmohammadsadegh *et al.* 2006⁴³, Lahtz *et al.* 2010⁴⁴ o Zhou *et al.* 2000⁴⁵.

Según la presente invención, la firma de marcadores representa una herramienta clínica muy prometedora para predecir el pronóstico de un paciente. De forma más importante, se espera que la firma de marcadores mejore el tratamiento clínico y el tratamiento adyuvante de melanoma maligno en estadio temprano con un alto riesgo de recaída. En el tratamiento de melanoma metastásico avanzado, las terapias antitumorales inmunitarias novedosas que se dirigen a rutas de transducción de señales o barreras inmunitarias tumorales por anticuerpo monoclonales como inhibidores de BFAR selectivos³⁸ o anticuerpo anti-antígeno de linfocitos T citotóxicos 4 (CTLA-4)³⁹ ya han entrado en estudios clínicos. Esta opción terapéutica prometedora en el tratamiento del desarrollo de melanoma maligno metastásico avanzado, junto con el conjunto de marcadores moleculares identificados según la presente invención se espera que proporcionen nuevas indicaciones orientadas al riesgo para una terapia antitumoral dirigida individualizada de melanoma maligno.

En una forma de realización preferida del método de preparar una composición farmacéutica a medida, los al menos cinco biomarcadores incluyen CD20, Cox-2 y/o MTAP.

Por tanto, el conjunto de biomarcadores empleados según esta forma de realización preferida comprende al menos CD20, o Cox-2, o MTAP, o CD20 y Cox-2, o CD20 y MTAP, o Cox-2 y MTAP, o CD20 y Cox-2 y MTAP.

En otra forma de realización preferida del método de preparar una composición farmacéutica a medida, se determinan al menos siete biomarcadores.

En una forma de realización más preferida del método de preparar una composición farmacéutica a medida, los al menos siete biomarcadores son MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20 y Cox-2.

En una forma de realización preferida adicional del método de preparar una composición farmacéutica a medida, se determinan al menos nueve biomarcadores.

Según esta forma de realización del método de preparar una composición farmacéutica a medida, se determinan los nueve biomarcadores MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2 y CD49d y MLH1.

En una forma de realización más preferida adicional del/de los método(s) de la invención, la muestra se obtiene del tumor primario, un ganglio linfático o una metástasis.

El término "tumor primario" según la presente invención se refiere a un tumor maligno (también denominado en el presente documento un cáncer) en un primer sitio, es decir, en un primer órgano o parte del cuerpo. En general, cuando el área de las células cancerosas en el sitio originario se vuelve clínicamente detectable, se denomina un tumor primario. En el presente caso de melanoma maligno, dicho tumor primario es un tumor maligno de melanocitos, que están presentes en la piel (es decir, el tumor primario es cáncer de piel) pero también en la membrana mucosa y el ojo. Algunas células cancerosas también adquieren la capacidad de penetrar e infiltrar tejidos normales circundantes en el área local, formando un tumor nuevo. El tumor "hija" recién formado en el sitio adyacentes en el tejido se llama una metástasis local mientras que la formación de un nuevo tumor en un sitio no adyacente se llama una metástasis distante.

Según la presente invención, el término “ganglio linfático” se refiere a un pequeño órgano del sistema inmunitario que es importante en el funcionamiento apropiado del sistema inmunitario, ya que actúa como un filtro o trampa para partículas exógenas. Los ganglios linfáticos están ampliamente distribuidos a lo largo del cuerpo incluyendo la axila y estómago/intestino y unidos por vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos se inflaman o agrandan en varias afecciones, que varían desde infecciones de garganta a enfermedades potencialmente mortales tal como cánceres.

En otra forma de realización más preferida del/de los método(s) de la invención, la muestra es una muestra de tejido, una muestra de sangre o linfa.

En una forma de realización más preferida adicional del/de los método(s) de la invención, la presencia o cantidad de los biomarcadores se analiza por métodos que determinan modificaciones genéticas o epigenéticas o niveles transcripcionales o de proteína o una combinación de los mismos.

Los métodos para determinar modificaciones genéticas o epigenéticas o niveles transcripcionales o de proteína se han definido en el presente documento anteriormente.

En una forma de realización más preferida adicional del/de los método(s) de la invención, la presencia o cantidad de los biomarcadores se determina por inmunohistoquímica, espectrometría de masas, inmunotransferencia, transferencia Northern, PCR, hibridación *in situ* de ARN o una combinación de los mismos.

Todos los métodos anteriores se conocen bien en la técnica. Preferiblemente, los métodos inmunohistoquímicos incluyen, sin estar limitados, micromatrices de tejido (TMA) como se describe en los ejemplos adjuntos. Preferiblemente, cuando se emplean TMA, el análisis se lleva a cabo en dos áreas representativas por punto de TMA, en donde cada área comprende aproximadamente 100 células, tal como, por ejemplo, exactamente 100 células.

En una forma de realización más preferida del/de los método(s) de la invención, el biomarcador es proteína.

La presente invención se refiere además a un kit para predecir el curso de la enfermedad en un paciente que tiene un melanoma maligno, el kit comprende: (a) medios para determinar la presencia o cantidad del conjunto de biomarcadores como se han definido según los métodos de la presente invención en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno, y (b) instrucciones de cómo usar el kit.

En su sentido más amplio, el término “kit” no requiere la presencia de ningún otro compuesto, viales, envases y similares. Preferiblemente, los varios componentes del kit pueden estar embalados en uno o más envases tal como uno o más viales. Consecuentemente, los varios componentes del kit pueden estar presentes en aislamiento o combinación. Los envases o viales pueden, además de los componentes, comprender conservantes o tampones para el almacenamiento.

“Medios para determinar la presencia o cantidad de [...] biomarcadores” son bien conocidos en la técnica e incluyen, sin ser limitantes, anticuerpos que se unen específicamente (es decir, sin reacción cruzada con marcadores no relacionados) a los biomarcadores según la presente invención; sondas de ácido nucleico para la detección de los biomarcadores a nivel de ácido nucleico, tal como, por ejemplo, sondas de ácido nucleicos que hibridan específicamente con partes o moléculas de ácido nucleico de longitud completa (ADN así como ARN) que codifican dichos biomarcadores; cebadores de secuenciación para el análisis y detección de secuencias específicas del ADN que codifica los biomarcadores, por ejemplo secuencias que contienen mutaciones que se sabe interfieren con la expresión de dichos biomarcadores; cebadores de amplificación para amplificar moléculas de ácido nucleico transcritas de los biomarcadores respectivos; cebadores específicos para ADN metilado para uso en PCR específica de metilación cuantitativa (Q-MSP) (como se describe, por ejemplo, en Current Protocols in Human Genetics, DOI: 10.1002/0471142905.hg1006s61); y también enzimas de restricción sensibles a metilación.

El término “comprender” en el contexto del/de los kit(s) de la invención indica que pueden estar presentes componentes adicionales en el kit. Los ejemplos no limitantes de tales componentes adicionales incluyen, como se ha mencionado, conservantes, tampones para almacenamiento, enzimas, etc.

También está abarcado por esta forma de realización que el kit comprenda medios adicionales para determinar la presencia o cantidad de biomarcadores o marcadores de referencia diferentes de los biomarcadores de la presente invención. Tales biomarcadores o marcadores de referencia diferentes de los biomarcadores de la presente invención incluyen, sin ser limitantes, marcadores tumorales adicionales para melanoma maligno, tal como, por ejemplo, proteína S100, HMB45, Melan-A, anticuerpos anti-pan melanoma, así como marcadores de referencia incluyendo, sin ser limitantes, GADPH, RPLP0, PGK1, HSP90AB1, ciclofilina, actina.

Si el kit comprende tales medios adicionales para determinar la presencia o cantidad de biomarcadores o marcadores de referencia diferentes de los marcadores según la presente invención, se prefiere que como mucho 10.000 de tales marcadores adicionales estén comprendidos en el kit de la invención. Más preferiblemente, como mucho 5.000, tal como por ejemplo como mucho 2.000 y más preferiblemente como mucho 1.000 marcadores

nucleicos adicionales están comprendidos en el kit de la invención. Más preferiblemente, como mucho 800, tal como por ejemplo como mucho 600, más preferiblemente como mucho 400, tal como por ejemplo como mucho 300, como mucho 200, como mucho 100 y más preferiblemente como mucho 80 marcadores adicionales están comprendidos en el kit de la invención. Incluso más preferiblemente, como mucho 50, tal como por ejemplo como mucho 40, más preferiblemente como mucho 30, tal como por ejemplo como mucho 20, como mucho 10, como mucho 9, como mucho 8, como mucho 7, como mucho 6, como mucho 5, como mucho 4, como mucho 3, como mucho 2 y aún más preferiblemente como mucho 1 marcador(es) adicional(es) está(n) comprendido(s) en el kit de la invención. También es preferido que el kit de la invención solo comprenda medios para determinar la presencia o cantidad del conjunto de biomarcadores como se han definido según los métodos de la presente invención.

Además, la presente invención también se refiere a un kit para derivar una pauta de tratamiento para un paciente individual que tiene un melanoma maligno, el kit comprende: (a) medios para determinar la presencia o cantidad del conjunto de biomarcadores definidos según la presente invención en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno, (b) instrucciones sobre cómo usar el kit.

Las definiciones, así como las formas de realización preferidas proporcionadas en el presente documento anteriormente con respecto al kit para predecir el curso de la enfermedad aplican, mutatis mutandis, también a estas formas de realización que se refieren a un kit para reparar una composición farmacéutica a medida como se ha esbozado anteriormente.

También se describe en el presente documento una composición farmacéutica para uso en tratar o prevenir melanoma maligno, en donde la composición farmacéutica comprende (un) inhibidor(es) de CD20, Cox-2, y/o PTEN y/o (un) agente(s) que afecta(n) las rutas de señalización de MTAP.

El término "inhibidor" se refiere a un compuesto que disminuye la actividad de una molécula diana, es decir, CD20, Cox-2 y/o PTEN. El inhibidor puede actuar preferiblemente realizando uno o más de los siguientes efectos: (i) la transcripción del gen que codifica la proteína que se va a inhibir se disminuye, (ii) la traducción del ARNm que codifica la proteína que se va a inhibir se disminuye, (iii) la proteína realiza su función bioquímica con eficacia disminuida o anulada en presencia del inhibidor, y (iv) la proteína realiza su función celular con eficacia disminuida o anulada en presencia de inhibidor.

Los compuestos que están en la clase (i) incluyen compuestos que interfieren con la maquinaria transcripcional y/o su interacción con el promotor de dicho gen y/o con elementos de control de la expresión lejos del promotor tal como potenciadores, pero también con mecanismos de control epigenético, alterando de esta manera, por ejemplo, el estado de metilación del promotor de un gen diana. Los compuestos de clase (ii) comprenden construcciones antisentido y construcciones para realizar interferencia de ARN (por ejemplo, ARNip, ARNhc, miARN) bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Zamore (2001) Nat. Struct. Biol. 8(9), 746; Tuschl (2001) Chembiochem. 2(4), 239). Los compuestos de la clase (iii) interfieren con la función molecular de la proteína que se va a inhibir, en el caso presente con la función molecular de CD20, Cox-2 y/o PTEN como se ha descrito en el presente documento anteriormente. Según esto, se prevén compuestos que se unen al sitio activo. La clase (iv) incluye compuestos que necesariamente no se unen directamente a las proteínas diana, pero aún interfieren con su actividad, por ejemplo, por unión a y/o inhibición de la función o expresión de miembros de una ruta que comprende las proteínas diana. Estos miembros pueden estar antes o después de la proteína diana en dicha ruta.

En el presente documento se describe además que el nivel de actividad (incluyendo, como se ha definido anteriormente, el nivel de expresión) es menor del 90%, más preferido menor del 80%, menor del 70%, menor del 60% o menor del 50% de la actividad en ausencia del inhibidor. También se describen inhibidores que disminuyen el nivel a menos del 25%, menos el 10%, menos del 5% o menos del 1% de la actividad en ausencia del inhibidor.

La eficacia del inhibidor se puede cuantificar comparando el nivel de actividad en presencia del inhibidor con ese en ausencia del inhibidor. Por ejemplo, como una medida de actividad se puede usar: el cambio en la cantidad de ARNm formado, el cambio en la cantidad de proteína formada, el cambio en la actividad de CD20, Cox-2 y/o PTEN, y/o un cambio en el fenotipo celular o en el fenotipo de un organismo.

La función de cualquiera de los inhibidores a que se hace referencia en el presente documento se puede identificar y/o verificar usando ensayos de cribado de alto rendimiento (HTS). Los ensayos de alto rendimiento, independientemente de ser ensayos bioquímicos, celulares u otros, generalmente se pueden realizar en pocillo de placas de microtitulación, en donde cada placa puede contener, por ejemplo, 96, 384 o 1536 pocillos. El manejo de las placas, incluyendo la incubación a temperaturas diferentes de temperatura ambiente, y poner en contacto los compuestos de prueba con la mezcla de ensayo preferiblemente se efectúa por uno o más sistemas robóticos controlados por ordenador que incluyen dispositivos de pipeteo. En el caso de que se vayan a cribar grandes bibliotecas de compuestos de prueba y/o el cribado se vaya a realizar en un tiempo corto, se pueden añadir mezclas de, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50 o 100 compuestos de prueba a cada pocillo. En caso de que un pocillo muestre actividad biológica, dicha mezcla de compuestos de prueba se puede desconvolucionar para identificar el uno o más compuestos de prueba en dicha mezcla que dan lugar a la actividad biológica observada.

Además, se puede realizar la determinación de la unión de potenciales inhibidores en, por ejemplo, cualquier ensayo de unión, preferiblemente ensayo de unión biofísico, que se puede usar para identificar la unión de moléculas de prueba antes de realizar el ensayo funcional/de actividad con el inhibidor. Los ensayos de unión biofísicos adecuados se conocen en la técnica y comprenden ensayo de polarización de fluorescencia (FP), ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) y ensayo de resonancia plasmón de superficie (SPR).

En casos donde el inhibidor actúa afectando el nivel de expresión de la proteína diana, la determinación del nivel de expresión de la proteína se puede, por ejemplo, llevar a cabo a nivel de ácido nucleico o a nivel de aminoácido, como se ha descrito en el presente documento anteriormente.

También se describe en el presente documento que el inhibidor es un anticuerpo, un aptámero, un ARNip, un ARNhc, un miARN, una ribozima, una molécula de ácido nucleico antisentido o una molécula pequeña.

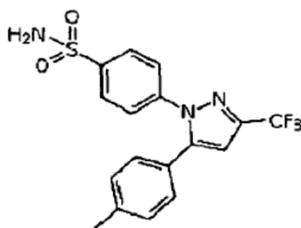
El término “agentes que afectan las rutas de señalización de MTAP” se refiere a agentes que no se unen necesariamente directamente a MTAP, pero interfieren con la actividad de señalización de MTAP, por ejemplo, uniéndose a y/o inhibiendo la función o expresión de miembros de la ruta de MTAP. Por ejemplo, Wild *et al.* 2006¹³ describen que la expresión de MTAP se correlaciona con sensibilidad a terapia de interferón, haciendo de esta manera el interferón un agente terapéutico adecuado en melanomas malignos que expresan MTAP. Se han descrito detalles adicionales, por ejemplo, en Behmann *et al.* 2003.

Los inhibidores de CD20, Cox-2 y/o agentes que afectan las rutas de señalización de MTAP y/o la adición de la ruta oncogénica de PTEN se conocen bien en la técnica e incluyen, sin ser limitantes, cualquiera de los compuestos enumerados en el presente documento anteriormente.

En el presente documento se describe además que la composición farmacéutica comprende Rituximab, Colecoxib o interferón alfa.

Rituximab es un anticuerpo también vendido bajo los nombres comerciales MabThera® (por Roche) o Rituxan® (por Biogen Idec/Genentech) que tiene el número de acceso del DrugBank DB00073 y el código ATC (sistema de clasificación anatómica terapéutica química) L01XC02.

Celecoxib, también conocido como Celebrex, Celebra u Onsenal (vendido por Pfizer), es un fármaco antiinflamatorio no esteroideo sulfa y tiene el número de acceso a DrugBank APRD00373, así como el código ATC L01XX33 M01AH01. Celecoxib tiene la fórmula estructural:



A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, la especificación de patente, incluyendo las definiciones, prevalecerá.

Las figuras muestran:

Figura 1: La firma de siete marcadores y supervivencia de 362 pacientes con melanoma maligno primario. El panel **A** muestra los perfiles de expresión por IHC de 362 muestras de tumores de la cohorte primaria ordenados por su puntuación de riesgo predicha. Cada columna representa un paciente individual que consiste en los valores de expresión de la firma de siete marcadores (5 marcadores de riesgo y 2 marcadores protectores). La magnitud de la puntuación de riesgo correspondiente se representa debajo para 181 pacientes de bajo riesgo (gris claro; parte izquierda del perfil de expresión) y 181 pacientes de alto riesgo (gris oscuro; lado derecho del perfil de expresión). Los valores de expresión por IHC se escalaron entre 0 (gris claro) y 1 (gris oscuro) para representación solo. Las células blancas representan valores que faltan (n.a.). Los paneles **B-E** muestran estimaciones de Kaplan-Meier de supervivencia global y sin recaída para pacientes de alto riesgo y pacientes de bajo riesgo de la cohorte primaria según la firma de nueve marcadores (paneles B, C) y su versión reducida, la firma de siete marcadores (paneles D, E), respectivamente. La igualdad en la esperanza de supervivencia de los subgrupos se evalúa por la prueba del orden logarítmico. Eliminar los dos marcadores “menos específicos” (MLH1 y CD49d) de la firma no reduce el poder

estadístico de la puntuación de riesgo predicha. La diferencia entre pacientes de alto riesgo y pacientes de bajo riesgo es muy significativa ($p < 0,001$) para la firma de siete marcadores.

Figura 2: Validación de la firma de siete marcadores y el procedimiento de selección de marcadores FDR.

Las estimaciones de Kaplan-Meier de supervivencia global (panel **A**) y sin recaída (panel **B**) para la cohorte de prueba externa independiente de 225 pacientes (TMA 2) confirma el poder pronóstico predictivo de la firma ($p < 0,001$). Además, el procedimiento de selección de marcadores FDR se probó mediante un experimento de validación cruzada de 10 veces en los 362 pacientes de la cohorte primaria (TMA 1) produciendo aún estimaciones significativas para supervivencia global ($p < 0,001$; panel **C**) y supervivencia sin recaída ($p = 0,013$, panel **D**).

Figura 3: La firma de siete marcadores y supervivencia de pacientes con un espesor tumoral $\leq 2,0$ mm.

Las estimaciones de Kaplan-Meier muestran una supervivencia global ($p = 0,0053$, panel **A**) y sin recaída ($p = 0,008$, panel **B**) significativamente menores para pacientes con un espesor tumoral comparativamente bajo $\leq 2,0$ mm, pero alta puntuación de riesgo. **C, D. Validación cruzada dejando uno fuera.** Para investigar el error de generalización de los modelos producidos por el procedimiento de aprendizaje de la firma FDR se realizó un experimento de validación cruzada que deja uno fuera en la cohorte primaria de 362 pacientes de MM. La puntuación de riesgo resultante pudo diferenciar significativamente ($p < 0,001$) entre pacientes con esperanza de supervivencia global mayor o menor. Los dos grupos de pacientes también se diferencian significativamente ($p = 0,0057$) en la supervivencia sin recaída. **E. Prueba de permutación.** Además de los experimentos de validación cruzada se realizó una prueba de permutación para evaluar si el procedimiento de aprendizaje de la firma está sobreajustando el conjunto de datos. La firma resultante, que se aprendió sobre datos de supervivencia global permutados, no era capaz de distinguir ($p = 1$) entre pacientes con esperanza de supervivencia diferente. Este resultado indica que el procedimiento de aprendizaje propuesto no sobreajusta los datos. **F. Coeficientes e intervalos de confianza de la firma de siete marcadores.** Los coeficientes de los modelos de riesgos proporcionales de Cox univariados se usan en una combinación lineal ponderada para predecir la puntuación de riesgo para cada paciente. Los marcadores con coeficientes negativos representan marcadores protectores (MTAP, β -catenina); esos con coeficientes positivos marcadores de riesgo (Bax, CD20, Bcl-X, PTEN y COX-2).

Figura 4. Cocientes de riesgos de la firma de nueve marcadores aprendida por el procedimiento de selección FDR.

Los marcadores con un cociente de riesgos menor de 1,00 representan marcadores protectores (MTAP, β -catenina); esos con cocientes de riesgos mayores de 1,00 representan marcadores de riesgo (Bax, CD20, Bcl-X, PTEN, COX-2, MHL1 y PTEN).

Figura 5. Correlación entre marcadores de la invención.

Figura 6: La firma de seis marcadores y supervivencia de 362 pacientes con melanoma maligno primario.

Las figuras 6A y 6B muestran estimaciones de Kaplan-Meier de supervivencia global (Fig. 6A) y sin recaída (Fig. 6B) para pacientes de alto riesgo y pacientes de bajo riesgo de la cohorte primaria según una firma de seis marcadores reducida adicionalmente. Se eliminó CD20 de la firma de siete marcadores y se probó el poder estadístico de la puntuación de riesgo de seis marcadores (por Bax, Bcl-X, β -catenina, COX-2, MTAP, PTEN). Entre los 362 pacientes de la cohorte primaria, pacientes con una firma de alto riesgo de seis marcadores tenían una supervivencia global (Fig. 6A) y sin recaída (Fig. 6B) mediana significativamente más cortas que los pacientes con una firma de seis marcadores de bajo riesgo. La diferencia entre los dos grupos de pacientes era muy significativa para la supervivencia global ($p = 0,000000047$; Fig. 6A) y sin recaída ($p = 0,0013$; Fig. 6B), respectivamente. Esta observación apoya el fuerte poder estadístico y valor predictivo de este conjunto de biomarcadores con el curso de la enfermedad de melanoma. La figura 6 se refiere a la cohorte primaria de pacientes caracterizados en la figura 1.

Figura 7: La firma de cinco marcadores y supervivencia de 362 pacientes con melanoma maligno primario.

Las figuras 7A y 7B muestran estimaciones de Kaplan-Meier de supervivencia global (Fig. 7A) y sin recaída (Fig. 7B) para pacientes de alto riesgo y pacientes de bajo riesgo de la cohorte primaria según una firma de cinco marcadores reducida adicionalmente. Se eliminaron CD20 y PTEN de la firma de siete marcadores y se probó el poder estadístico de la puntuación de riesgo de cinco marcadores (por Bax, Bcl-X, β -catenina, COX-2, MTAP). Entre los 362 pacientes de la cohorte primaria, pacientes con una firma de alto riesgo de seis marcadores tenían una supervivencia global (Fig. 6A) y sin recaída (Fig. 6B) mediana significativamente más cortas que los pacientes con una firma de seis marcadores de bajo riesgo. La diferencia entre los dos grupos de pacientes era muy significativa para la supervivencia global ($p = 0,00000066$; Fig. 7A) y sin recaída ($p = 0,0024$; Fig. 7B), respectivamente. Esta observación apoya el fuerte poder estadístico y valor predictivo de este conjunto de biomarcadores con el curso de la enfermedad de melanoma. La figura 7 se refiere a la cohorte primaria de pacientes caracterizados en la figura 1.

Los ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Micromatrices de tejidos (TMA)

Se construyeron las TMA como se ha descrito previamente¹²⁻¹⁴ y basadas en material de melanoma primario, recogido entre 1994 y 2006. **TMA 1**, la cohorte primaria, contenía muestras de sacabocados de tejidos de 364 melanomas malignos consecutivos (no seleccionados), fijados en formalina, incluidos en parafina de 364 pacientes diferentes y eran del Departamento de Dermatología, Hospital Universitario de Ratisbona, Alemania. **TMA 2**, la cohorte secundaria, que se usó como cohorte de validación externa independiente, consistía en muestras de melanoma consecutivas (no seleccionadas) de 235 pacientes del Departamento de Dermatología, Hospital Universitario de Hamburgo, Alemania. Para pacientes con neoplasias posteriores múltiples, solo se incluyeron los melanomas malignos primarios iniciales y únicos. Secciones teñidas con H&E de todos los melanomas malignos fueron evaluadas por dos histopatólogos. Las características clinicopatológicas de las dos cohortes independientes de pacientes de melanoma se dan en la tabla 4. Los datos de seguimiento clínico proporcionados por los registros locales de tumores, estuvieron disponibles para todos los pacientes de la cohorte primaria (n=364) y 231 pacientes de la cohorte secundaria. Los pacientes se censuraron a los 120 meses, si su seguimiento superaba el ámbito de 10 años del estudio. El estudio para ambas cohortes fue aprobado por los comités de ética científica locales (No. de aprobación 07/093 para Ratisbona y MC-028/08 para Hamburgo). El estudio retrospectivo se realizó según la Declaración de los Principios de Helsinki.

Tabla 4

Características de TMA	Primaria		Prueba de Ext.	
	N	%	N	%
Origen	Ratisbona		Hamburgo	
Pacientes				
No. de pacientes	364		235	
No. de seguimiento	364	100,0	231	98,3
No. de pacientes con al menos 1 marcador de firma	362	99,5	225	95,7
Manchas de TMA				
No. de biomarcadores	70		7	
Manchas válidas	23106	90,7	1541	93,7
Manchas que faltan	2374	9,3	104	6,3
Clinopatológico	N	%	N	%
Edad				
<=60	180	49,5	139	59,1
>60	184	50,5	92	39,1
desconocido			4	1,7
Sexo				
Hombre	195	53,6	126	53,6
Mujer	169	46,4	105	44,7
desconocido			4	1,7
Espesor tumoral				
<= 1mm	163	44,8	110	46,8
1,01--	92	25,3	47	20,0
2,01--	61	16,8	36	15,3
>4 mm	42	11,5	36	15,3
desconocido	6	1,6	6	2,6
Nivel de Clark				
1	2	0,5	1	0,4
2	75	20,6	39	16,6
3	106	29,1	80	34,0
4	149	40,9	90	38,3
5	14	3,8	19	8,1
desconocido	18	4,9	6	2,6
Patrón de crecimiento				
SSM	170	46,7	146	62,1
NMM	56	15,4	49	20,9
LMM	42	11,5	12	5,1
ALM	28	7,7	8	3,4
NOS	68	18,7	20	8,5
Datos inmunohistoquímicos	N	%	N	%
Bax				
0	5	1,4	5	2,1
1	60	16,5	49	20,9
2	95	26,1	81	34,5
3	88	24,2	56	23,8
4	88	24,2	29	12,3
desconocido	28	7,7	15	6,4
b-catenina				
0	10	2,7	4	1,7
1	121	33,2	43	18,3
2	106	29,1	108	46,0
3	71	19,5	53	22,6
4	17	4,7	11	4,7
desconocido	39	10,7	16	6,8
CD20				
0	333	91,5	154	65,5
1	12	3,3	48	20,4
2	4	1,1	16	6,8
3	1	0,3	1	0,4
desconocido	14	3,8	16	6,8
BCL-X				
0	151	41,5	66	28,1

1	167	45,9	117	49,8
2	26	7,1	38	16,2
3	1	0,3	4	1,7
desconocido	19	5,2	10	4,3
MTAP				
0	56	15,4	103	43,8
1	245	67,3	101	43,0
2			16	6,8
desconocido	63	17,3	15	6,4
PTEN				
0	57	15,7	23	9,8
1	140	38,5	87	37,0
2	116	31,9	76	32,3
3	28	7,7	25	10,6
4	4	1,1	8	3,4
desconocido	19	5,2	16	6,8
Cox-2				
0	121	33,2	20	8,5
1	188	51,6	103	43,8
2	39	10,7	73	31,1
3	5	1,4	21	8,9
4			2	0,9
desconocido	11	3,0	16	6,8
CD49d				
0	63	17,3		n.a.
1	137	37,6		
2	78	21,4		
3	33	9,1		
4	3	0,8		
desconocido	50	13,7		
MLH1				
0	65	17,9		n.a.
1	130	35,7		
2	99	27,2		
3	37	10,2		
4	13	3,6		
desconocido	20	5,5		

Tabla 4: Caracterización y comparación de la cohorte primaria (TMA 1) y la cohorte de prueba externa (TMA 2). Se describen el número de cuentas y los porcentajes asociados para todas las muestras en las micromatrices de tejido. CD49d y MLH1 no están contenidos en la firma de siete marcadores final y por tanto no se analizaron en la TMA 2 de prueba externa. Los valores que faltan se enumeran como “desconocido”.

5

Análisis inmunohistoquímico

Se cribaron preparaciones incluidas en parafina de tejidos de melanoma para expresión de proteínas según protocolos de inmunohistoquímica (IHC) estandarizados como se ha descrito previamente¹²⁻¹⁴. Los anticuerpos primarios usados en este estudio se seleccionaron para indicar en aspectos claves de apoptosis, ciclo celular, transducción de señales, adhesión celular, diferenciación y proliferación de melanoma, y metabolismo tumoral.

Todas las investigaciones de IHC se basaron en un método de avidina-biotina peroxidasa con un cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC). Después de la recuperación de antígeno (hervidor de vapor con tampón citrato, pH 6,0 o con tampón Tris-EDTA, pH 9,0 durante 20 minutos), se llevó a cabo la inmunohistoquímica aplicando el kit ZytoChemPlus HRP Broad Spectrum (Zytomed Systems, Berlín, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las tinciones de IHC se realizaron para 70 anticuerpos primarios diferentes (la fuente y concentración se enumeran en la tabla 5). Los marcadores citoplásmicos y nucleares se visualizaron con solución de AEC (Cromógeno sustrato de alta sensibilidad ACE+, listo para usar, DAKO, Glostrup, Dinamarca). El color rojo del cromógeno sustrato AEC (3-amino-9-etilcarbazol) es muy beneficioso para descartar la posibilidad de un papel de melanina endógena en la reactividad observada. Todas las secciones se contratiñeron con hematoxilina (DAKO). Se obtuvieron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario. Dos dermatohistopatólogos realizaron una evaluación enmascarada de las secciones teñidas sin conocimiento de los datos clínicos. La especificidad de los anticuerpos comerciales se ha probado minuciosamente por inmunotransferencia usando melanocitos y una variedad de líneas celulares humanas incluyendo varias líneas celulares de melanoma.

25

Nombre de la proteína	HUGO: Símbolo	Grupo funcional	Fuente	Clon	Dilución	Localización celular	Control positivo
-----------------------	---------------	-----------------	--------	------	----------	----------------------	------------------

	aprobado						
Akt 3	AKT3	Señalización, apoptosis	Abgent	Conejo, policlonal	1:100	Citoplásmica	Cáncer de mama
Fosfo-Akt (Thr308)	Fosfo-AKT3	Señalización, apoptosis	Cell Signalling	Conejo, 244F9H2	1:10	Citoplásmica	Cáncer de mama
Bax	BAX	Apoptosis	Cell Signalling	Conejo, policlonal	1:10	Citoplásmica	Cáncer de pulmón
Bcl2	BCL2	Apoptosis	Dako	Ratón, 124	1:100	Citoplásmica	Riñón
Bcl-X	BCL2L1	Apoptosis	Diagnostic Biosystems	Ratón, 2H12	1:10	Citoplásmica, membrana celular	Amígdalas
Bcl2L1	BCL2L1	Apoptosis	Abcam	Ratón, SPM165	1:200	perinuclear	Melanoma
BMI1	BMI1	Transcripción	Abgent	Conejo, policlonal	1:25	Citoplásmica	Cáncer de mama
B-Raf	BRAF	Señalización, apoptosis	Epitomics	Conejo, EP152Y	1:50	Citoplásmica	Cáncer de próstata
E-cadherina	CDH1	Contacto célula-célula	Chemicon	Ratón, 36B5	r-t-u	Membrana celular	Cáncer de mama
P-cadherina	CDH3	Contacto célula-célula	BD Biosciences	Ratón, 56	1:20	Membrana celular	Placenta
β-catenina	CTNNB1	Contacto célula-célula	Cell Signalling	Conejo, policlonal	1:250	citoplásmica, nuclear, membrana celular	Cáncer de mama
Fosfo-β-catenina	fosfo-CTNNB1	Contacto célula-célula	Cell Signalling	Conejo, policlonal	1:50	Nuclear	Cáncer de mama
Caveolina	CAV1	Contacto célula-célula	BD Biosciences	Conejo, policlonal	1:1000	Membrana celular	Placenta
CD20	MS4A1	Diferenciación, cand. marcador de células madre	Zyted	Ratón, L26	r-t-u	Membrana celular, citoplásmica	Amígdalas
CD44	CD44	Contacto célula-célula, cand. marcador de células madre	Lab Vision	Ratón, 156-3C11	1:2000	Membrana celular	Amígdalas
CD49d	ITGA4	Contacto célula-célula, cand. marcador de células madre	Acris	Conejo, policlonal	1:50	Membrana celular	Cáncer de mama
CD117 (c-kit)	KIT	Proliferación, cand. marcador de células madre	Dako	Conejo, policlonal	1:600	Membrana celular, citoplásmica	Cáncer colorrectal
CD166	ALCAM	Contacto célula-célula, cand. marcador de células madre	Abcam	Ratón, MOG/07	1:50	Membrana celular	Cáncer de próstata
CD171	L1CAM	Contacto célula-célula	Sigma	Conejo	1:350	Citoplásmica	Cáncer de mama
CDK2	CDK2	Ciclo celular	Thermo Scientific	Ratón 2B6 + 8D4	1:200	Citoplásmica, nuclear	Amígdalas
c-Myc	MYC	Ciclo celular, proliferación	Santa Cruz	Ratón, monoclonal	1:500	Citoplásmica, nuclear	Cáncer colorrectal
Cox-2	MT-CO2	Metabolismo	Cayman	Ratón, monoclonal	1:200	Citoplásmica	Cáncer colorrectal
CXCR4	CXCR4	Contacto célula-célula, cand. marcador de células madre	Acris	Conejo, policlonal	1:750	Citoplásmica, membrana celular	Cáncer de mama

ES 2 568 753 T3

Ciclina A	CCNA1	Ciclo celular	Novo Castra	Ratón, 6E6	1:50	nuclear	Amígdalas
Ciclina D1	CCND1	Ciclo celular	Novo Castra	Ratón, DCS-6	1:20	Nuclear, citoplásmica	Cáncer de mama
Eph B2	EPHB2	Contacto célula-célula	Abcam	Conejo, policlonal	1:100	Membrana celular, citoplásmica	Cáncer de mama
efrina-B2	EFNB2	Contacto célula-célula	Santa Cruz	Conejo, policlonal	1:50	Membrana celular, citoplásmica	Melanoma
Ezrina	EZR	Señalización	Abcam	Ratón, 3C12	1:100	Membrana celular	Cáncer de pulmón
Fas	FAS	Apoptosis	Cell Signalling	Conejo, C18C12	1:10	Citoplásmica	Cáncer colorrectal
FZD-7	FZD7	Señalización	Acris	Conejo, policlonal	1:250	Citoplásmica	Placenta
Glut-1	SLC2A1	Metabolismo	Acris	Ratón, SPM498	1:200	Membrana celular	Cáncer de mama
HIF-1 α	HIF1A	Metabolismo	R+D	Ratón, 241812	1:20	Citoplásmica, nuclear	Cáncer de mama
Anti-melanosoma HMB45	-/-	Diferenciación	Dako	Ratón, MHB45	1:50	Citoplásmica	Melanoma
IGF-2	IGF2	Proliferación	Abcam	Conejo, policlonal	1:200	Citoplásmica	Placenta
iNOS	ISYNA1	Metabolismo	Abcam	Conejo, policlonal	1:200	Citoplásmica	Cáncer de pulmón
Ki-67	MKI67	Ciclo celular, proliferación	Dako	Ratón, MIB-1	1:100	Nuclear	Piel
MHC1	MYH11	Contacto célula-célula	Abcam	Ratón, 3F8	1:100	Membrana celular	Riñón
Melan A	MLANA	Diferenciación	Novo Castra	Ratón, A103	1:50	Citoplásmica	Piel
MITF	MITF	Diferenciación	Dako	Ratón, D5	1:50	Nuclear	Melanoma
MLH1	MLH1	Reparación de ADN	BD Pharmingen	Ratón, G168-15	1:50	Nuclear, citoplásmica	Cáncer colorrectal
MSH2	MSH2	Reparación de ADN	Calbiochem	Ratón, FE11	1:40	Nuclear, citoplásmica	Cáncer colorrectal
MTAP	MTAP	Metabolismo	ProteinTech Group	Conejo, policlonal	1:500	Citoplásmica	Cáncer de mama
MTSS1	MTSS1	Remodelado citoesqueleto	Abnova	Ratón, 2G9	1:500	Nuclear, citoplásmica	Cáncer colorrectal
MUM1p	IRF4	Transcripción	Santa Cruz	Ratón, monoclonal	1:10	Nuclear, citoplásmica	Cáncer de mama
NF- κ B	RELA	Transcripción	Santa Cruz	Ratón, F-6	1:500	Nuclear, citoplásmica	Cáncer de mama
N-Ras	NRAS	Señalización	Santa Cruz	Ratón, F155	1:50	Citoplásmica	Ganglio linfático
N-Ras	NRAS	Señalización	Santa Cruz	Ratón, F155	1:50	Citoplásmica	Ganglio linfático
p14	CDKN2A	Ciclo celular	Cell Signalling	Ratón, 4C6/4	1:10	Nuclear, citoplásmica	Cáncer de mama
p15	CDKN2B	Ciclo celular	Acris	Ratón, 15P06	1:25	Nuclear	Cáncer colorrectal
p16	CDKN2A	Ciclo celular	Santa Cruz	Ratón, F-12	1:50	Nuclear	Cáncer colorrectal
p21	CDKN1A	Ciclo celular	Dako	Ratón, SX118	1:50	Nuclear	Cáncer colorrectal
p27	CDKN1B	Ciclo celular	Dako	Ratón, SX53G8	1:50	Nuclear	Ganglio linfático
p53	TP53	Ciclo celular, apoptosis	Dako	Ratón, DO-7	1:25	Nuclear, citoplásmica	Cáncer de mama
p75 (NGFR)	NGFR	Diferenciación	Abcam	Conejo, EP1039Y	1:100	Membrana celular	Placenta

PGF	PGF	Proliferación	ProteinTech Group	Conejo, policlonal	1:50	Citoplásmica	Cáncer de mama
PMP2	PMP2	Diferenciación	ProteinTech Group	Conejo, policlonal	1:100	Citoplásmica	Glioma
PPAR α	PPARA	Señalización	Abcam	Conejo, policlonal	1:500	Citoplásmica, nuclear	Cáncer de mama
PTEN	PTEN	Señalización	Cell Signalling	Conejo, 138G6	1:100	Citoplásmica, nuclear	Cáncer colorrectal
Rb	RB1	Ciclo celular	Calbiochem	Ratón, LM95.1	1:50	Nuclear	Cáncer colorrectal
Fosfo-Rb	Fosfo-RB1	Ciclo celular	Cell Signalling	Conejo, policlonal	1:50	Nuclear	Cáncer colorrectal
Ro-52	TRIM21	Autoinmunidad	Santa Cruz	Ratón, D-12	1:200	Nuclear	n.d.
Survivina	BIRC5	Apoptosis	Cell Signalling	Conejo, 71G4	1:100	Nuclear	Cáncer colorrectal
SKP2	SKP2	Ciclo celular	Zytomed	Conejo, policlonal	1:200	Nuclear, citoplásmica	Cáncer de próstata
STAT1	STAT1	Señalización	Cell Signalling	Conejo, 42H3	1:200	Citoplásmica, nuclear	Cáncer colorrectal
Fosfo-STAT1 (S727)		Señalización	Abcam	Conejo, policlonal	1:100	Citoplásmica, nuclear	Cáncer de mama
S1P1	S1PR1	Ciclo celular	Cayman	Conejo, policlonal	1:50	Citoplásmica	Cáncer de mama
TGF- β 1	TGFB1	Proliferación	Zytomed	Conejo, policlonal	1:25	Citoplásmica, membrana celular	Cáncer colorrectal
Topoisomerasa IIa	TOP2A	Reparación de ADN	Dako	Ratón, Ki-S1	1:100	Nuclear, citoplásmica	Placenta
VEGFR-2	KDR	Proliferación	Cell Signalling	Conejo, 55B11	1:200	Citoplásmica	Cáncer colorrectal
XIAP (Birc4)	XIAP	Apoptosis	Lifespan	Conejo, policlonal	1:1000	Citoplásmica	Placenta

Tabla 5: Propiedades de los 70 candidatos a biomarcador para analizar inmunohistoquímicamente melanoma maligno en este estudio. Todos los anticuerpos investigados se enumeran indicando la fuente, dilución, patrón de reactividad y control positivo. La firma descrita se aprendió estadísticamente por el procedimiento de selección FDR de este conjunto de 70 biomarcadores.

5 Un dermatohistopatólogo y un patólogo quirúrgico realizaron una evaluación enmascarada, rigurosa de las secciones teñidas como se ha descrito previamente^{13,14}. Se evaluaron la inmunorreactividad citoplásmica y nuclear usando un sistema de puntuación escalonada (de 0 a 4+): 0 (negativo): sin tinción citoplásmica o el 0% de núcleos celulares teñidos; 1+: tinción citoplásmica débil o menos del 20% de núcleos celulares teñidos; 2+: tinción citoplásmica moderada o del 21 al 50% de núcleos celulares teñidos; 3+: tinción citoplásmica fuerte o del 51 al 90% de núcleos celulares teñidos; 4+: tinción citoplásmica muy fuerte o tinción nuclear mayor del 90%. Este sistema de puntuación semicuantitativa se usó consistentemente para los 70 marcadores analizados. Se estimaron los marcadores citoplásmicos según la intensidad de tinción encontrada en las células de melanoma de la mancha de TMA individual. Para los marcadores nucleares, se evaluó el porcentaje de núcleos de células de melanoma con tinción positiva. Las manchas de TMA con una falta de tejido tumoral o presencia de necrosis o artefacto aplastado se excluyeron del análisis.

Análisis estadístico

20 Se realizó una estimación del poder estadístico frente al tamaño de muestra total N para diferentes cocientes de riesgos. Según esto, el tamaño de muestra disponible de 364 pacientes analizables en TMA1 sería suficiente para detectar una diferencia respecto a supervivencia con una significación de $p < 0,05$ y un poder de casi el 100%. Se realizaron cálculos usando los modelos respectivos del software PASS 2008 (NCSS, Kaysville, UT).

25 Uno de los principales problemas estadísticos en estudios de IHC a gran escala son los valores que faltan en la matriz de diseño debido a manchas que faltan o corruptas en la TMA. Cuantos más marcadores se investigan, mayor es la probabilidad de que al menos falte un valor por paciente. Con frecuencia, este problema se aborda bien sacrificando un gran número de historias clínicas o empleando técnicas de imputación múltiple volátil. En este estudio el 9,3% de los valores faltan lo que reduciría el conjunto de pacientes con todas las medidas de IHC de 364 a 170. Algoritmos como bosques aleatorios de supervivencia¹⁵ y aprendizaje ensemble con potenciación de gradiente¹⁶ son capaces de ocuparse de los valores que faltan, pero producen modelos, que no son intuitivamente

interpretables y difíciles de implementar en la práctica clínica. Para superar estos problemas se empleó el siguiente procedimiento de aprendizaje que es invariable a valores que faltan y produce un modelo lineal fácilmente interpretable y prácticamente aplicable.

5 El poder pronóstico de los 70 marcadores se evaluó por modelos de aprendizaje de riesgo proporcional univariable¹⁷, que da 11 marcadores significativamente asociados con supervivencia global. Para corregir por prueba múltiple, se aplicó el procedimiento de tasa de falso descubrimiento (FDR)¹⁸ con una FDR de 0,15 que reduce el conjunto de marcadores significativamente asociados a 9. Se calculó una puntuación de riesgo para cada paciente por una combinación lineal de los coeficientes de regresión de Cox univariable β y las correspondientes medidas de IHC x . Por último, la puntuación se normaliza por el número de marcadores medidos:

$$\text{puntuación}(\mathbf{x}) = \left(\sum_{i=1}^{|\mathbf{x}|} (\beta_i x_i) 1_{[\exists x_i]} \right) / \left(\sum_{i=1}^{|\mathbf{x}|} 1_{[\exists x_i]} \right)$$

15 Basado en esta puntuación de riesgo, los pacientes se asignaron a un grupo de alto riesgo y un grupo de bajo riesgo, separados en el percentil 50 (mediana) de todas las puntuaciones. Por tanto, el modelo final consiste en el vector coeficiente β y el umbral mediana θ .

Una versión simplificada de este cálculo de la puntuación de riesgo es como se ha descrito en el presente documento anteriormente, es decir:

20

$$\text{puntuación}(x) = \left(\sum_{i=1}^D (\beta_i x_i) \alpha_i \right) / \left(\sum_{i=1}^D \alpha_i \right), \quad \alpha_i = \begin{cases} 1, & \text{si } x_i \text{ existe} \\ 0, & \text{si } x_i \text{ falta} \end{cases}$$

Se usaron factores de estimación de Kaplan-Meier no paramétricos¹⁹ para analizar la supervivencia global y la supervivencia sin recaída. Las diferencias entre estimaciones de supervivencia se evaluaron con la prueba del orden logarítmico (LTR)²⁰. Se consideró que valores p por debajo de 0,05 indicaban significación estadística. Los análisis estadísticos se realizaron usando R versión 2.11²¹.

25

Validación estadística

30 La validez del procedimiento de aprendizaje y por tanto la precisión de la firma se evaluó en tres experimentos de validación diferentes. Primero, se empleó validación cruzada de dejar uno fuera excluyendo un paciente en un momento del conjunto de entrenamiento y posteriormente, puntuando el paciente dejado fuera con la firma aprendida del resto de los pacientes. Repetir este procedimiento 364 veces da una estimación de puntuación dejando uno fuera para cada paciente en el estudio. La diferencia resultante entre pacientes de alto riesgo y pacientes de bajo riesgo era muy significativa ($p < 0,001$) y se representa en la figura 3C y D.

35

Segundo, se realizó una validación cruzada de 10 veces repartiendo el conjunto de datos en 10 partes de igual tamaño usando el 90% de los pacientes para aprendizaje y el 10% para validación. El procedimiento se repitió 10 veces produciendo una puntuación de 10 veces para cada paciente. Como se esperaba, la diferenciación resultante entre pacientes de alto riesgo y bajo riesgo era peor en términos del valor p de LTR, pero era todavía muy significativa ($p < 0,001$) como se muestra en la figura 2C y D.

40

El tercer experimento de validación se realizó para evaluar si el procedimiento de selección de marcadores propuesto tiende al sobreajuste. Para este fin, la variable diana se permutó aleatoriamente y se aprendió un modelo para predecir la puntuación de riesgo basado en este dato distorsionado. La figura 3E ilustra que era imposible aprender una puntuación significativa ($p > 0,5$) basada en marcadores permutados. Aunque se analizaron un gran número de marcadores para aprender la firma, este resultado indica que el algoritmo propuesto no sobreajusta.

45

Ejemplo 2: La firma de nueve marcadores y supervivencia.

50 El procedimiento de aprendizaje propuesto basado en los coeficientes de regresión de Cox y corrección de pruebas múltiples con FDR dio nueve marcadores que se correlacionaban con muerte por cualquier causa. Dos de estos marcadores eran marcadores protectores (asociados con un cociente de riesgos de menos de 1,00) y siete eran marcadores de riesgo (asociados con un cociente de riesgos de más de 1,00) (Fig. 4).

55 Entre los nueve marcadores estaban Bax y Bcl-X, dos reguladores principales de la ruta de apoptosis mitocondrial "intrínseca"²². Además, β -catenina, un efector posterior clave en la ruta de señalización de Wtn²³, y CD20, un

marcador de células B conocido recientemente sugerido como marcador candidato para células madre de melanoma²⁴. CD49d, una α 4-integrina (ITGA4) que participa en señalización mediada por superficie celular y adhesión, también estaba incluido²⁵. Aparte de esto, COX-2, una ciclooxigenasa también denominada prostaglandina H sintasa 2 con sobreexpresión en una variedad de tumores incluyendo tumores de melanoma era parte de la firma¹⁴. Otros dos marcadores eran MLH1, una proteína de reparación de mal emparejamiento de ADN²⁶, y MTAP, una “enzima de mantenimiento” en el metabolismo de poliaminas y proteína moduladora de los mecanismos de respuesta a interferón^{13,27}. Por último, se identificó la fosfatasa supresora de tumores y homólogo de tensina PTEN como otra proteína de la firma. PTEN contrarresta una las rutas que fomentan cáncer más críticas²⁸, la ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt. Clínicamente, la mutación y deficiencias de *PTEN* son prevalentes en muchos tipos de cánceres humanos y la pérdida de PTEN funcional tiene sustancial impacto en múltiples aspectos del desarrollo del cáncer. MTAP y β -catenina eran los únicos marcadores protectores, mientras que los otros siete marcadores (Bax, Bcl-X, CD20, CD49d, COX-2, MLH1, PTEN) eran marcadores de riesgo asignados.

La tabla 1 enumera las características de 362 pacientes en el estudio (dos pacientes se retiraron debido a la falta de los nueve marcadores de la firma). Entre estos 362 pacientes de la cohorte primaria tumores con puntuaciones de alto riesgo expresaban marcadores de riesgo, mientras que los tumores con puntuaciones de bajo riesgo expresaban marcadores protectores (Fig. 1A). Los pacientes con una firma de nueve marcadores de alto riesgo tenían una supervivencia global mediana menor que la esos con una firma de nueve marcadores de bajo riesgo (90 meses frente a no alcanzada) (Fig. 1B). Los pacientes con tumores con una firma de marcadores de alto riesgo se asociaron con una supervivencia sin recaída mediana menor que los pacientes con una firma de genes de bajo riesgo (36 meses frente a 88) (Fig. 1C).

Los experimentos de validación cruzada mostraron resultados comparables y demostraron que aprender una firma de marcadores para supervivencia global es factible y reproducible (Fig. 2C, D). Para la validación cruzada dejando uno fuera, los pacientes con puntuaciones de alto riesgo tuvieron una supervivencia mediana de 94 meses mientras que la supervivencia mediana para pacientes con firma de bajo riesgo no se alcanzó (Fig. 3C). La diferencia en esperanza de supervivencia entre pacientes con puntuación de alto riesgo y puntuación de bajo riesgo era muy significativa ($p=0,000067$). Aunque la validación cruzada de 10 veces tiene un sesgo menor y varianza mayor la diferencia entre el grupo de alto riesgo y bajo riesgo (94 meses frente a no alcanzada) era aún significativa ($p=0,00017$) como se muestra en la figura 2C. En contraste a los experimentos de validación cruzada no fue posible aprender una firma para predecir marcadores permutados ($p>0,5$), lo que indica que el procedimiento de aprendizaje propuesto no sobreajusta. En la prueba de permutación la supervivencia mediana no se alcanzó por ningún grupo de riesgo (Fig. 3E).

Ejemplo 3: La firma de siete marcadores y supervivencia.

El fin de este estudio era proporcionar un máximo de pronóstico e información terapéuticamente relevante mediante un mínimo de marcadores combinado en una firma clara. Por viabilidad clínica y ahorro de costes, un conjunto de marcadores de IHC adecuado para evaluación clínica rutinaria se debe basar en un número limitado de anticuerpos. Según esto, la firma de nueve marcadores se redujo por el marcador de riesgo con los menores coeficientes de regresión de Cox β , es decir, MLH1 ($\beta = 0,254$). Posteriormente, los restantes 8 marcadores de riesgo se evaluaron respecto a su impacto en el desarrollo y evolución del cáncer y potenciales implicaciones terapéuticas. En este marco, CD49d, una α -4 integrina (ITGA4) que participa en señalización mediada por superficie celular y adhesión, se consideró que era el marcador más prescindible. En particular, análisis por inmunotransferencia de esta proteína de 70-180 kDa no reveló una banda específica sino varias para un panel de líneas celulares de melanoma y melanocitos, respectivamente. La especificidad de todos los otros anticuerpos de IHC de la firma se pudo confirmar por inmunotransferencia.

Entre los 362 pacientes de la cohorte primaria, pacientes con una firma de siete marcadores (Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, COX-2, MTAP, PTEN) de alto riesgo tenían una supervivencia global mediana más corta que los pacientes con una firma de siete marcadores de bajo riesgo (88 meses frente a no alcanzada) y la diferencia entre los dos grupos de pacientes era muy significativa ($p=0,0000000042$) (Fig. 1D). La firma de siete marcadores de alto riesgo se asoció con una supervivencia sin recaída mediana de 33 meses, mientras que la firma de siete marcadores de bajo riesgo se asoció con una supervivencia sin recaída mediana de 88 meses (LTR $p=0,00034$, Fig. 1E).

Según el análisis de regresión de Cox multivariable, la puntuación de riesgo de siete marcadores, el espesor tumoral, sexo, y edad estaban significativamente asociados con muerte por cualquier causa entre los 356 pacientes (se eliminaron 6 observaciones debido a valores que faltaban) (tabla 1).

Un análisis de subgrupo de 253 pacientes con una profundidad tumoral de ≤ 2 mm reveló que esos 148 pacientes con una firma de alto riesgo tenían una supervivencia global ($p=0,0053$) (Fig. 3A) y supervivencia sin recaída ($p=0,008$) más corta significativa que los 105 pacientes con una firma de marcadores de bajo riesgo (Fig. 3B).

Ejemplo 4: Validación de la firma de siete marcadores en una cohorte de prueba externa

Las características clínicas de los 225 pacientes en la cohorte de prueba externa se enumeran en la tabla 2 (página 64). Los pacientes con una firma de marcadores de alto riesgo tenían una esperanza de supervivencia significativamente diferente ($p=0,000017$) y supervivencia global mediana más corta comparados con pacientes con una firma de bajo riesgo (95 meses frente a no alcanzada) (Fig. 2A). Según una regresión de Cox multivariable que incluye sexo, edad, espesor tumoral, ulceración y estado ganglionar, la firma de siete marcadores estaba significativamente asociada con supervivencia global ($p=0,0000098$, tabla 1). Además, la supervivencia sin recaída se diferenciaba significativamente entre los dos grupos de riesgo ($p=0,004$; Fig. 2B).

Ejemplo 5: La firma de seis marcadores y supervivencia

Después de que la firma de siete marcadores se redujera por el marcador CD20, la correspondiente firma de seis marcadores (Bax, Bcl-X, β -catenina, COX-2, MTAP, PTEN) aún mostró una correlación significativa con supervivencia global y sin recaída; es decir, entre los 362 pacientes de la cohorte primaria, los pacientes con una firma de seis marcadores (Bax, Bcl-X, β -catenina, COX-2, MTAP, PTEN) de alto riesgo tenían una supervivencia global (Fig. 6A) y sin recaída (Fig. 6B) mediana más corta que los pacientes con una firma de seis marcadores de bajo riesgo. La diferencia entre los dos grupos de pacientes era muy significativa para supervivencia global ($p=0,000000047$, Fig. 6A) y supervivencia sin recaída ($p=0,0013$, Fig. 6B), respectivamente.

Ejemplo 6: La firma de cinco marcadores y supervivencia

Después de que la firma de siete marcadores se redujera por los marcadores CD20 y PTEN, la correspondiente firma de cinco marcadores (Bax, Bcl-X, β -catenina, COX-2, MTAP) aún mostró una correlación significativa con supervivencia global y sin recaída; es decir, entre los 362 pacientes de la cohorte primaria, los pacientes con una firma de cinco marcadores (Bax, Bcl-X, β -catenina, COX-2, MTAP) de alto riesgo tenían una supervivencia global (Fig. 7A) y sin recaída (Fig. 7B) mediana más corta que los pacientes con una firma de cinco marcadores de bajo riesgo. La diferencia entre los dos grupos de pacientes era muy significativa para supervivencia global ($p=0,00000066$, Fig. 7A) y supervivencia sin recaída ($p=0,0024$, Fig. 7B), respectivamente

	Alto riesgo (N=181)	Bajo riesgo (N=181)	Valor p: riesgo alto frente a bajo	Análisis de regresión de Cox multivariable	
				Cociente de riesgos (IC al 95%)	Valor p
Puntuación de riesgo de 7 marcadores	0,270 \pm 0,098	0,04 \pm 0,071	<<0,0001 ^{#1}	24,91 (3,84- 161,71)	0,00076***
Edad – años	55,2 \pm 16	52,6 \pm 6,6	0,267 ^{#1}	1,02 (1,00-1,04)	0,016*
Sexo- No. de pacientes (%)					
Hombre	81 (55,1)	41 (54,7)	1 ^{#2}	0,67 (0,39-1,14)	0,14
Mujer	66 (44,9)	34 (45,3)			
Espesor tumoral - mm	2,55 \pm 2,67	1,08 \pm 1,17	0,0000000512 ^{#1}	1,28 (1,19-1,38)	0,000000000028***

^{#1} Prueba de t de dos muestras de Welch

^{#2} Prueba exacta de Fisher

* valor $p < 0,05$

*** valor $p < 0,001$

Tabla 2. Características clínicas de la cohorte de prueba externa de pacientes con MM (TMA 2). Comparar pacientes de alto riesgo (primera columna) con pacientes de bajo riesgo (segunda columna) basado en su puntuación de riesgo de siete marcadores muestra diferencia significativa en espesor tumoral ($p < 0,001$) y ninguna diferencia en sexo ($p=1$) y edad ($p=0,267$). Además, se describen los cocientes de riesgos y valores p para un modelo de regresión de Cox multivariable que comprende todas las variables enumeradas. Respecto a la supervivencia global la puntuación de riesgo de siete marcadores es estadísticamente significativa ($p < 0,001$) independientemente de sexo, edad y espesor tumoral. Se describen las variables continuas con media y desviación estándar y se enumeran las variables categóricas con número de cuentas y porcentajes.

Referencias

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin, 2008;58:71-96.
2. Lens MB, Dawes M. Global perspectives of contemporary epidemiological trends of cutaneous malignant melanoma. Br J Dermatol 2004;150:179-85.
3. Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, et al. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. J Clin Oncol 2001;19:3635-48.
4. Agarwala SS. Current systemic therapy for metastatic melanoma. Expert Rev Anticancer Ther 2009; 9:587-95.
5. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. J Clin Oncol 2009;27:6199-206.

6. Breslow A: Thickness, cross-sectional areas, and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970;172:902-8.
7. Grande Sarpa H, Reinke K, Shaikh L, et al. Prognostic significance of extent of ulceration in primary cutaneous melanoma. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1396-400.
- 5 8. Morton DL, Thompson JF, Cochran AJ, et al. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* 2006;355:1307-17.
9. Gould Rothberg BE, Bracken MB, Rimm DL. Tissue biomarkers for prognosis in cutaneous melanoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:452-74.
- 10 10. Gould Rothberg BE, Rimm DL. Biomarkers: The useful and the not so useful - an assessment of molecular prognostic markers for cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 2010;130:1971-87.
11. Reporting recommendations for tumour marker prognostic studies (REMARK). *J Natl Cancer Institute* 2005; 97:1180-4.
12. Alonso SR, Ortiz P, Pollan M, et al. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol* 2004;164:193-203.
- 15 13. Wild PJ, Meyer S, Bataille F, et al. Tissue microarray analysis of MTAP expression in melanocytic skin tumours. *Arch Dermatol* 2006;142:471-6.
14. Meyer S, Vogt T, Landthaler M, et al. Cyclooxygenase 2 (COX2) and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARG) are stage-dependent prognostic markers of malignant melanoma. *PPAR Res* 20 Jul 2009 (Epub antes de la impresión).
- 20 15. Ishwaran H, Kogalur UB, Blackstone EH, Lauer MS. Random survival forests. *Ann Appl Stat* 2008;2:841-60.
16. Hothorn T, Buehlmann P, Dudoit S, Molinaro A, van Der Laan MJ. Survival ensembles. *Biostatistics* 2006;7:355-73.
17. Cox DR. Regression models and life-tables. *J R Stat Soc Series B* 1972;34:187-220.
- 25 18. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 1995;57:289-300.
19. Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Amer Statist Assn* 1958;53:457-81.
20. Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep* 1966;50:163-70.
- 30 21. R Development Core Team (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
22. Lowe SW, Cepero E, Evan G. Intrinsic tumour suppression. *Nature* 2004;432:307-15.
23. Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, et al. Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development. *Genes Dev* 2007;21:2923-35.
- 35 24. Zabierowski SE, Herlyn M. Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma. *J Clin Oncol* 2008;26:2890-4.
25. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 2005;24:195-222.
26. Korabiowska M, Brinck U, Stachura J, et al. Exonic deletions of mismatch repair genes MLH1 and MSH2 correlate with prognosis and protein expression levels in malignant melanomas. *Anticancer Res* 2006;26:1231-5.
- 40 27. Behrmann I, Wallner S, Komyod W, et al. Characterization of methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) expression in malignant melanoma. *Am J Pathol* 2003;163:683-90.
28. Zhang S y Yu D. PI(3)king apart PTEN's rote in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:4325-30.
29. Avivi I, Robinson S, Goldstone A. Clinical use of rituximab in haematological malignancies. *Br J Cancer* 2003;89:1389-94.
- 45 30. Hia T y Neilson K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7384-8.
31. Denkert C, Köbel M, Berger S, et al. Expression of cyclooxygenase 2 in human malignant melanoma. *Cancer Res* 2001;61:1733-40.
32. Thun MJ, Henley SJ, Gansler T. Inflammation and cancer: an epidemiological perspective. *Novartis Found Symp* 2004;256:6-21.
- 50 33. Reichle A, Vogt T, Coras B, et al. Targeted combined anti-inflammatory and angiostatic therapy in advanced melanoma: a randomized phase II trial. *Melanoma Res* 2007;17:360-4.
34. Ascierto PA, Kirkwood JM. Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade. *J Transl Med* 2008;6:62.
35. Meyer S, Wild PJ, Vogt T, et al. Methylthioadenosine phosphorylase represents a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in patients with malignant melanoma. *Exp Dermatol* 2010;19:e251-7.
- 55 36. Azmi AS, Mohammad RM. Non-peptidic small molecule inhibitors against Bcl-2 for cancer therapy. *J Cell Physiol* 2009;218:13-21.
37. Heere-Ress E, Thallinger C, Lucas T, et al. Bcl-X(L) is a chemoresistance factor in human melanoma cells that can be inhibited by antisense therapy. *Int J Cancer* 2002;99:29-34.
- 60 38. Hauschild A, Agarwala SS, Trefzer U, et al. Results of a phase III, randomized, placebo-controlled study of sorafenib in combination with carboplatin and paclitaxel as second-line treatment in patients with unresectable stage III or stage IV melanoma. *J Clin Oncol* 2009;27:2823-30.
39. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010;363:711-23.

40. Meyer S, Wild PJ, Vogt T, Bataille F, Ehret C, Gantner S, Landthaler M, Klinkhammer-Schalke M, Hofstaedter F, Bosserhoff AK. Methylthioadenosine phosphorylase represents a predictive marker for response to adjuvant interferon therapy in patients with malignant melanoma. *Experimental Dermatology* 2010; 19(8), e251-e257.
- 5 41. Bakshi RP et al 2001: Functional and regulatory characteristics of eukaryotic type II DNA topoisomerase (review). *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 36: 1-37.
42. Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Vogel C, Kurz K, Morak M, Keller G, Holinski-Feder E, Hofstaedter F, Dietmaier W. MethyQESD, a robust and fast method for quantitative methylation analyses in HNPCC diagnostics using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue samples. *Lab Invest.* Dic 2008;88(12):1367-75.
- 10 43. Mirmohammadsadegh A, Marini A, Nambiar S, Hassan M, Tannapfel A, Ruzicka T, Hengge UR. Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res.* 1 Jul 2006;66(13):6546-52.
44. Lahtz C, Stranzenbach R, Fiedler E, Helmbold P, Dammann RH. Methylation of PTEN as a prognostic factor in malignant melanoma of the skin. *J Invest Dermatol.* Feb 2010; 130(2):620-2.
45. Zhou XP, Gimm O, Hampel H, Niemann T, Walker MJ, Eng C. Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol.* Oct 2000; 157(4): 1123-8.
- 15 46. Song L et al 2006: Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells.* 24: 1707-18.
47. Weinstein, B y Joe, A. Oncogene Addiction. *Cancer Res* 1 Mayo, 2008 68; 3077

REIVINDICACIONES

1. Un método de predecir el curso de la enfermedad en un paciente que tiene un melanoma maligno, el método comprende determinar en células de melanoma comprendidas en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno la presencia o cantidad de al menos cinco biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1, en donde la ausencia o cantidad disminuida de MTAP y β -catenina y/o la presencia o cantidad aumentada de PTEN, Bax, Bcl-X, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1 se asocia con un curso desventajoso de la enfermedad.
2. El método según la reivindicación 1, en donde los al menos cinco biomarcadores incluyen PTEN y/o MTAP.
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde se determinan al menos siete biomarcadores.
4. El método según la reivindicación 3, en donde los al menos siete biomarcadores son MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20 y Cox-2.
5. Un método de preparar una composición farmacéutica a medida para un paciente que tiene un melanoma maligno, el método comprende
 - (i) determinar en células de melanoma comprendidas en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno la presencia o cantidad de al menos cinco biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1, en donde la ausencia o cantidad disminuida de β -catenina y MTAP y/o la presencia o cantidad aumentada de PTEN, Bax, Bcl-X, CD20, Cox-2, CD49d y MLH1 se asocia con un curso desventajoso de la enfermedad;
 - (ii) derivar una pauta de tratamiento para el paciente individual basada en la presencia o cantidad de marcadores determinados en el paso (i); y
 - (iii) proporcionar al menos un compuesto farmacéutico basado en la pauta de tratamiento derivada en el paso (ii).
6. El método según la reivindicación 5, en donde los al menos cinco biomarcadores incluyen CD20, Cox-2 y/o MTAP.
7. El método según la reivindicación 5 o 6, en donde se determinan al menos siete biomarcadores.
8. El método según la reivindicación 7, en donde los al menos 7 biomarcadores son MTAP, PTEN, Bax, Bcl-X, β -catenina, CD20 y Cox-2.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la muestra se obtiene del tumor primario, un ganglio linfático o una metástasis y/o en donde la muestra es una muestra de tejido, una muestra de sangre o linfa.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la presencia o cantidad de los biomarcadores se analiza por métodos que determinan modificaciones genéticas o epigenéticas o niveles transcripcionales o de proteína o una combinación de los mismos.
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la presencia o cantidad de los biomarcadores se determina por inmunohistoquímica, espectrometría de masas, inmunotransferencia, transferencia Northern, PCR, hibridación in situ de ARN o una combinación de los mismos.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el biomarcador es proteína.
13. Un kit para predecir el curso de enfermedad en un paciente que tiene un melanoma maligno, el kit comprende:
 - (a) medios para determinar la presencia o cantidad del conjunto de biomarcadores como se ha definido por cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno,
 - (b) instrucciones de cómo usar el kit.
14. Un kit para derivar una pauta de tratamiento para un paciente individual que tiene un melanoma maligno, el kit comprende
 - (a) medios para determinar la presencia o cantidad del conjunto de biomarcadores como ha definido por el paso (i) de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8 en una muestra obtenida de dicho melanoma maligno,
 - (b) instrucciones de cómo usar el kit.

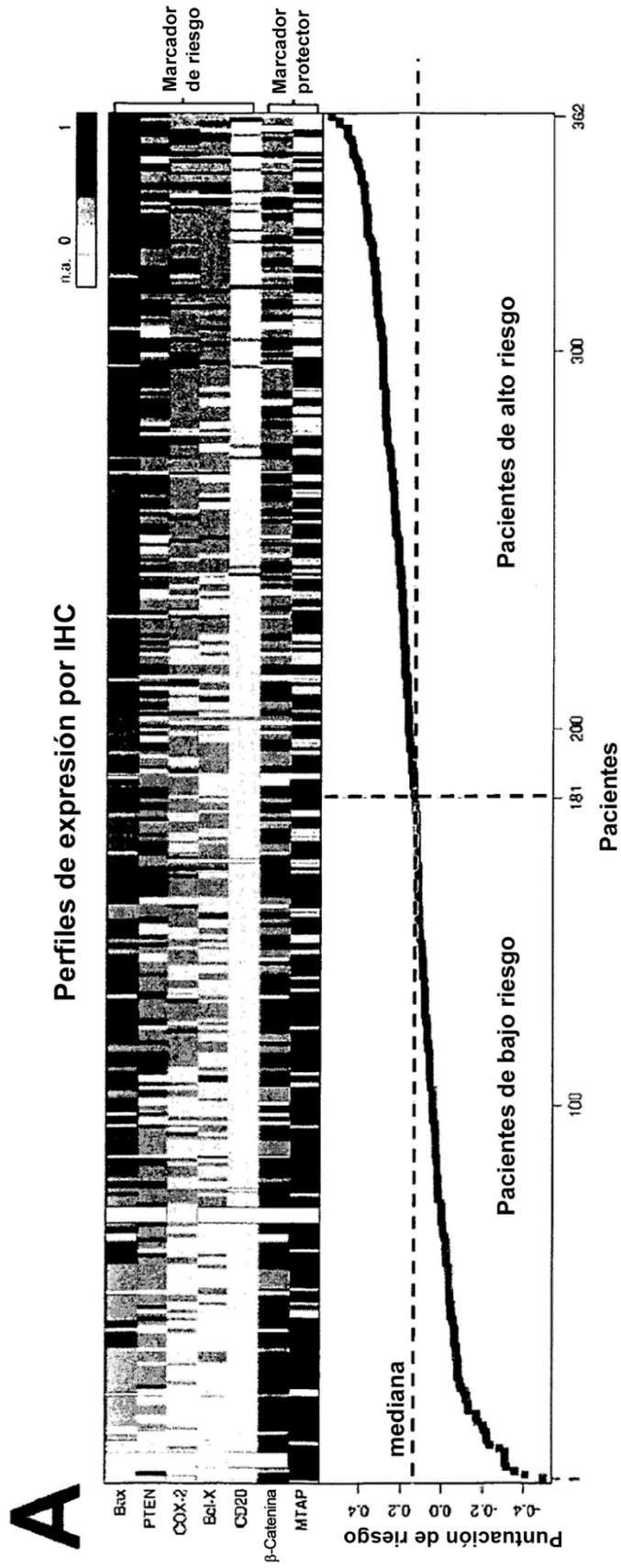


Figura 1

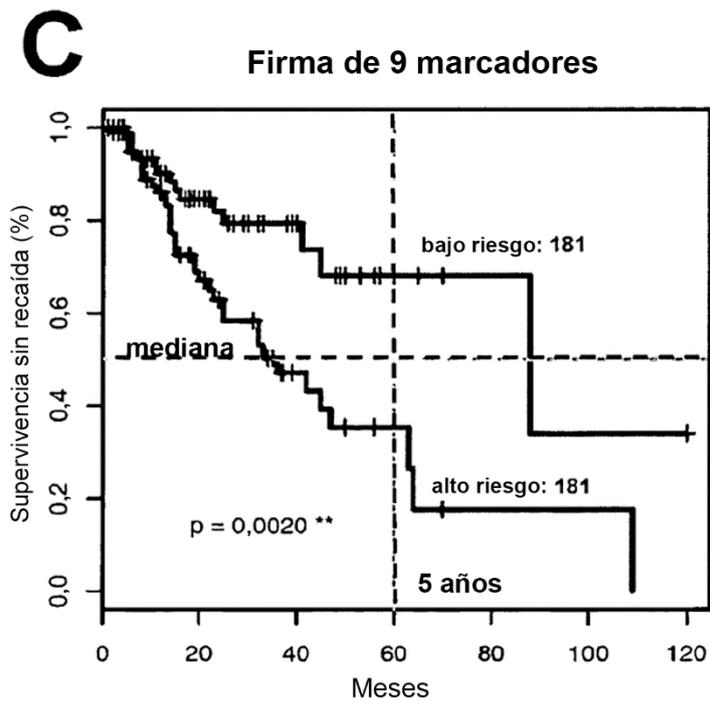
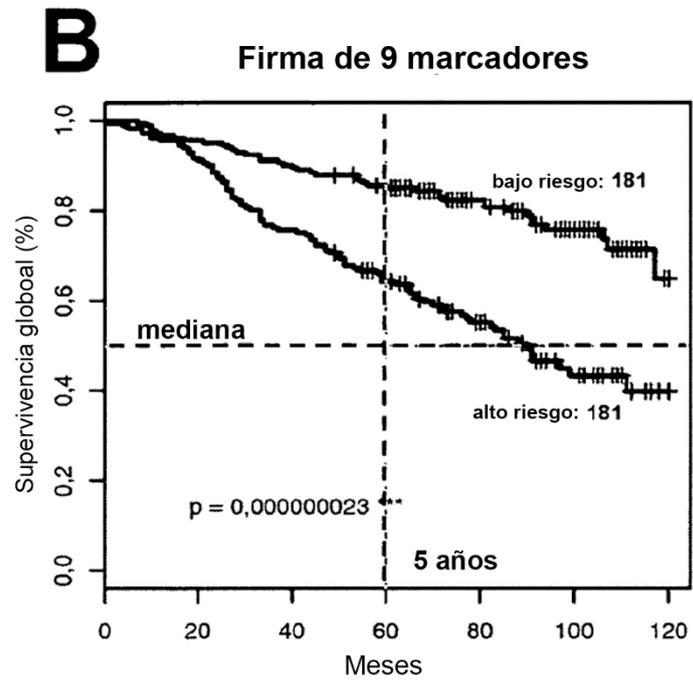
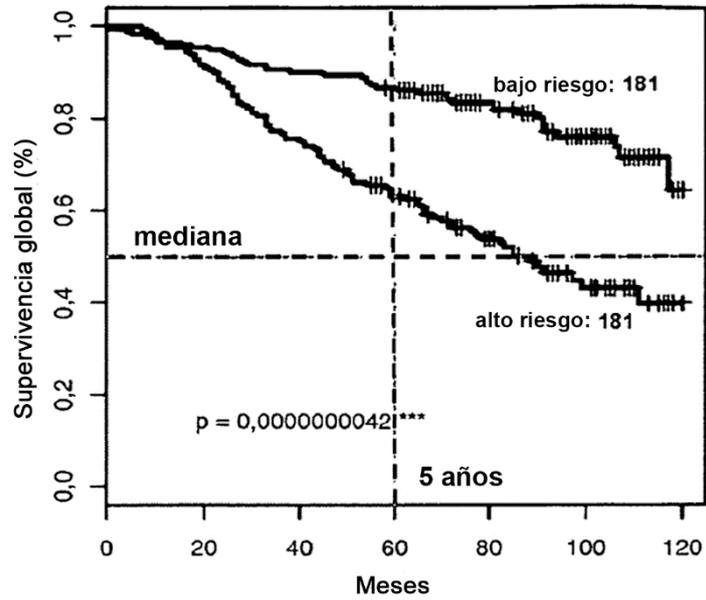


Figura 1 continuada

D

Firma de 7 marcadores



E

Firma de 7 marcadores

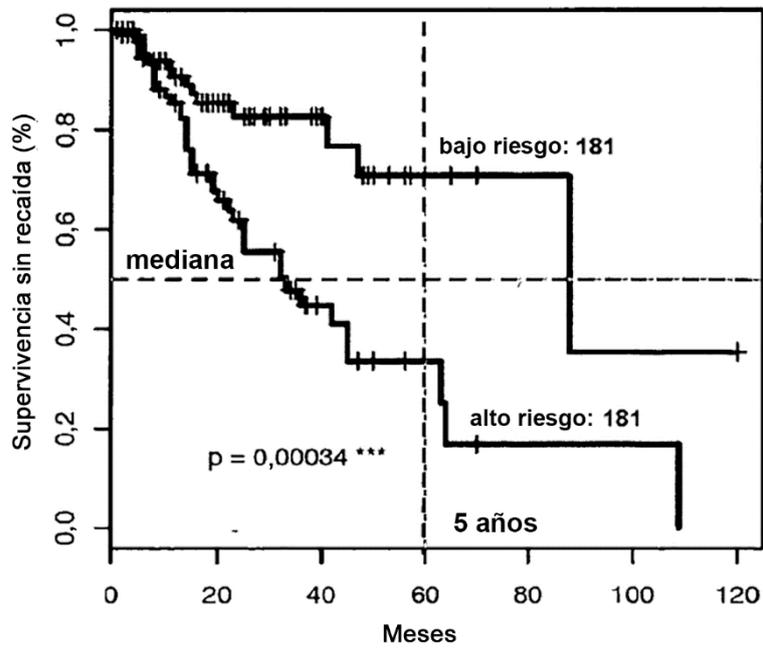


Figura 1 continuada

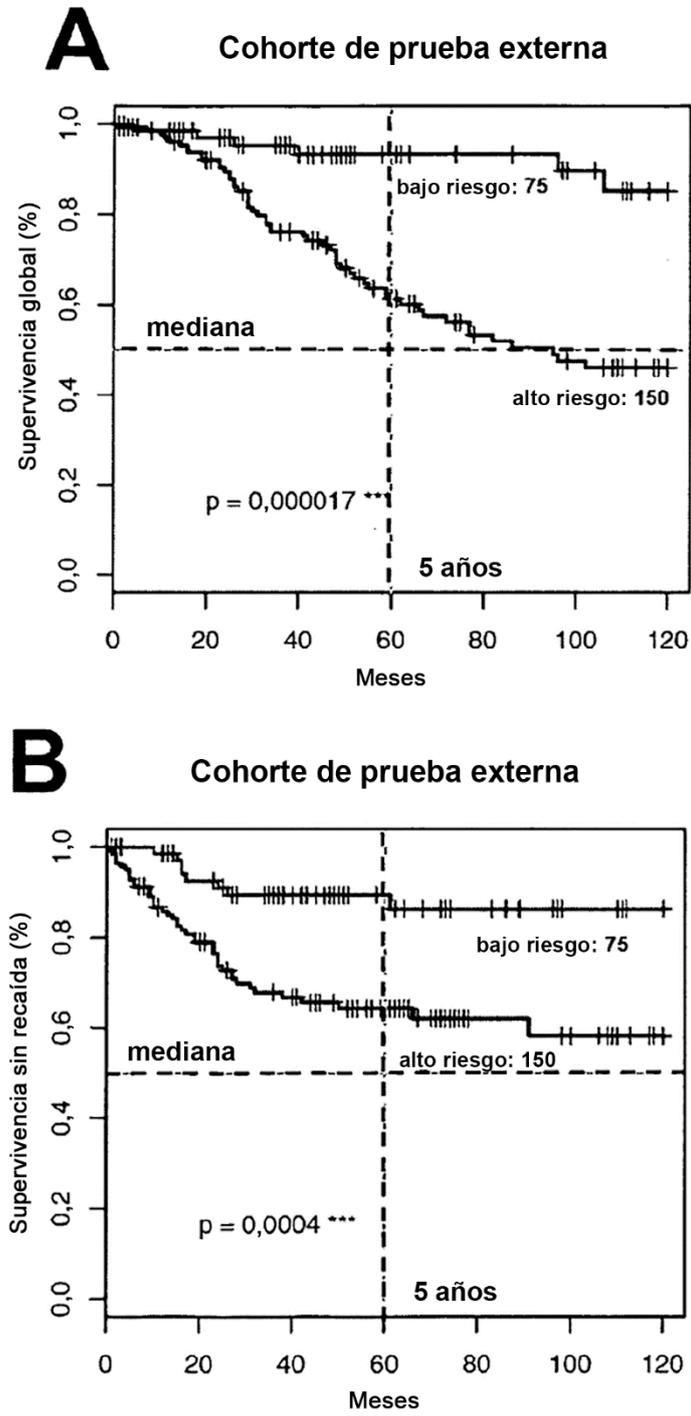
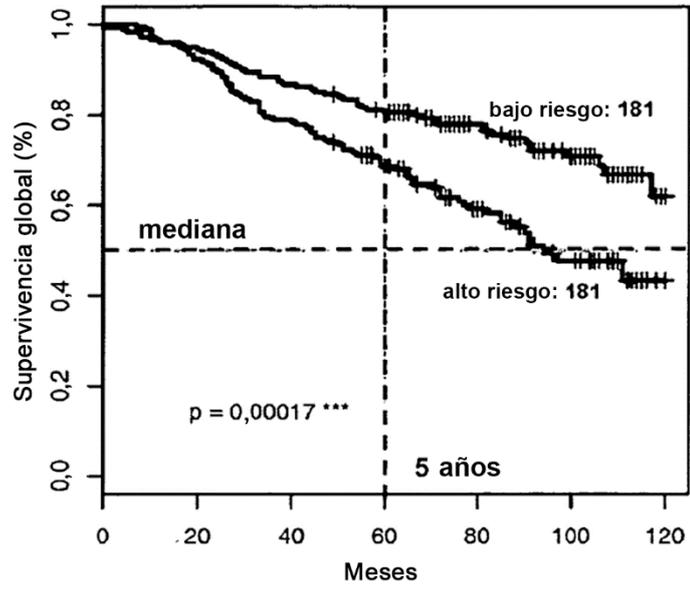


Figura 2

C

Validación cruzada de 10 veces



D

Validación cruzada de 10 veces

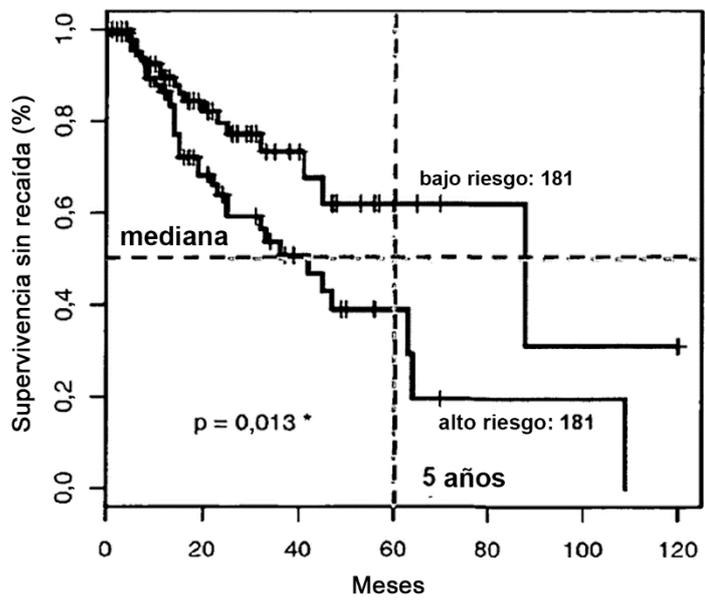


Figura 2 continuada

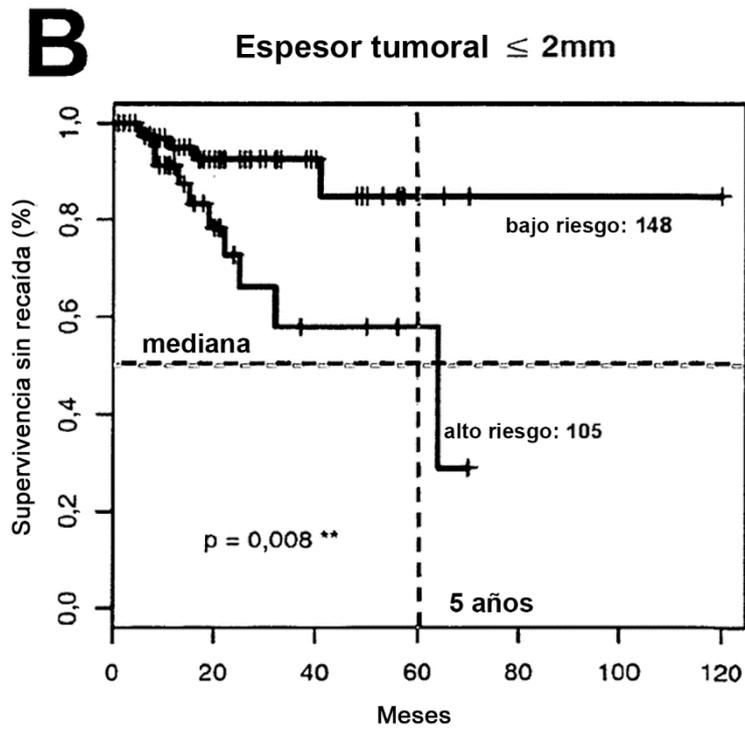
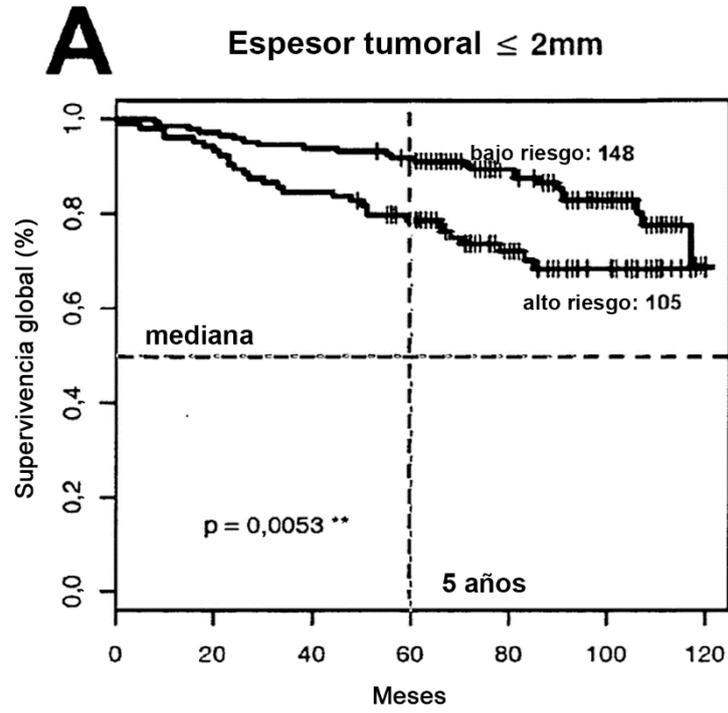
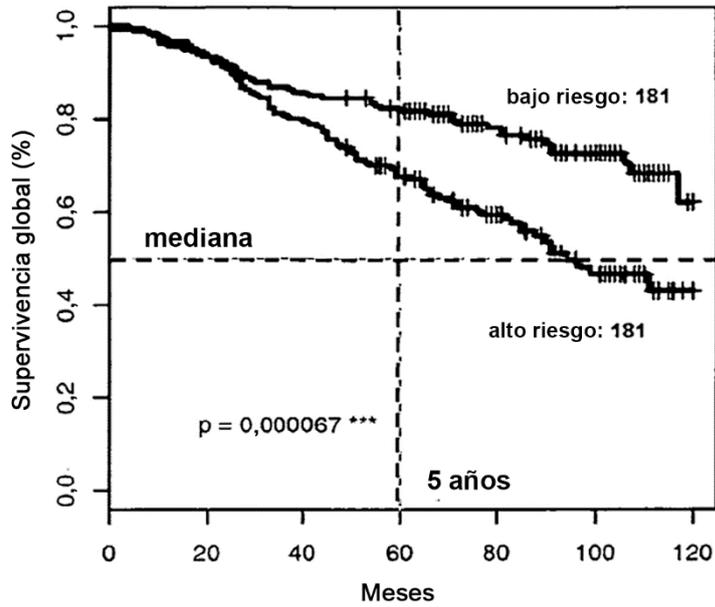


Figura 3

C Validación cruzada dejando uno fuera



D Validación cruzada dejando uno fuera

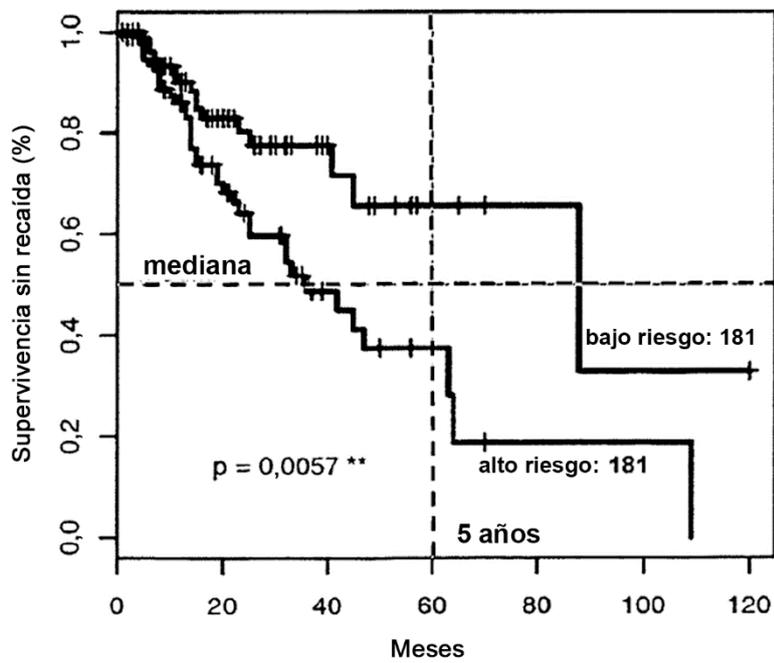
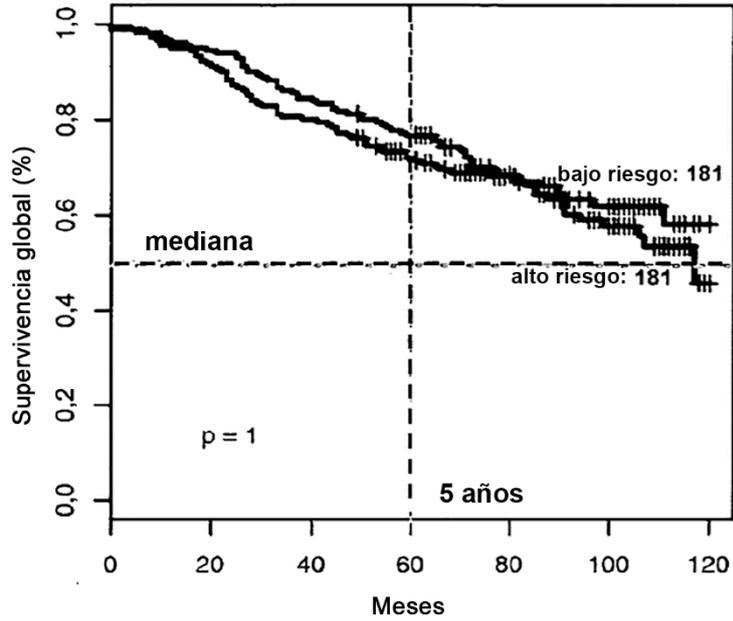


Figura 3 continuada

E

Prueba de permutación



F

Coefficientes de la firma de 7 marcadores

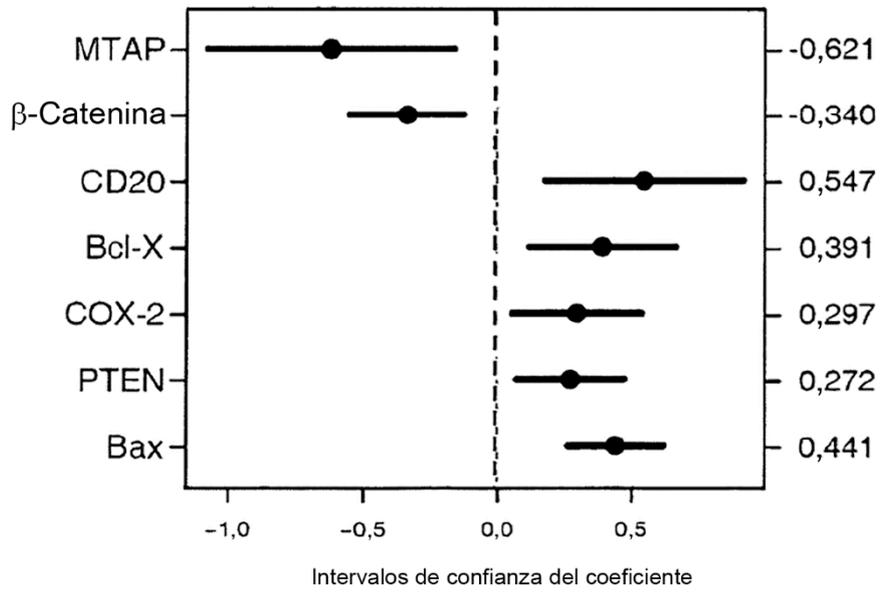


Figura 3 continuada

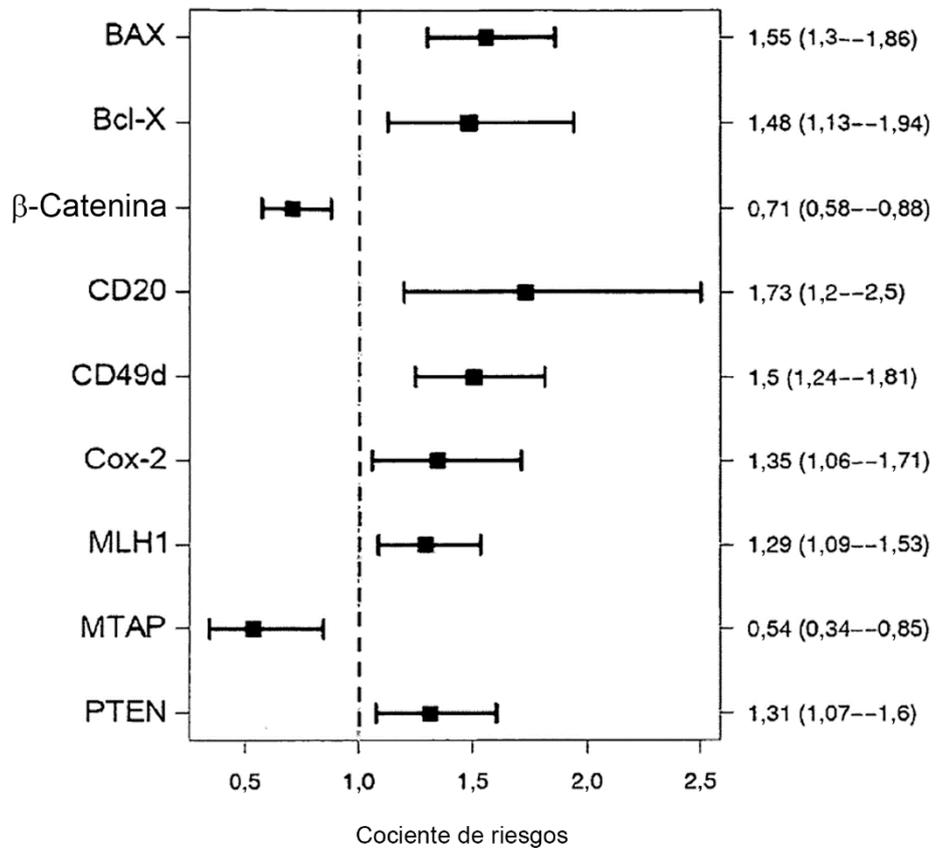


Figura 4

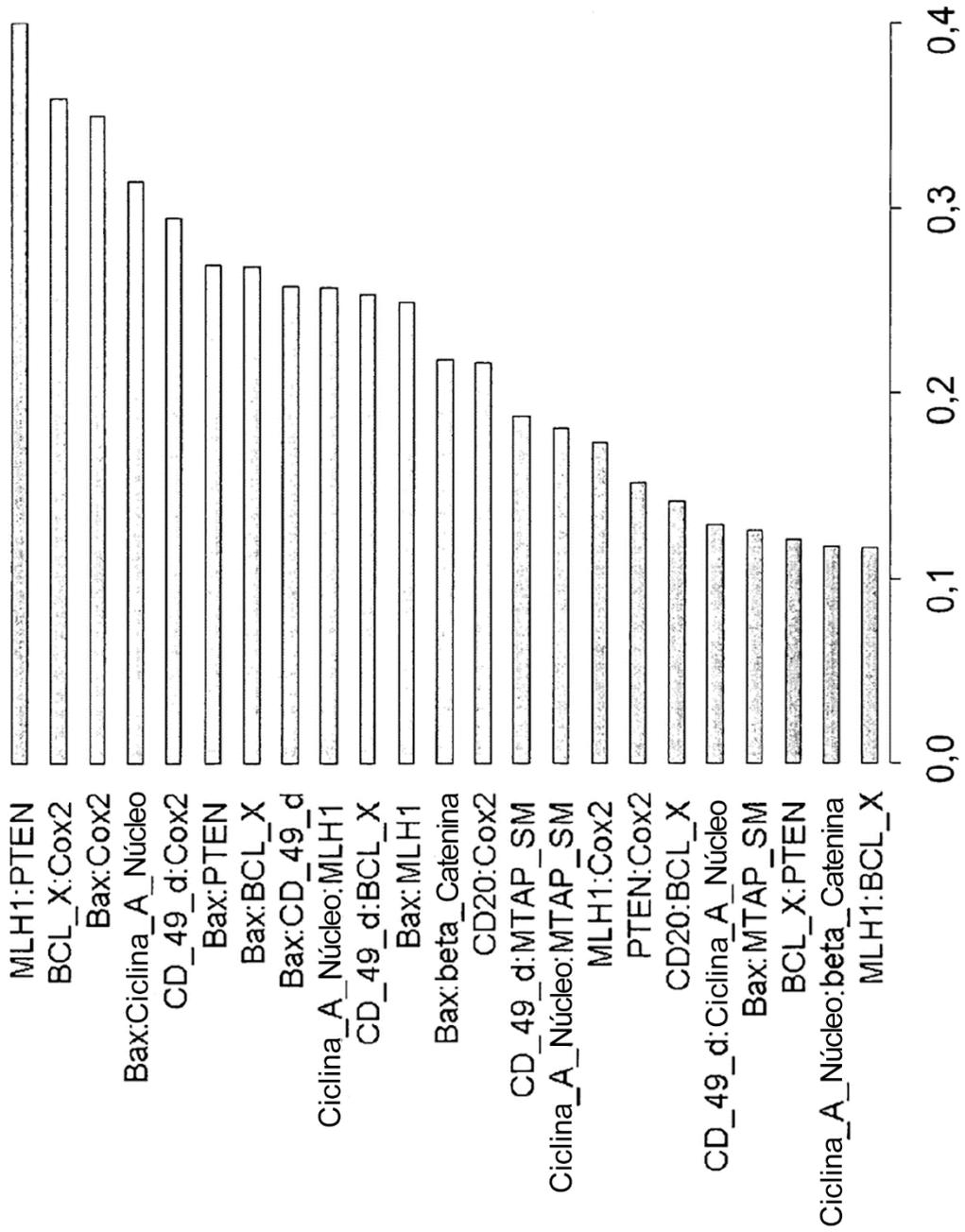


Figura 5

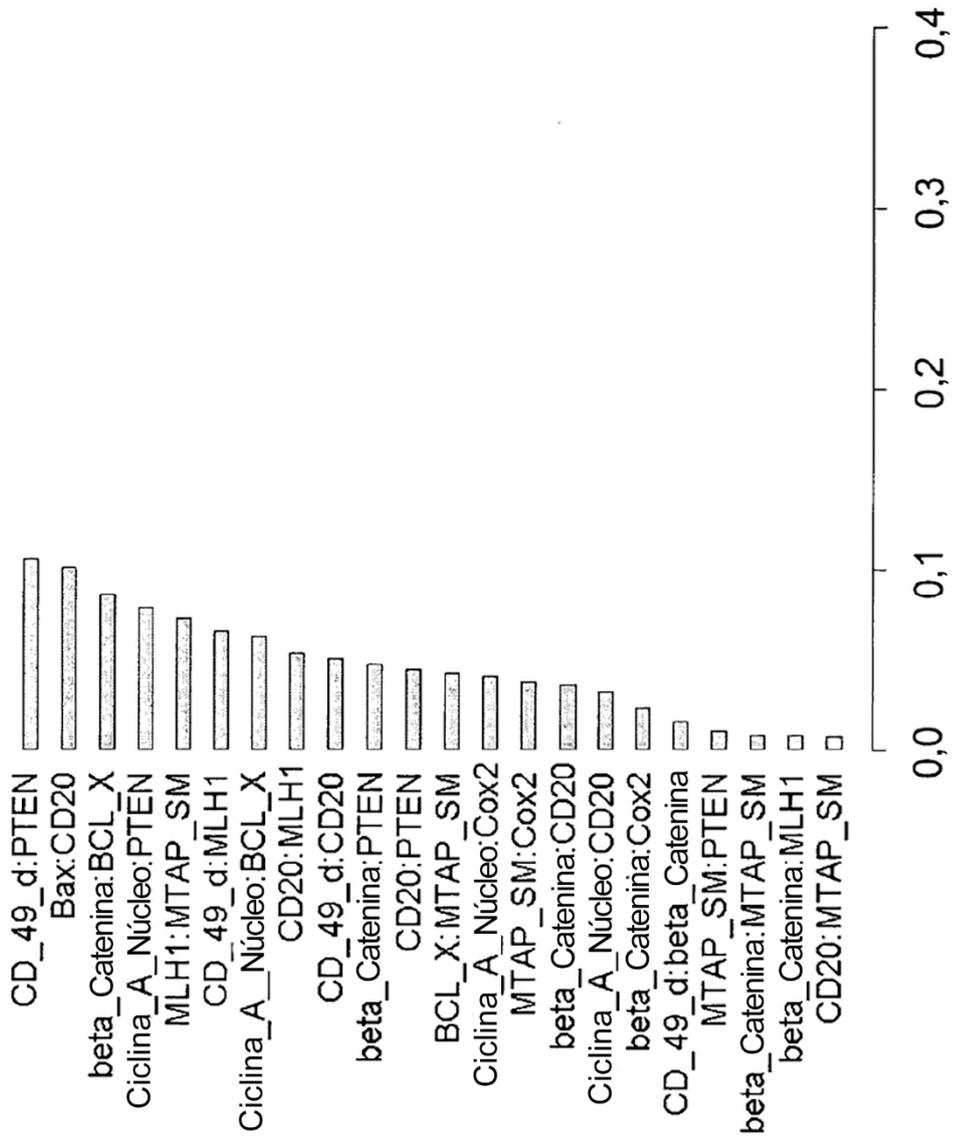


Figura 5 continuada

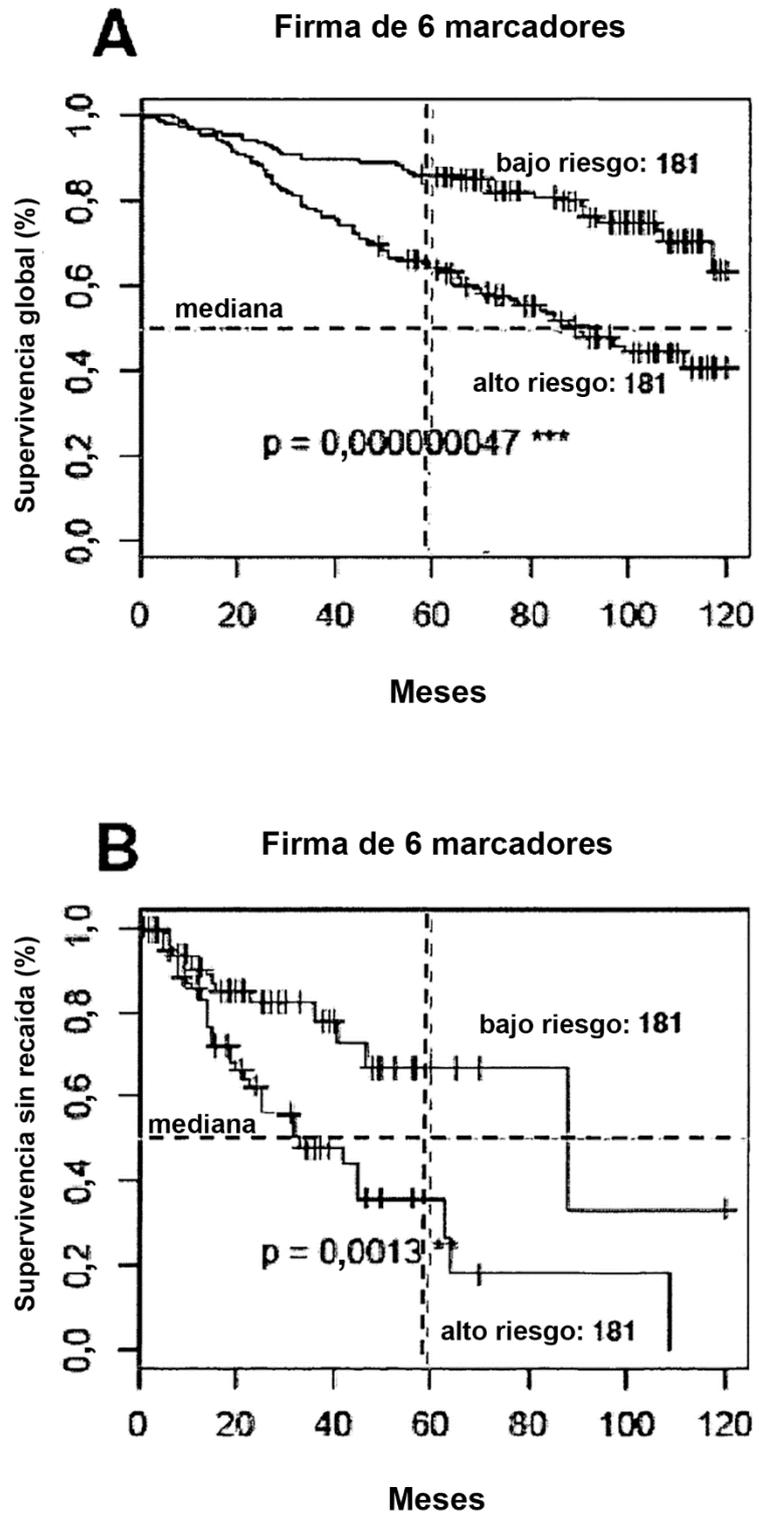


Figura 6

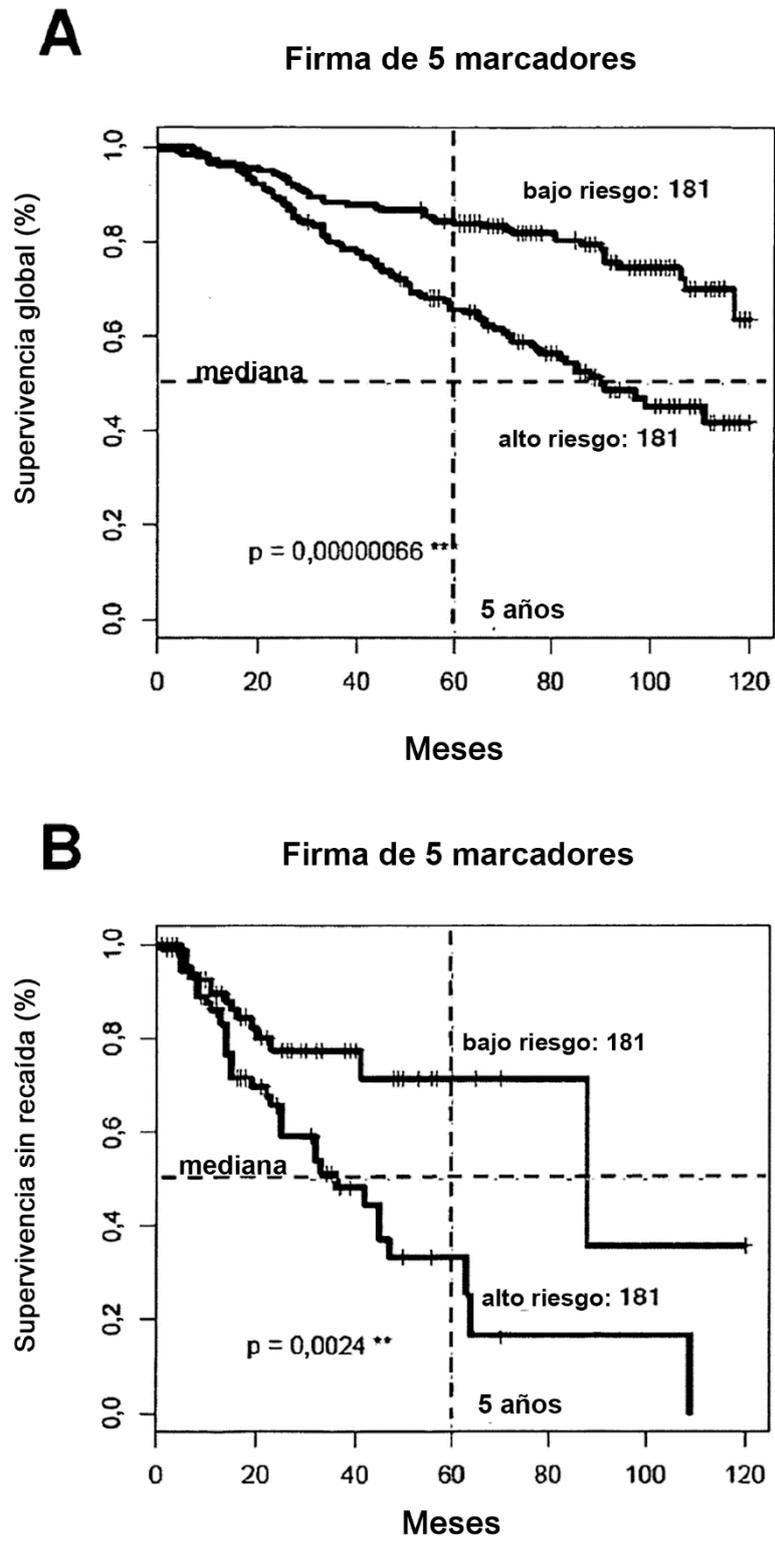


Figura 7

A: Proteína	B: Localización	C: Melanoma con firma de bajo riesgo (no. 140)	D: Melanoma con firma de alto riesgo (no. 137)
<p>Bax: proteína de la familia Bcl-2, Preapoptótica</p>	<p>Citoplásmica</p>		
<p>β-catenina. Efecto posterior clave en la ruta de señalización de Wnt. Implicada en dos procesos biológicos principales: desarrollo embrionario y tumorigénesis</p>	<p>Citoplásmica y nuclear</p>		
<p>CD20: Marcador pan-célula B, candidato a marcador de células madre</p>	<p>Membrana celular y citoplásmica</p>		

Muestras de TMA inmunohistoquímicamente teñidas que ilustran la firma de siete marcadores para un melanoma de paciente con alto riesgo y uno de paciente con bajo riesgo. El melanoma de bajo riesgo (columna C) mostró una fuerte tinción citoplásmica para β -catenina y MTAP, respectivamente. La inmunoreactividad de estos dos marcadores protectores no se encontró en melanoma de alto riesgo (columna D). En contraste, el melanoma de alto riesgo demostró tinción citoplásmica de moderada a fuerte para Bax, CD20, Bcl-X, PTEN y Cox-2.

Figura 8
 (Tabla 3)

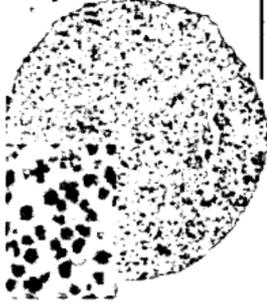
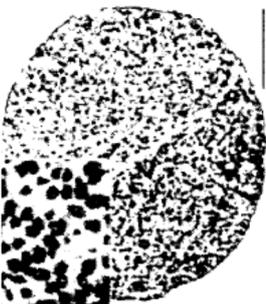
<p>Bcl-X: Proteína de la familia Bcl-2, antiapoptótica</p>			<p>Citoplásmica</p>
<p>MTAP: Enzima constitutiva del metabolismo de poliaminas; modulador de la señalización dependiente de interferón</p>			<p>Citoplásmica</p>
<p>PTEN: Supresor tumoral implicado en una variedad de cánceres humanos; principal regulador negativo de la ruta de señalización de PI3K/Akt</p>			<p>Citoplásmica y nuclear</p>
<p>Cox-2: Ciclooxigenasa para biosíntesis de prostaglandinas en condiciones inflamatorias; sobreeexpresada en una variedad de tumores</p>			<p>Citoplásmica</p>

Figura 8 continuada
(Tabla 3 continuada)