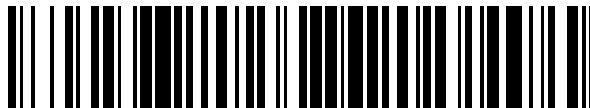


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 640 532**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2012 PCT/US2012/065282**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13074793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2012 E 12850526 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.08.2017 EP 2780714**

54 Título: **Métodos para la detección de papilomavirus humano y proporcionar un pronóstico para el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello**

30 Prioridad:

15.11.2011 US 201161559974 P
01.06.2012 US 201261654595 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF MIAMI (100.0%)
Office of Technology Transfer Suite 1200 1400
N.W. 10th Avenue
Miami, Florida 33136, US

72 Inventor/es:

FRANZMANN, ELIZABETH;
PEREIRA, LUTECIA;
REIS, ISILDINHA, M. y
DUNCAN, ROBERT, C.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 640 532 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para la detección de papilomavirus humano y proporcionar un pronóstico para el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello

5

CAMPO

La materia de estudio divulgada aquí se relaciona generalmente con métodos y kits para la evaluación del riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello.

10

ANTECEDENTES

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) afecta a 50.000 personas en los Estados Unidos y 600.000 personas en todo el mundo cada año. Los principales factores de riesgo son el consumo de tabaco y alcohol y la infección por el virus del papiloma humano (HPV).

15

Hasta la fecha, no hay un programa o prueba de detección de HNSCC ampliamente aceptado (véase, por ejemplo, Vokes et al., *N Engl J Med*, 328: 184-94 (1993), Lingen et al., *Curr Opin Oncol*, 13:176-82 (2001), Forastiere et al., *N Engl J Med* 345:1890-1900 (2001); Patton, *Orol Oncol*, 39: 708-723 (2003), O'Hara et al., *Clin Otolaryngol*, 27:133-4 (2002); Smart, *Cancer* 72:1061-5 (1993); Sankaranarayanan et al., *Cancer*, 88: 664-73 (2000), Sankaranarayanan et al., *Lancet* 365:1927-33 (2005)) porque el estándar de oro, la criba mediante examen físico seguida de una biopsia, tiene una sensibilidad y una especificidad limitadas (64 % y 74 %, respectivamente) (Brocklehurst et al., *Cochrane Database Syst Rev*. 11: CD004150 (2010)) y pruebas diagnósticas moleculares todavía se encuentran en desarrollo (Nagler, *Oral Oncol*, 45: 1006-10 (2009), Mahfouz et al., *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267:851-60 (2010)). Se dispone de técnicas auxiliares para la detección del cáncer oral que utilizan colorantes, autofluorescencia o citología exfoliativa, pero las revisiones recientes cuestionan si mejoran las tasas de detección temprana (Patton et al., *J Am Dent Assoc*, 139:896-905 (2008); Lingen et al., *Oral Oncol* 44:10-22 (2008)). Por lo tanto, los esfuerzos se han centrado en herramientas de diagnóstico molecular. Varios estudios que probaron saliva para perfiles de expresión de ARN (Li et al., *Clin Cancer Res*, 10:8442-8450 (2004)), descubrimiento de microARN (Park et al., *Clin Cancer Res*, 15:5473-5477 (2009)), y el análisis proteómico (Hu et al., *Clin Cancer Res*, 14:6246-6252 (2008)) son prometedores pero son algo complicados y no validados (Nagler, *Oral Oncol*, 45:1006-10 (2009), Mahfouz et al *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267:851-60 (2010)).

20

25

30

35

40

Esta complejidad puede verse por el número de diferentes métodos de criba molecular para HNSCC propuesta hasta la fecha en la literatura. Por ejemplo, Franzmann et al. (*Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(1): 735-739 (2005)) sugirió el uso de CD44 salival soluble (solCD44) como un biomarcador para HNSCC, y el mismo grupo sugirió en Franzmann et al., *Head Neck*, 34(5): 687-695 (2013) que los niveles de solCD44 podrían usarse en combinación con los niveles totales de proteínas salivales en la criba de HNSCC. Pereira et al. (*Cancer Biomark*, 10: 241-249 (2012)) ensayaron un análisis multivariante alternativo para la criba de HNSCC, que comprende medir los niveles de solCD44, proteínas salivales totales, ácido hialurónico e IL-8, mientras que Hafkamp et al., (*Int J Cancer*, 107(3): 394-400 (2003)) sugirieron una correlación entre HNSCC e infección por Papilomavirus Humano (HPV) y mostraron que los tumores de HNSCC asociados al HPV están asociados con niveles aumentados de expresión de p16^{INK4A} y niveles reducidos de expresión de pRb.

45

Como resultado, la mayoría de los pacientes son diagnosticados en una etapa tardía, cuando las tasas de curación son de 40 % o menos. Por lo tanto, se necesitan pruebas de detección temprana.

RESUMEN

50

Tal como se describe aquí, la materia divulgada, se relaciona con métodos para determinar el riesgo de HNSCC en un sujeto infectado con HPV y kits que pueden usarse para el mismo propósito.

Específicamente, la invención proporciona:

55

1) Un método para determinar un riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un sujeto infectado con papilomavirus humano (HPV), comprendiendo el método:

- a) proporcionar una muestra obtenida a partir de un fluido corporal del sujeto;
- b) ensayar un nivel de so1CD44 en la muestra;
- c) ensayar un nivel de proteína total en la muestra;

60

- d) combinar el nivel de so1CD44 medido en la muestra con el nivel de proteína total medido en la muestra y el estado de HPV del sujeto, proporcionando así una puntuación combinada;
- e) proporcionar una puntuación predictiva para tener el riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en el que la puntuación predictiva se obtiene mediante un análisis estadístico de solCD44 y la proteína total medida y estado de HPV de una población con un riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; y

65

determinar el riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en el sujeto cuando la puntuación combinada excede la puntuación predictiva; y

2) Un kit, que comprende:

al menos un anticuerpo que se enlaza específicamente a p16^{INK4a};
al menos un anticuerpo que se enlaza específicamente a CD44;
y un reactivo para determinar la concentración de proteína total en una muestra.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las figuras 1A a 1B son gráficos que muestran la supervivencia libre de progresión (PFS) (figura 1A) y la supervivencia general (OS) (figura 1B) de los pacientes en el estudio. La figura 1C es una tabla que muestra la PFS mediana y el índice de PFS y OS a los 12, 24 y 36 meses.

La figura 1D es una tabla que muestra OS y PFS total, medial, mínimo, máximo, media y desviación estándar.

Las figuras 2A a 2RR son gráficas que muestran PFS (figuras 2A, 2C, 2E, 2G, 2I, 2K, 2M, 2O, 2Q, 2S, 2U, 2W, 2Y, 2AA, 2CC, 2EE, 2GG, 2II, 2KK, 2MM, 2OO, 2QQ) y OS (figuras 2B, 2D, 2F, 2H, 2J, 2L, 2N, 2P, 2R, 2T, 2V, 2X, 2Z, 2BB, 2DD, 2FF, 2HH, 2JJ, 2LL, 2NN, 2PP, 2RR) en sujetos caracterizados como nuclear p16 vs. citoplasmáticos/sin tinción (Figuras 2A-2B), tinción p16⁺ vs. p16⁻ (Figuras 2C-2D), solCD44 \geq 10ng/ml vs. <10 ng/ml (Figuras 2E-2F), proteína total <1mg/ml vs. \geq 1mg/ml (Figuras 2G-2H), tinción CD44 vs. no tinción (Figuras 2I-2J), sólo membrana CD44/tinción universal vs. no tinción/otro (Figuras 2K-2L), membrana de EGFR y tinción citoplasmática vs. no tinción /otro (Figuras 2M-2N), membrana de EGFR y citoplasmática vs. otro vs. no tinción (Figuras 2O-2P), membrana de EGFR vs. citoplasmática/no tinción (Figuras 2Q-2R), membrana de EGFR vs. sólo citoplasmática vs. no tinción (Figuras 2S-2T), queratinizante vs. no queratinizante (Figuras 2U-2V) fumador actual vs. no/ex fumador (Figuras 2W-2X), no exposición a alcohol vs. exposición leve/moderada a alcohol vs. exposición severa a alcohol (Figuras 2Y-2Z), exposición severa vs. leve/no exposición a alcohol (Figuras 2AA-2BB), cáncer de labios y de cavidad oral vs. cáncer orofaríngeo (Figuras 2CC-2DD), cáncer en etapa I/II vs. cáncer en etapa III/IV (Figuras 2EE-2FF), cáncer en etapa I/II/III vs. cáncer en etapa IV (Figuras 2GG-2HH), cáncer T1-T3 vs. T4 (Figuras 2II-2JJ), N0 vs. N1-N3, Nx (Figuras 2KK-2LL), mujer vs. hombre (Figuras 2MM-2NN), blanco vs. negro (Figuras 2OO-2PP) o hispano vs. no hispano (Figuras 2QQ-2RR).

Las figuras 3A-3C son gráficos que muestran que la sobreexpresión de CD44 aumentó la proliferación (Figura 3A), migración (Figura 3B) y la resistencia al cisplatino (Figura 3C).

La figura 4A es una prueba de inmunoprecipitación Western de clones estables con CD44 subregulado. La figura 4B es una gráfica que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en ratones lampiños para dos de los clones CD44siARN en comparación con CAL 27 mezclada o de tipo salvaje.

La figura 5 contiene diapositivas histológicas que muestran tinción con CD44, EGFR y pEGFR (Y1068) en los xenoinjertos CAL 27 después del tratamiento con siARN de CD44 o una secuencia mezclada. Subregulación de CD44 inhibe la expresión de EGFR y su fosforilación (Y1068) en xenoinjertos CAL 27.

La figura 6 muestra la tinción con inmunohistoquímica (IHC) de p16, CD44 y EGFR en cáncer p16⁻, donde la tinción de p16 es citoplasmática y difusa. En este caso, la CD44 tiene tinción en la membrana y universalmente en todo el tumor. CD44 y EGFR se co-localizan en la membrana celular y también hay cierta tinción citoplasmática de EGFR.

La figura 7 muestra la tinción con IHC de p16, CD44 y EGFR en tumores p16⁺ en los que los núcleos se tiñen fuertemente para p16 y también hay cierta tinción citoplasmática. Sin embargo, la tinción de la membrana CD44 se pierde, sólo los linfocitos invasores retienen la expresión de CD44. La expresión de EGFR no se ve en absoluto.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los materiales, compuestos, composiciones y métodos descritos aquí pueden entenderse más fácilmente haciendo referencia a la siguiente descripción detallada de aspectos específicos de la materia de estudio divulgada, y los ejemplos no limitativos incluidos en la misma.

Definiciones

En esta especificación y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a una serie de términos, que se definirán para tener los siguientes significados:

A lo largo de la especificación y de las reivindicaciones, la palabra "comprende" y otras formas de la palabra, tales como "comprendiendo" y "comprende", significa incluyendo pero no se limita a, y no pretende excluir, por ejemplo, otros aditivos, componentes, enteros, o etapas.

Como se usa en la descripción y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- 5 "Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede o no puede ocurrir, y que la descripción incluye instancias donde ocurre el evento o circunstancia y casos donde no ocurre.

Los intervalos se pueden expresar aquí como desde "aproximadamente" un valor particular, y/o hasta "aproximadamente" otro valor particular. "Aproximadamente" puede significar dentro del 5 % del valor indicado. Cuando se expresa tal intervalo, otro aspecto incluye desde un valor particular y/o hasta el otro valor particular. De manera similar, cuando los valores se expresan como aproximaciones, mediante el uso del antecedente "aproximadamente", se entenderá que el valor particular forma otro aspecto. Se entenderá además que los puntos extremos de cada uno de los intervalos son significativos tanto en relación con el otro punto final, como independientemente del otro extremo. También se entiende que hay una serie de valores divulgados aquí y que cada valor se divulga también aquí como "aproximadamente" ese valor particular además del propio valor. Por ejemplo, si se divulga el valor "2.000", también se divulga "aproximadamente 2.000". También se entiende que cuando se divulga un valor, entonces también se divulgan "menor o igual que" el valor, "mayor o igual que el valor" e intervalos posibles entre valores, según se comprende apropiadamente por la persona experimentada en la técnica.

20 Por ejemplo, si se divulga el valor "2.000", también se divulga "menor o igual que 2.000", así como "mayor o igual que 2.000". También se entiende que a lo largo de la aplicación los datos se proporcionan en un número de formatos diferentes y que estos datos representan puntos finales y puntos de partida e intervalos para cualquier combinación de los puntos de datos. Por ejemplo, si se divulga un punto de datos particular "10" y un punto de datos particular "15", se entiende que mayor que, mayor o igual que, menor que, menor o igual e igual a 10 y 15 se consideran divulgados así como entre 10 y 15. También se entiende que cada unidad entre dos unidades particulares también se describen. Por ejemplo, si se divulgan 10 y 15, también se divulgan 11, 12, 13 y 14.

Las referencias en la especificación a partes en peso de un elemento o componente particular en una composición denotan la relación de peso entre el elemento o componente y cualquier otros elementos o componentes en la composición o artículo para el que se expresa una parte en peso. Por lo tanto, en un compuesto que comprende 2 partes en peso del componente X y 5 partes en peso del componente Y, X y Y están presentes en una proporción en peso de 2:5 y están presentes en dicha proporción independientemente de si los componentes adicionales están comprendidos en la composición.

35 Un porcentaje en peso (% en peso) de un componente, a menos que se indique específicamente lo contrario, se basa en el peso total de la formulación o composición en la que se incluye el componente.

El término "individuo", "huésped", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente para referirse a cualquier individuo que sea el blanco del diagnóstico, pronóstico, administración o tratamiento. El sujeto puede ser un vertebrado, por ejemplo, un mamífero. Por lo tanto, el sujeto puede ser un paciente humano o veterinario.

Un "biomarcador" es cualquier gen o proteína cuyo nivel de expresión en un tejido o célula está alterado en comparación con el de una célula o tejido normal o sano.

45 El término "pronóstico" se reconoce en la técnica y abarca predicciones sobre el curso probable de la enfermedad o progresión de la enfermedad, particularmente con respecto a la probabilidad de remisión de la enfermedad, recaída de la enfermedad, recurrencia del tumor, metástasis y muerte. "Buen pronóstico" se refiere a la probabilidad de que un paciente afligido con cáncer, como el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, permanezca libre de enfermedad (es decir, libre de cáncer). Se entiende por "mal pronóstico" la probabilidad de una recaída o recurrencia del cáncer o tumor subyacente, metástasis o muerte. Los pacientes con cáncer clasificados como que tienen un "buen resultado" permanecen libres del cáncer o tumor subyacente. En contraste, los pacientes con cáncer de "mal resultado" experimentan recidiva de la enfermedad, recurrencia tumoral, metástasis o muerte. En realizaciones particulares, el marco de tiempo para evaluar el pronóstico y el resultado es, por ejemplo, de menos de un año, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, quince, veinte o más años. Como se usa aquí, el tiempo relevante para evaluar el pronóstico o el tiempo de supervivencia sin enfermedad comienza con la extirpación quirúrgica del tumor o la supresión, mitigación o inhibición del crecimiento del tumor. Por lo tanto, por ejemplo, en realizaciones particulares, un "buen pronóstico" se refiere a la probabilidad de que un paciente con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello permanezca libre del cáncer o tumor subyacente durante un período de al menos cinco, más particularmente, un período de por lo menos diez años. En otros aspectos de la invención, un "mal pronóstico" se refiere a la probabilidad de que un paciente con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello experimente recidiva de la enfermedad, recurrencia de tumor, metástasis o muerte dentro de menos de cinco años, más particularmente de menos de diez años. Los marcos de tiempo para evaluar el pronóstico y el resultado proporcionados anteriormente son ilustrativos y no pretenden ser limitativos.

65 El término "tratamiento" se refiere al manejo médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, condición patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el

tratamiento dirigido específicamente hacia la mejora de una enfermedad, estado patológico o trastorno, e incluye también el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad asociada, estado patológico o trastorno. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que la curación de la enfermedad, condición patológica o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o totalmente el desarrollo de la enfermedad asociada, estado patológico o trastorno; y el tratamiento de soporte, es decir, el tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad asociada, estado patológico o trastorno.

El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos naturales o sintéticos que se enlazan selectivamente a un antígeno diana. El término incluye anticuerpos policlonales y monoclonales. Además de las moléculas de inmunoglobulina intactas, también se incluyen en el término "anticuerpos" fragmentos o polímeros de esas moléculas de inmunoglobulina, y versiones humanas o humanizadas de moléculas de inmunoglobulina que se enlazan selectivamente al antígeno diana.

También, se divulgan aquí materiales, compuestos, composiciones y componentes que se pueden usar para, se pueden usar junto con, se pueden usar en la preparación para, o son productos de los métodos y composiciones divulgados. Estos y otros materiales se describen aquí y se entiende que cuando se describen combinaciones, subconjuntos, interacciones, grupos, etc. de estos materiales, mientras que la referencia específica de cada una de varias combinaciones individuales y colectivas y permutación de estos compuestos no se pueden divulgar explícitamente, cada uno se contempla y describe específicamente aquí. Por ejemplo, si se divulga una composición y se discuten una serie de modificaciones que se pueden hacer a una serie de componentes de la composición, se contemplan específicamente cada combinación y permutación, a menos que se indique específicamente lo contrario. Este concepto se aplica a todos los aspectos de esta divulgación, incluyendo, pero sin limitarse a, composiciones y etapas en métodos de fabricación y uso de las composiciones divulgadas. Por lo tanto, si hay una variedad de etapas adicionales que se pueden llevar a cabo, se entiende que cada una de estas etapas adicionales puede realizarse con cualquier aspecto específico o combinación de aspectos de los métodos divulgados, y que cada combinación se contempla específicamente y debe considerarse como divulgado.

A continuación se hará referencia en detalle a aspectos específicos de los métodos y kits divulgados, ejemplos de los cuales se ilustran en la siguiente descripción y ejemplos, y en las figuras y su descripción anterior y siguiente.

Ensayos de biomarcadores

Se describen ensayos eficaces, económicos y no invasivos para determinar el riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un sujeto infectado con HPV. Los ensayos divulgados implican la detección de biomarcadores incluyendo CD44 soluble (solCD44) y niveles de proteína total en una muestra obtenida a partir de un fluido corporal del sujeto. Los niveles elevados de estos biomarcadores son capaces de distinguir a los pacientes con cáncer de los controles con alta precisión y especificidad. Sin embargo, estos biomarcadores se reducen en ciertas poblaciones de sujetos a pesar de la presencia de HNSCC.

Por ejemplo, se ha demostrado que solCD44 y los niveles de proteína total combinados son más eficaces para distinguir el HNSCC de los controles que cualquiera de los dos marcadores por si solos. Sin embargo, los niveles de solCD44 pueden ser más bajos en sujetos con infección por papilomavirus humano (HPV). De hecho, el análisis bivariado utilizando solCD44 y niveles de proteína total funciona mejor en hombres de raza negra, donde la infección por HPV es menos común. Por lo tanto, la inclusión del estado de HPV en un análisis multivariado puede mejorar la sensibilidad y la precisión del ensayo y permitir la detección de HPV⁺ HNSCC.

Otros biomarcadores asociados con la detección o pronóstico de HNSCC pueden usarse en combinación con la detección de proteínas totales, solCD44 y HPV para mejorar la sensibilidad y/o la precisión del método divulgado. Por ejemplo, los niveles de solCD44 pueden variar según la edad y el estado de fumador. Ejemplos de factores de riesgo de HNSCC y factores demográficos que pueden ser utilizados en el análisis multivariado incluyen exposición al tabaco, exposición al alcohol, raza, etnia, salud dental, género, nivel de educación, edad, salud general, antecedentes familiares de cáncer, historia sexual y estado socioeconómico y usando uno o más factores de riesgo o factores demográficos en el análisis multivariado para determinar la puntuación combinada.

Por lo tanto, se divulgan ensayos y métodos de utilización de los ensayos para diagnóstico y pronóstico, que implican análisis multivariante de los biomarcadores y factores de riesgo divulgados para determinar una puntuación combinada para un sujeto individual. La puntuación combinada puede usarse entonces para determinar la presencia de HNSCC, o el riesgo de reaparición de HNSCC en un sujeto. En particular, los valores límite de puntuación combinados se pueden determinar empíricamente comparando valores de control positivos y negativos.

Los biomarcadores descritos aquí incluyen genes y proteínas. Dichos biomarcadores incluyen ADN que comprende la secuencia completa o parcial de la secuencia de ácido nucleico que codifica el biomarcador, o el complemento de dicha secuencia. Los ácidos nucleicos de biomarcador también incluyen ARN que comprende la secuencia completa o parcial de cualquiera de las secuencias de ácido nucleico de interés. Una proteína biomarcadora es una proteína

codificada por o correspondiente a un biomarcador de ADN de la invención. Una proteína biomarcadora comprende la secuencia de aminoácidos total o parcial de cualquiera de las proteínas o polipéptidos biomarcadores. Los fragmentos y variantes de genes y proteínas de biomarcadores están también abarcados por la presente invención. Por "fragmento" se entiende una porción del polinucleótido o una porción de la secuencia de aminoácidos y, por lo tanto, la proteína codificada por ella. Los polinucleótidos que son fragmentos de una secuencia de nucleótidos de biomarcador comprenden generalmente al menos 10, 15, 20, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300 o 1.400 nucleótidos contiguos, o hasta el número de nucleótidos presentes en un polinucleótido biomarcador de longitud completa divulgado aquí. Un fragmento de un polinucleótido biomarcador codificará generalmente al menos 15, 25, 30, 50, 100, 150, 200, o 250 aminoácidos contiguos, o hasta el número total de aminoácidos presentes en una proteína biomarcadora de longitud completa de la invención. Se pretende que "variante" signifique secuencias sustancialmente similares. Generalmente, las variantes de un biomarcador particular de la invención tendrán al menos aproximadamente 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más identidad de secuencia con ese biomarcador, según se determina mediante programas de alineación de secuencias.

Los biomarcadores descritos aquí son genes y proteínas cuya sobreexpresión se correlaciona con el pronóstico de cáncer, en particular el HNSCC. La sobreexpresión selectiva de un biomarcador o combinación de biomarcadores de interés en una muestra de paciente es indicativa de un mal pronóstico de cáncer. Por "indicativo de un mal pronóstico" se pretende que la sobreexpresión del biomarcador particular o combinación de biomarcadores esté asociada con una mayor probabilidad de recaída o recurrencia del cáncer o tumor subyacente, metástasis o muerte, como se define aquí anteriormente. Por ejemplo, "indicativo de un mal pronóstico" puede referirse a una mayor probabilidad de recaída o recurrencia del cáncer o tumor subyacente, metástasis o muerte dentro de los cinco años, más particularmente diez años. Los biomarcadores que son indicativos de un mal pronóstico pueden denominarse aquí como "biomarcadores de pronóstico pobre". Alternativamente, la ausencia de sobreexpresión de un biomarcador o combinación de biomarcadores de interés es indicativa de un buen pronóstico. Como se usa aquí, "indicativo de un buen pronóstico" se refiere a una mayor probabilidad de que el paciente permanezca libre de cáncer, como se ha definido anteriormente. Tal como se usa en el presente documento, "indicativo de un buen pronóstico" se refiere a una mayor probabilidad de que el paciente permanezca libre de cáncer durante al menos cinco, más particularmente al menos diez años. Dichos biomarcadores pueden denominarse "biomarcadores de buenos resultados".

Los biomarcadores divulgados incluyen genes y/o proteínas cuya sobreexpresión (en comparación con un control) se correlaciona con el pronóstico de HNSCC. Un gen o una proteína puede sobreexpresarse en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 200 %, 300 %, 400 %, 500 %, o mayor en comparación con un control. Los biomarcadores incluyen genes y proteínas que son indicativos de un mal pronóstico de HNSCC (es decir, biomarcadores de resultado pobre) así como aquellos que son indicativos de un buen pronóstico (es decir, biomarcadores de buen resultado). Los biomarcadores de interés particular incluyen genes y proteínas que están implicados en la regulación del crecimiento y proliferación celular, control del ciclo celular, replicación y transcripción del ADN, apoptosis, transducción de señales, angiogénesis/linfogénesis o metástasis. Algunos de los biomarcadores regulan los sistemas de proteasa implicados en la remodelación de tejidos, la degradación de la matriz extracelular y la invasión de tejidos adyacentes. Otros biomarcadores incluyen reguladores de la expresión génica tales como hipermetilación o microARN. Con el fin de practicar los métodos y ensayos divulgados para determinar el riesgo de HNSCC en un sujeto infectado con HPV, los biomarcadores utilizados incluyen el estado de HPV, niveles de proteína total y niveles de solCD44.

La infección por HPV se puede determinar midiendo el HPV directa o indirectamente. Actualmente se dispone de tres categorías de ensayos moleculares para la detección de la infección por HPV en muestras de tejidos y de células exfoliadas. Todos están con base en la detección de ADN de HPV e incluyen: (1) ensayos de hibridación no amplificados (hibridación de transferencia Southern, (STH), hibridación de inmunoprecipitación en punto (DB) e hibridación in situ (ISH)); (2) ensayos de hibridación amplificada de señal tales como ensayos híbridos de captura; y (3) ensayos diana de amplificación, tales como PCR y PCR in situ. La hibridación de inmunoprecipitación Southern requiere grandes cantidades de ADN, es laboriosa y no es reproducible, mientras que la hibridación in situ sólo tiene una sensibilidad moderada para el HPV. La detección con base en PCR del HPV es extremadamente sensible y específica. Utilizando esta metodología, el ADN viral se amplifica in vitro mediante ADN polimerasa para generar una cantidad adecuada de diana, que luego se visualiza directamente sobre geles o (el enfoque más específico) es detectado mediante sonda específica usando métodos de hibridación tradicionales. En la práctica, la sensibilidad del método con base en PCR es de aproximadamente 10-100 genomas virales de HPV en un fondo de 100 ng de ADN celular. Dado que el PCR puede realizarse en cantidades muy pequeñas de ADN (10-100 ng), es ideal para ser usada en especímenes con bajo contenido de ADN.

Actualmente, el único método de detección de HPV aprobado por la FDA es el ensayo Hybrid capture II (Qiagen, Valencia, CA). En este ensayo, los ADNs de HPV se hibridan a sondas de ARN, y los híbridos de ARN-ADN son capturados y detectados por un sistema quimioluminiscente. La sensibilidad de este ensayo es similar a la de los ensayos con base en PCR, obteniéndose alta sensibilidad mediante señal, en lugar de la amplificación del objetivo. El ensayo HC II actual tiene la sensibilidad para detectar 1pg de HPV (aproximadamente 50.000 copias) por ml de muestra. La recolección apropiada de la muestra es esencial para lograr una máxima sensibilidad, y se ha

demostrado que el dispositivo de muestreo por pincel es óptimo. El ensayo de HC II contiene sondas de ARN sintéticas complementarias a la secuencia genómica de 13 tipos de alto riesgo (tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 5 tipos (6, 11, 42, 43, 44) de HPV de bajo riesgo.

5 Alternativamente, se puede determinar el estado de infección por HPV detectando las transcripciones de mRNA viral o mediante la detección de la proteína celular p 16. Para que el HPV cause cáncer, es necesaria una infección persistente y un entorno celular que permita una expresión de alto nivel de los oncogenes E6 y E7 virales (inicialmente en la capa de células basales y luego a lo largo del epitelio). Por lo tanto, la detección de mRNA E6/E7 puede identificar una infección clínicamente más significativa que una metodología de ADN.

10 El inhibidor 2A de la quinasa dependiente de ciclina (CDKN2A, p16^{Ink4A}, p16) es un correlato celular de la expresión aumentada del ARNm oncogénico E6/E7. Las principales acciones de los oncogenes del HPV son la degradación de p53 por E6 y por lo tanto la abrogación de la apoptosis, así como la liberación de E2F de pRb que conduce a la activación continua del ciclo celular. Fisiológicamente, la activación de E2F está mediada por la fosforilación de la proteína Rb. Esta vía está estrictamente regulada por un conjunto de inhibidores de la quinasa dependientes de ciclina, entre ellos p16, que bloquean las enzimas que fosforilan pRb (quinasas dependientes de ciclina). En las células con infecciones de HPV transformantes, la regulación de la vía Rb-E2F es perturbada por E7 y la activación de p16 no tiene efecto corriente abajo. Como resultado, el p16 está fuertemente sobreexpresado y se acumula en las células. La sobreexpresión de p16 se ha demostrado en la gran mayoría de precánceres y cánceres cervicales, mientras que en el tejido normal, la expresión de p16 se encuentra sólo raramente.

También se pueden utilizar efectos epigenéticos de la infección por HPV para detectar el HPV. Los loci diferenciadamente metilados entre las líneas celulares HPV⁺ y HPV⁻ HNSCC se describen en Sartor MA, et al. Epigenetics 6(6): 777-87 (2011).

25 Por lo tanto, la infección por HPV puede detectarse usando anticuerpos que se enlazan específicamente a p16^{Ink4a}. Alternativamente, la infección por HPV se puede determinar detectando ADN, ARN o proteína de HPV. Del mismo modo, la infección por HPV puede determinarse detectando oncogenes virales (por ejemplo, E6/E7) o cambios epigenéticos.

30 MÉTODOS

Se describen métodos para diagnosticar HNSCC en un sujeto, estadificación de un tumor HNSCC en un sujeto, supervisión de la eficacia de un tratamiento para HNSCC, o determinación del pronóstico de un sujeto diagnosticado con HNSCC o predicción de recurrencia de HNSCC en un sujeto. Estos métodos comprenden cada uno el ensayo de una muestra corporal del sujeto para la presencia de proteína total, solCD44 y HPV. La combinación de los niveles de proteína total, HPV y CD44 se puede utilizar en un análisis multivariante para determinar una puntuación combinada. El método puede comprender además el ensayo de la muestra corporal para la presencia de ácido hialurónico (HA), hialuronidasa (HAasa), IL-8, o una combinación de las mismas. Los factores de riesgo de HNSCC y/o factores demográficos también pueden usarse en combinación con la detección de proteínas totales, solCD44 y HPV para mejorar la sensibilidad y/o la precisión del método divulgado.

45 El análisis multivariado se basa en el principio estadístico de las estadísticas multivariantes, que implica la observación y el análisis de más de una variable de resultado estadístico a la vez. Por ejemplo, existen varios métodos de regresión que pueden usarse con análisis multivariante, incluyendo, pero no limitados a regresiones lineales y no lineales generalizadas, regresiones logísticas y de Poisson, algoritmos supervisados de aprendizaje de máquina, redes neuronales, máquinas vectoriales de apoyo, modelado de superficies de respuesta y ejes de regresión adaptativa multivariante. En algunas realizaciones, se usa la regresión logística.

50 Por ejemplo, el análisis multivariante puede implicar en primer lugar la determinación de cómo los niveles de proteína total, solCD44 y p16 cambian en función de variables de riesgo como la raza, el género, consumo de tabaco y el consumo de alcohol. Entonces se pueden desarrollar modelos matemáticos cuyos términos incluyen los niveles de biomarcadores y las variables de riesgo para predecir la probabilidad de cáncer. La importancia estadística asociada con los términos refleja su importancia para la predicción. Un modelo matemático puede ser utilizado entonces para estimar una puntuación predictiva, lo que permite desarrollar una puntuación de probabilidad general de cáncer. Por ejemplo, después de investigar cómo se asocian los niveles de marcadores y las variables de riesgo (por ejemplo, raza, género, consumo de tabaco y alcohol) con el resultado, incluidas las interacciones, se puede obtener un modelo ajustado relacionando las probabilidades logarítmicas de biomarcadores y covariables. Con base en este modelo, una puntuación o una probabilidad predictiva de cáncer puede ser estimada a valores especificados de todas las variables incluidas en el modelo.

65 Un aumento de la puntuación combinada (predictiva) por encima de un punto límite distingue los sujetos con HNSCC de aquellos sin HNSCC o con bajo riesgo de su aparición futura. Un aumento de la puntuación combinada por encima de un punto límite puede identificar HNSCC en fase tumoral, predecir la eficacia de un tratamiento para HNSCC, predecir el pronóstico de un sujeto diagnosticado con HNSCC, o predecir el riesgo de recurrencia de

HNSCC. Por ejemplo, un aumento en la puntuación por encima de un punto límite puede estar asociado con un mal pronóstico o probabilidad de recurrencia.

5 Los ensayos y métodos divulgados pueden usarse para guiar el tratamiento terapéutico de un sujeto con HNSCC o con riesgo de desarrollar HNSCC. Por ejemplo, un sujeto con una puntuación combinada baja puede recibir un tratamiento de modalidad única tal como solamente cirugía o radiación en lugar de terapia combinada. Esto reduciría la morbilidad relacionada con el tratamiento. En contraste, a un sujeto con una alta puntuación combinada se le pueden ofrecer tratamientos más agresivos, como la cirugía, la radiación y la quimioterapia, ya que una mayor morbilidad relacionada con el tratamiento se justificaría dado el mayor riesgo de muerte por la enfermedad. Por lo tanto, un sujeto diagnosticado con HNSCC o determinado que tiene un pronóstico de HNSCC pobre puede tratarse con cirugía, radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinámica, terapia dirigida, o cualquier combinación de los mismos.

15 Cada uno de los biomarcadores descritos se puede detectar en un sujeto usando muestras obtenidas de un fluido corporal del sujeto. Los fluidos corporales útiles en la presente invención incluyen sangre, linfa, orina, fluidos ginecológicos, saliva, aspirados de los pezones, lavados o cualquier otra secreción corporal o derivado de los mismos. La sangre puede incluir sangre entera, plasma, suero o cualquier derivado de sangre. En realizaciones preferidas, la muestra comprende enjuagues orales. Los métodos para recolectar diversas muestras corporales son bien conocidos en la técnica.

20 Los métodos son útiles para detectar individuos con riesgo de cáncer de cabeza y cuello, incluyendo, por ejemplo, fumadores, abusadores de alcohol y sujetos expuestos al virus del HPV. Los métodos descritos aquí también pueden permitir la evaluación mejorada del pronóstico de HNSCC en comparación con el análisis de otros indicadores pronósticos conocidos. La sensibilidad y especificidad puede ser igual o mayor que la de los métodos conocidos de evaluación pronóstica del cáncer. El punto final para evaluar la especificidad y la sensibilidad es la comparación del resultado predicho usando los métodos de la invención con el resultado clínico real (es decir, si el paciente permaneció sin cáncer o sufrió una recurrencia dentro de un período de tiempo especificado). Como se usa aquí, "especificidad" se refiere al nivel al cual un método de la invención puede identificar con precisión negativos verdaderos. En un estudio clínico, la especificidad se calcula dividiendo el número de negativos verdaderos por la suma de negativos verdaderos y falsos positivos. Por "sensibilidad" se entiende el nivel al cual un método de la invención puede identificar con precisión muestras que son verdaderos positivos. La sensibilidad se calcula en un estudio clínico dividiendo el número de verdaderos positivos por la suma de verdaderos positivos y falsos negativos. En algunas realizaciones, la sensibilidad de los métodos divulgados para la evaluación de HNSCC es al menos aproximadamente 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más. Además, la especificidad de los presentes métodos es de manera preferible al menos aproximadamente 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más. En realizaciones adicionales, se evalúa el valor combinado de sensibilidad y especificidad para los métodos de pronóstico de la invención. Por "valor combinado de sensibilidad y especificidad" se entiende la suma de los valores de especificidad y sensibilidad individuales, como se ha definido anteriormente. El valor combinado de sensibilidad y especificidad de los presentes métodos es preferiblemente al menos aproximadamente 105 %, 110 %, 115 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 % o más.

45 Como se usa aquí, las definiciones de positivos y negativos "verdaderos" y "falsos" dependerán de si la combinación de biomarcadores considerados es un biomarcador de buen resultado o un de mal resultado. Es decir, en el caso de biomarcadores de buen resultado (es decir, aquellos indicativos de un buen pronóstico), "verdadero positivo" se refiere a aquellas muestras que muestran sobreexpresión del biomarcador de interés, según se determina mediante un examen físico seguido de biopsia. Una biopsia positiva en patología puede indicar si una muestra es positiva o negativa.

50 Se incluye aquí cualquier método disponible en la técnica para detectar la expresión de biomarcadores. La expresión de un biomarcador de la invención se puede detectar a un nivel de ácido nucleico o un nivel de proteína. Por "detección de expresión" se pretende determinar la cantidad o presencia de un gen o proteína biomarcador. Por lo tanto, la "detección de expresión" abarca los casos en los que se determina que un biomarcador no se expresa, no se expresa de forma detectable, se expresa en un nivel bajo, se expresa a un nivel normal o se sobreexpresa. Con el fin de determinar la sobreexpresión, la muestra obtenida a partir del fluido corporal del sujeto a examinar puede compararse con una muestra correspondiente. Por ejemplo, una muestra correspondiente de fluido corporal que se origina de una persona sana. Es decir, el nivel de expresión "normal" es el nivel de expresión del biomarcador en, por ejemplo, una muestra de un sujeto humano o paciente no afligido con HNSCC. La muestra corporal también se puede comparar con una muestra de cuerpo correspondiente de un sujeto tratado para HNSCC. Dicha muestra puede estar presente en forma estandarizada. En algunas realizaciones, la determinación de la sobreexpresión de biomarcadores no requiere comparación entre la muestra corporal y una muestra de cuerpo correspondiente que se origina de una persona sana. Por ejemplo, la detección de la sobreexpresión de un biomarcador indicativo de un mal pronóstico en una muestra de tumor puede excluir la necesidad de comparación con una muestra correspondiente que se origina de una persona sana. Además, en algunos aspectos de la invención, ninguna expresión, subexpresión o expresión normal (es decir, la ausencia de sobreexpresión) de un biomarcador o combinación de biomarcadores de interés proporciona información útil con respecto al pronóstico de un paciente.

Los métodos para detectar la expresión de los biomarcadores de la invención comprenden cualquier método que determine la cantidad o la presencia de los biomarcadores ya sea a nivel de ácido nucleico o de proteína. Tales métodos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitarse a, "tiras de análisis" de flujo lateral, inmunoprecipitación Western, inmunoprecipitación Northern, inmunoprecipitación Southern, ELISA, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica, técnicas de hibridación de ácido nucleico, métodos de transcripción inversa ácidos nucleicos y métodos de amplificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, PCR. En realizaciones particulares, la expresión de un biomarcador se detecta en un nivel de proteína utilizando, por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra proteínas biomarcadoras específicas. Estos anticuerpos pueden usarse en diversos métodos tales como inmunoprecipitación Western, ELISA, inmunoprecipitación, o técnicas de inmunohistoquímica. Igualmente, la inmunotinción de tejido puede combinarse con la evaluación de información clínica, métodos de pronóstico convencionales y expresión de marcadores moleculares (por ejemplo, p16^{INK4a} y solCD44) conocidos en la técnica. De esta manera, los procedimientos divulgados pueden permitir la determinación más precisa del pronóstico de HNSCC.

15 Kits

También se proporcionan aquí kits que pueden usarse para diagnosticar un sujeto con HNSCC o para determinar el pronóstico de un sujeto con HNSCC. El kit incluye al menos un anticuerpo que se enlaza específicamente a p16^{INK4a}, al menos un anticuerpo que se enlaza específicamente a CD44, y un reactivo para determinar la concentración total de proteína en una muestra. Por ejemplo, el kit puede incluir una pluralidad de anticuerpos que se enlazan específicamente a p16^{INK4a}. En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende el idiotipo del clon del anticuerpo E6H4. El kit puede incluir además un agente de detección (por ejemplo, anticuerpos secundarios y/o agente colorimétrico) para detectar los anticuerpos contenidos. El kit puede incluir además una pluralidad de anticuerpos que se enlazan específicamente a CD44 (por ejemplo, solCD44). El kit incluye además un reactivo para determinar la concentración de proteína total en una muestra. El kit también puede incluir una muestra de referencia de p16^{INK4a} y/o solCD44. El kit puede incluir adicionalmente instrucciones para el uso del kit (por ejemplo, instrucciones para diagnosticar un sujeto), un contenedor y/o un portador. En particular, el kit puede contener un medio legible por ordenador o un hipervínculo que utiliza algoritmos y tablas de referencia para convertir los valores de detección en una puntuación combinada. En algunas realizaciones, el kit es un inmunoensayo de flujo lateral. Alternativamente, el kit puede comprender una placa de múltiples pozos, opcionalmente recubierta con el anticuerpo que se enlaza específicamente a p16^{INK4a}, el anticuerpo que se enlaza específicamente a CD44, o una combinación de los mismos.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente ciertos aspectos de los métodos y composiciones descritos aquí, y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

35

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se exponen a continuación para ilustrar los métodos y resultados de acuerdo con la materia de estudio divulgada. Estos ejemplos no pretenden incluir todos los aspectos de la materia de estudio divulgada aquí, sino más bien ilustrar métodos y resultados representativos. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero algunos errores y desviaciones deben tenerse en cuenta. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está en °C o está a temperatura ambiente y la presión está en o cerca de la presión atmosférica. Existen numerosas variaciones y combinaciones de condiciones de reacción, por ejemplo, concentraciones de componentes, temperaturas, presiones y otros intervalos de reacción y condiciones que se pueden usar para optimizar la pureza del producto y el rendimiento obtenido a partir del proceso descrito. Sólo se requerirá una experimentación razonable y rutinaria para optimizar tales condiciones del proceso.

45

Ejemplo 1:

50

La relación entre la prueba descrita aquí y el HNSCC relacionado con HPV se estudió observando cómo los marcadores descritos aquí mejoran en pacientes cuyos tumores son positivos para p16^{INK4a}. Catorce sujetos con cáncer orofaríngeo fueron evaluados. Para cada sujeto, se obtuvieron resultados de la inmunohistoquímica p16^{INK4a} de su tejido tumoral y solCD44 y se obtuvieron los resultados de la proteína de sus enjuagues orales. Los niveles medios de solCD44 y el nivel de proteína fueron más bajos en los casos de HPV⁺ (CD44: 3,17 vs. 4,2, p=0,55, proteína: 0,83 vs.1,07, p=0,49), aunque las diferencias no alcanzaron significación estadística. Las pruebas de solCD44 y proteína que se midieron utilizando los sobrenadantes de enjuagues orales se combinaron con los niveles de p16^{INK4a} detectados usando las pellas de los mismos enjuagues orales.

55

Se realizó un ensayo in vitro para la determinación cuantitativa de la proteína p16^{INK4a} humana en muestras lisadas de las pellas del enjuague oral. Se colocaron pellas de muestra en 200 µl de regulador de lisis celular (SIGMA) que contenía inhibidor de proteasa (Thermo Scientific) para la estabilización de p16^{INK4a} solubilizado. A continuación, las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos, lo que facilita la lisis completa de las células para una mejor detección de p16^{INK4a}. La proteína p16^{INK4a} se cuantificó usando una técnica de emparedado ELISA colorimétrica usando tiras de microtitulación recubiertas con el anticuerpo específico p16^{INK4a} monoclonal E6H4™ (Roche mtm laboratories AG) y un segundo anticuerpo específico p16^{INK4a} monoclonal marcado con HRP.

65

La cuantificación se realizó generando una curva estándar con base en los niveles conocidos de p16^{INK4a} (estándar 1-6). Los niveles en las muestras de prueba se determinaron mediante interpolación con base en la curva estándar. Se utilizó un lector de placa de microtitulación para medir la absorbancia en cada pozo a una longitud de onda de 450 nm (longitud de onda de referencia: 620 nm). Se utilizó un programa de cálculo con base en el método de 4 parámetros para obtener las concentraciones finales de la muestra de p16^{INK4a}. Los resultados se indican en U/ml y las muestras de estudio se midieron en duplicados, cada una con un volumen de 100 µl. Se verificó un valor límite de 15 U/mL como el umbral adecuado para clasificar una muestra clínica individual como positiva para el resultado de ELISA de p16^{INK4a} de CervatecTM (Roche mtm laboratories AG) mediante un estudio clínico multicéntrico (Protocolo No. 9502-06-REG-DE-001).

Usando este método combinado, se probó p16^{INK4a} en combinación con CD44 y proteína en 14 pacientes con HNSCC incluyendo pacientes con carcinoma de células escamosas de cavidad oral u orofaríngeas (CA) o carcinomas primarios desconocidos (UK1 CA). También se probaron tres voluntarios sanos (HV) (ver Tabla 1). Dos pacientes con niveles bajos de CD44 (límite establecido en 2,7 ng/ml) y proteína (límite establecido en 1,0 mg/ml) tenían niveles de p16^{INK4a} por encima del límite de 15 U/ml. El CD44 y proteína también identificaron tumores que no fueron detectados por las otras pruebas. Por lo tanto, la adición de p16^{INK4a} al panel mejora la sensibilidad. Los 3 voluntarios sanos que formaron parte de la prueba todos tenían niveles para cada marcador por debajo de los límites.

Tabla 1

N	Conc. U/ml* p16 ^{INK4a}	Conc. g/ml CD44 (x5)	Conc. mg/ml Proteína	Muestra	Grupo**	Género	Edad	Raza	Etnia
1	0	1,6	0,63	17	UK1CA	Femenino	47	Blanco	Hispano
2	3,099	4,19	0,398	79	CA	Femenino	65	Blanco	No-Hispano
3	16,981	2,536	0,583	167	CA	Femenino	50	Blanco	Hispano
4	12,554	4,29	0,716	262	UK1CA	Masculino	56	Blanco	No-Hispano
5	3,529	8,88	0,892	86	CA	Masculino	67	Blanco	Hispano
6	7,758	3,355	0,781	24	UK1CA	Masculino	66	Negro	No-Hispano
7	0	1,645	1,054	221	UK1CA	Masculino	50	Blanco	Hispano
8	5,687	4	1,262	239	UK1CA	Masculino	58	Blanco	Hispano
9	0	10,325	1,309	273	CA	Masculino	46	Blanco	No-Hispano
10	6,896	1,13	0,604	345	CA	Masculino	59	Blanco	No-Hispano
11	5,123	0,93	0,472	367	CA	Masculino	58	Blanco	No-Hispano
12	16,752	1,18	0,469	370	CA	Masculino	62	Blanco	Hispano
13	8,812	4,555	0,792	374	CA	Masculino	60	Blanco	Hispano
14	9,421	2,56	1,037	377	CA	Femenino	63	Blanco	No-Hispano
NL1	0	1,645	0,797	UM001	HV	Femenino	41	Blanco	No-Hispano
NL2	0	1,295	0,329	UM009	HV	Femenino	49	Blanco	Hispano
NL3	0,141	0,545	0,378	UM030	HV	Femenino	57	Asiático	No-Hispano

*1 U/ml=2,8 pg/ml de proteína p16^{INK4a}.

**CA: Cáncer, UK 1 CA: cáncer primario desconocido, HV: voluntario sano

Ejemplo 2:

Utilizando inmunohistoquímica en tejidos de cáncer oral, se evaluó un panel de marcadores (CD44 y EGFR), que se asocian con mal pronóstico. Se determinó la relación entre la expresión de CD44, EGFR y p16 (el marcador sustituto de HPV) en el tejido con solCD44 y los niveles de proteínas en enjuague oral.

Tabla 2. Demográficas del paciente y otras características

Variable	N	%
Edad (años)		
Media (desviación estándar)	60,4	(9,8)
Mediana (mínimo - máximo)	61	(40- 83)
Género		
Femenino	6	16,2
Masculino	31	83,8
Etnia		
Hispano	22	59,5
No-Hispano	15	40,5
Raza		
Blanco	29	78,4
Negro	8	21,6
Fumador		
Nunca	5	13,5
Anteriormente	8	21,6
Actualmente	24	64,9
Alcohol, pasado		
Nunca	8	22,2
Leve(<3 bebidas/día)	10	27,8
Severo(>= 3 bebidas/día)	18	50,0
Sin respuesta	1	
Alcohol, actual		
Ninguna	12	37,5
Leve	8	25,0
Severo	12	37,5
Sin respuesta	5	
Atención sanitaria		
Si	20	54,1
No	17	45,9
Educación		
Grados 1-8 (Elemental)	6	16,2
Grados 9-11 (Parte de bachillerato)	5	13,5
Grado 12 o GED (graduado de bachillerato)	12	32,4
Universidad 1-3 años		
(parte de universidad/escuela técnica)	6	16,2
Universidad 4+años (graduado de universidad)	8	21,6
Empleo		
Empleado asalariado	7	19,4
Autónomo	6	16,7
Retirado	8	22,2
Incapaz de trabajar	6	16,7
Desempleado por menos de 1 año	3	8,3
Desempleado por más de 1 año	6	16,7
Sin respuesta	1	

ES 2 640 532 T3

Salario

Menos que \$10.000	16	57,1
\$10.000 a < \$15.000	1	3,6
\$20.000 a < \$25.000	2	7,1
\$25.000 a < \$35.000	2	7,1
\$35.000 a < \$50.000	2	7,1
\$50.000 a < \$75.000	2	7,1
\$75.000 o mas	3	10,7
Sin respuesta	9	

Tabla 3. Características de la enfermedad, tratamiento, y resultado

Variable	N	%	Variable	N	%
Enfermedad					
Cáncer de labios y cavidad oral	13	35,1			
Cáncer Orofaringeo	24	64,9			
Etapa			Patología		
I	3	8,11	Biopsia	25	67,6
II	1	2,7	Resección quirúrgica (márgenes todos negativos)	12	32,4
III	8	21,6			
IV	9	24,3			
IVA	12	32,4	Linfovascular		
IVB	4	10,8	Si	2	16,7
			No	10	83,3
Etapa-T			Sin respuesta	25	
T1	5	13,5			
T2	5	13,5			
T3	11	29,7	Perineural		
T4	4	10,8	Si	3	25,0
T4a	10	27,0	No	9	75,0
T4b	2	5,4	Sin respuesta	25	
Etapa-N					
Nx	1	2,7	Diferenciación (Velos)		
N0	14	37,8	Buena	6	18,8
N1	3	8,1	Moderada	17	53,1
N2a	1	2,7	Moderada-Pobre	2	6,3
N2b	6	16,2	Pobre	7	21,9
N2c	9	24,3	Sin respuesta	5	
N3	3	8,1			
Etapa-M			Invasión (Velos)		
M0	33	89,2	Si (., 5, 10, 15, 22 mm)	5	17,2
Mx	4	10,8	No	24	82,8
			Sin respuesta	8	
Tratamiento			Resultado		
Quimio/RT	16	43,2	Progresión/Recurrencia	21	56,8
Cirugía/Quimio/RT	9	24,3	Libre de eventos	16	43,2
Cirugía	5	13,5			
Cirugía/RT	2	5,4	Estado		
Cirugía/Quimio	1	2,7			

ES 2 640 532 T3

Quimio	1	2,7	Fallecido	16	43,2
Ninguno/sin respuesta	2	5,4	Con vida	21	56,8

Tabla 4. CD44, Log2 CD44, y proteína en enjuagues orales variables by IHC, estado PD y estado vital

	CD44					log2CD44					Proteína				
	N	Media	SD	SE	P	N	Media	SD	SE	P	N	Media	SD	SE	P
Todos	36	7,91	10,85	1,81		36	2,35	1,20	0,20		36	1,03	0,58	0,10	
p16															
Positivo	16	9,15	14,32	3,58	0,578	16	2,47	1,26	0,31	0,603	16	1,10	0,64	0,16	0,557
Negativo	20	6,92	7,25	1,62		20	2,26	1,18	0,26		20	0,98	0,53	0,12	
P 16 nueva definición															
Nuclear/ Nuclear+cit	14	6,06	4,34	1,16	0,335	14	2,29	0,97	0,26	0,811	14	1,12	0,61	0,16	0,474
Cit solamente/sin tinción	22	9,09	13,45	2,87		22	2,39	1,35	0,29		22	0,98	0,57	0,12	
CD44															
Membrana	22	9,26	13,42	2,86		22	2,45	1,31	0,28		22	1,05	0,64	0,14	
Citoplasmático	2	10,69	6,52	4,61		2	3,27	0,94	0,67		2	1,30	0,70	0,49	
M y C	2	3,53	3,06	2,17		2	1,48	1,46	1,03		2	0,62	0,34	0,24	
Sin tinción	10	5,27	3,66	1,16		10	2,13	0,91	0,29		10	1,04	0,48	0,15	
Tinción CD44	26	8,93	12,49	2,45	0,186	26	2,44	1,30	0,26	0,506	26	1,03	0,62	0,12	0,986
Sin tinción	10	5,27	3,66	1,16		10	2,13	0,91	0,29		10	1,04	0,48	0,15	
Membrana universal	solamente,21	9,58	13,67	2,98		21	2,50	1,32	0,29		21	1,05	0,65	0,14	
Otro	5	6,20	5,47	2,45		5	2,17	1,33	0,59		5	0,94	0,52	0,23	
Sin tinción	10	5,27	3,66	1,16		10	2,13	0,91	0,29		10	1,04	0,48	0,15	
Membrana universal	solamente,21	9,58	13,67	2,98	0,219	21	2,50	1,32	0,29	0,392	21	1,05	0,65	0,14	0,804
Otro/Sin tinción	15	5,58	4,17	1,06		15	2,15	1,02	0,26		15	1,00	0,48	0,12	
EGFR															
Membrana	3	3,55	1,83	1,06		3	1,68	0,83	0,48		3	1,31	0,85	0,49	
Citoplasmático	8	12,32	20,05	7,09		8	2,59	1,62	0,57		8	1,25	0,71	0,25	
M y C	21	7,68	7,07	1,54		21	2,49	1,10	0,24		21	0,98	0,51	0,11	
Sin tinción	4	3,57	1,84	0,92		4	1,66	0,88	0,44		4	0,67	0,31	0,15	
Tinción EGFR	32	8,46	11,39	2,01	0,035	32	2,44	1,22	0,22	0,223	32	1,08	0,59	0,10	0,186
Sin tinción	4	3,57	1,84	0,92		4	1,66	0,88	0,44		4	0,67	0,31	0,15	

	CD44					log2CD44					Proteína				
	N	Media	SD	SE	P	N	Media	SD	SE	P	N	Media	SD	SE	P
Mem & Cit, universal	19	6,90	6,10	1,40		19	2,39	1,03	0,24		19	0,94	0,51	0,12	
Otro	13	10,73	16,44	4,56		13	2,51	1,49	0,41		13	1,28	0,66	0,18	
Sin tinción	4	3,57	1,84	0,92		4	1,66	0,88	0,44		4	0,67	0,31	0,15	
Memb & Cit, universal	19	6,90	6,10	1,40	0,579		2,39	1,03	0,24	0,850	19	0,94	0,51	0,12	0,314
Otro/Sin tinción	17	9,04	14,60	3,54		17	2,31	1,40	0,34		17	1,14	0,64	0,16	
Queratinización	14	10,37	15,97	4,27	0,284	14	2,46	1,49	0,40	0,681	14	1,04	0,67	0,18	0,949
Sin-queratinización	22	6,35	5,62	1,20		22	2,29	1,01	0,21		22	1,03	0,53	0,11	
PD (enfermedad progresiva)	21	10,80	13,61	2,97	0,043	21	2,67	1,46	0,32	0,068	21	1,19	0,71	0,15	0,030
Sin PD	16	4,34	1,74	0,43		16	2,01	0,59	0,15		16	0,82	0,18	0,04	
Fallecido	16	11,17	14,75	3,69	0,118	16	2,74	1,41	0,35	0,118	16	1,26	0,72	0,18	0,050
Con vida	21	5,60	5,40	1,18		21	2,11	0,96	0,21		21	0,86	0,35	0,08	

CD44 en ng/ml(x5) y proteína en mg/ml.
SD: desviación estándar, SE: error estándar. P: valor P de prueba-t de Student.

La tinción nuclear con p16 es un indicador eficaz de la infección por HPV. Los niveles de SolCD44 son más altos en HPV⁻ que en HPV⁺.

Tabla 5. Efectos univariados de factores de pronóstico potenciales sobre PFS y OS

Factor de pronóstico	PFS		OS	
	HR (95 % CI)	Valor-P	HR (95 % CI)	Valor-P
Log2 CD44 aumento de 1-unidad	1,407 (0,989, 2,001)	0,0574	1,638 (1,081, 2,482)	0,0200
Proteína aumento de 1-unidad	3,607 (1,626, 7,999)	0,0016	3,897 (1,701, 8,928)	0,0013
CD44>=10 vs. <10	3,180 (1,306, 7,742)	0,0108	4,595 (1,601, 13,186)	0,0046
Proteína >=1 vs. <1	3,243 (1,349, 7,798)	0,0086	3,379 (1,239, 9,214)	0,0173
Fumador: actual vs. no fumador	0,911 (0,155, 4,993)	0,9148	3,099 (0,346, 27,738)	0,3117
Fumador: ex vs. no fumador	1,410 (0,321, 6,198)	0,6496	2,750 (0,355, 21,328)	0,3331
Fumador: actual vs. no/ex	1,501 (0,575, 3,915)	0,4069	1,261 (0,436, 3,642)	0,6688
Alcohol: pesado vs. no/leve	2,236 (0,919, 5,439)	0,0759	2,775 (0,959, 8,031)	0,0598
P16 ⁺ vs. P16 ⁻	0,674 (0,268, 1,693)	0,4014	0,748 (0,265, 2,113)	0,5831
P16 nuclear vs. solo cist/sin tinción	0,628 (0,240, 1,640)	0,3420	0,765 (0,261, 2,242)	0,6251
CD44: memb_solamente, universal vs. otro	1,763 (0,698, 4,452)	0,2304	2,407 (0,765, 7,579)	0,1333
EGFR: memb&cit, universal vs. otro	1,691 (0,686, 4,173)	0,2539	1,203 (0,427, 2,289)	0,7269
Etapa IV vs. I-III	2,994 (1,005, 8,921)	0,0490	2,824 (0,802, 9,939)	0,1059
Etapa III-IV vs. I-II	2,732 (0,367, 20,355)	0,3268	2,164 (0,285, 16,415)	0,4552
T4- vs. T1-3	3,055 (1,260, 7,408)	0,0135	2,973 (1,078, 8,204)	0,0353
Negro vs. blanco	5,432 (2,152, 13,714)	0,0003	6,530 (2,286, 18,658)	0,0005
No-hispano vs.hispano	3,001 (1,254, 7,182)	0,0136	4,009 (1,431, 11,234)	0,0083
Género: femenino vs. masculino	2,388 (0,924, 6,170)	0,0723	1,770 (0,494, 6,338)	0,3801
Edad aumento de 1- unidad	1,003 (0,961, 1,047)	0,8778	1,043 (0,991, 1,096)	0,1046

HR (95 % CI): estimación de riesgo y el correspondiente intervalo de confianza del 95 % a partir de modelos de Cox univariado

5 La sección encerrada en la Tabla 5 muestra asociaciones significativas entre los niveles de marcador y las variables pronosticas.

Factor de pronóstico	PFS		OS	
	HR (95 % CI)	Valor-P	HR (95 % CI)	Valor-P
CD44 > =10 vs. <10	2,327 (0,891, 6,078)	0,0847	4,370 (1,489, 12,824)	0,0073
Etapa IV vs. I-III	2,197 (0,675, 7,148)	0,1910	1,487 (0,188, 11,784)	0,7073
CD44 > =10 v. <10	2,949 (1,195, 7,281)	0,0190	3,610 (1,164, 11,194)	0,0262
Etapa III-IV v. I-II	2,014 (0,262, 15,498)	0,5014	1,894 (0,488, 7,348)	0,3558
Proteína > =1 v. <1	2,470 (0,956, 6,381)	0,0619	2,710 (0,921, 7,974)	0,0702
Etapa IV v. I-III	2,059 (0,630, 6,734)	0,2321	1,886 (0,486, 7,319)	0,3589
Proteína > =1 v. <1	3,018 (1,223, 7,446)	0,0165	3,256 (1,139, 9,305)	0,0276
Etapa III-IV v. I-II	1,728 (0,219, 13,667)	0,6040	1,260 (0,151, 10,506)	0,8312

El efecto de solCD44 y la proteína total en la predicción de la supervivencia libre de progresión (PFS) y la supervivencia global (OS) parece ser independiente de la etapa.

5 Ejemplo 3:

10 Existe una tremenda necesidad de una prueba simple, de bajo coste, no invasiva de detección temprana para HNSCC. Los esfuerzos previos se han centrado en CD44, una glicoproteína transmembrana que está emergiendo como un marcador crítico de iniciación tumoral de HNSCC. Cuando las células SCC-25 (CD44 bajo) se transfectaron con CD44 de forma estándar, se demostró que la sobreexpresión de CD44 dio como resultado un aumento de la proliferación, migración y resistencia al cisplatino (Figuras 3A, 3B, 3C). Además, la anulación de CD44 usando la línea celular alta CAL27 de CD44 y EGFR da lugar a un crecimiento tumoral muy disminuido en ratones lampiños (Figura 4A, 2B) (P<0,05). Los interactuantes CD44 han demostrado interactuar con las principales tirosina quinasas tales como EGFR (el objetivo de la terapia de cetuximab) para inducir el crecimiento y la migración. Los datos divulgados en la Figura 5 muestran que el EGFR total y su forma fosforilada (Y1068) se reducen en xenoinjertos de CD44-siARN que indican que las dos moléculas están funcionalmente relacionadas.

20 Debido a la necesidad crítica de una prueba de detección temprana y el conocimiento de que CD44 podría escindirse a una forma soluble, se evaluó la solCD44 en los enjuagues orales de pacientes con cáncer y controles. En un estudio piloto que incluyó 26 pacientes con HNSCC y 10 voluntarios sanos, se demostró que el solCD44 podía detectarse en los enjuagues orales y podía distinguir a los pacientes con enfermedad invasiva de los voluntarios normales con una sensibilidad de 79 % y 100 % de especificidad. Para determinar si esta prueba funcionaría en una población de mayor riesgo, se desarrolló una cohorte de control con antecedentes de uso de tabaco y/o alcohol y enfermedad benigna de cabeza y cuello. En este estudio con 102 HNSCC y 69 controles, se demostró que la prueba ELISA solCD44 tenía una sensibilidad del 62 % y una especificidad del 88 %, y se demostró que las enfermedades benignas no tenían un impacto significativo en los resultados. Se determinó que los niveles de los marcadores eran más bajos en sujetos con tumores laríngeos/hipofaríngeos que son menos frecuentes y localizados más distalmente en el tracto aerodigestivo superior (UADT).

30 Para mejorar la sensibilidad, se examinaron marcadores adicionales. Se encontró que la proteína total, medida mediante un ensayo simple de tipo Lowry y usada originalmente como normalizador para el estado de hidratación, era elevada en HNSCC en comparación con los controles. Cuando se evaluó la misma cohorte, se demostró por primera vez que solCD44 y los niveles totales de proteína combinados, son más eficaces para distinguir el HNSCC de los controles que cualquiera de los dos marcadores. Un trabajo más reciente en una cohorte de 39 controles y 40 casos demostró que la inclusión de otras variables de riesgo como la pérdida de dientes y la educación mejora la prueba, resultando en un área bajo la curva (AUC) para el análisis multivariado de 0,85.

Tabla 7. Modelos logísticos ajustados para edad

Grupo	Casos	Controles	Modelo	Variables	OR	p	AUC
Hombre negro	15	15	1	Log2 CD44	2,878	0,0457	0,853
				Proteína	13,378	0,0250	0,862
			2	Log2 CD44 & Proteína	2,078	0,2405	0,889
			3				
Hombre blanco	90	76	1	Log2 CD44	2,410	<,0001	0,723
				Proteína	2,101	0,0594	0,609
			2	Log2CD44 & Proteína	2,965	<,0001	0,739
			3				
Mujer negra	7	17	1	Log2CD44	1,963	0,2204	0,647
				Proteína	3,796	0,2238	0,672
			2	Log2CD44 & Proteína	1,554	0,6705	0,689
			3				
Mujer blanca	19	14	1	Log2CD44	1,262	0,6988	0,600
				Proteína	1,896	0,3557	0,594
			2	Log2CD44 & Proteína	0,989	0,9823	0,594
			3				

Tabla 8. SolCD44, log2solCD44 y niveles de proteína en los enjuagues bucales

	Cáncer (N=132)				Control (N=124)			Valor-P
	N	Media	SD	SE	Media	SD	SE	
CD44	132	5,83	7,19	0,63	2,95	1,92	0,17	<,0001
Log2 CD44	132	2,01	1,16	0,10	1,30	0,87	0,08	<,0001
Proteína	132	0,98	0,55	0,05	0,77	0,41	0,04	<,001

Este estudio utilizó un diseño caso-control para evaluar los marcadores solubles para HNSCC en 150 pacientes con HNSCC orofaríngea y de cavidad oral y 150 controles de frecuencia emparejada para las variables importantes. La Tabla 7 muestra un análisis provisional de solCD44, log2 solCD44 y niveles de proteína total en 132 casos y 124 controles. Los casos y controles fueron exitosamente emparejados en frecuencia por edad, sexo, raza y etnia ($p > 0,5$). Tanto los niveles de proteína total como los de solCD44 están significativamente elevados. Los modelos logísticos de la Tabla 8 se ajustan para edad. La prueba detectó cáncer oral mejor en hombres negros. Para las mujeres negras, el tamaño de la muestra era menor. No hubo un efecto significativo de los marcadores, ya sea individualmente o en conjunto, sin embargo, las proporciones de probabilidades correspondientes estaban en la misma dirección que los hombres negros. Entre los hombres blancos, el efecto de log2 CD44 fue significativo por sí mismo o cuando se añadió proteína. Hubo una ligera mejoría para el modelo 3 comparado con el modelo 1. Finalmente, entre las hembras blancas, los marcadores fueron menos efectivos, con AUCs cercanos a 0,60. Dado que la prueba de marcador funcionó mejor en hombres negros, un grupo donde la infección por HPV es menos común, la expresión de HPV se examinó en los casos de cáncer oral.

Se identificaron 37 casos con el tejido FFPE disponible. A excepción de un paciente con seguimiento de 13,9 meses, todos los 20 pacientes vivos restantes tuvieron seguimiento en el intervalo de 27 a 54,4 meses (mediana 37 meses). Catorce de 16 muertes ocurrieron dentro de los primeros 2 años de seguimiento. solCD44 y los niveles de proteína total se evaluaron en los enjuagues orales, y varios patrones de tinción de CD44, EGFR y p16 (como un sustituto de la infección por HPV) se examinaron utilizando IHC. También se determinaron asociaciones con supervivencia libre de progresión y global. También se evaluaron importantes comportamientos demográficos y de factores de riesgo como género, raza, etnia, consumo de tabaco y alcohol. Esta cohorte tenía los siguientes datos demográficos: la edad media era de 60,4 años, el 16,2 % eran mujeres, el 59,5 % eran hispanos, el 21,6 % eran negros, el 64,9 % eran fumadores actuales, el 50 % eran bebedores intensos y el 57,1 % tenía ingresos inferiores a \$10.000 por año. Las características de la enfermedad del grupo fueron las siguientes: 35,1 % fueron cavidad oral (OC) y el resto fueron cánceres orofaríngeos (OP); sólo el 32,4 % de los sujetos eran etapa III o inferior; los pacientes fueron tratados con quimiorradioterapia (43,2 %), cirugía y quimiorradioterapia (24,3 %), cirugía sola (13,5 %), cirugía más radiación (5,4 %), cirugía y quimioterapia (2,7 %), quimioterapia sola (2,7 %) y nada o faltaban los datos (5,4 %). Casi el 57 % regresó o progresó y el 43,2 % falleció.

Cuarenta y cuatro por ciento de los tumores fueron p16⁺ como se define por el 50 % o más de las células tumorales de tinción positiva para p16. La comparación de los patrones de IHC reveló que la tinción positiva de p16, la falta de tinción de membrana CD44, la falta de la tinción de membrana de EGFR y el patrón de tinción citoplasmática, y los tumores no queratinizantes se asociaron significativamente con OP en comparación con los tumores OC. No hubo diferencias en la estadificación ni en los resultados por sitio del tumor. Con respecto a la localización de la tinción, la positividad de p16 se asoció significativamente con la tinción nuclear o nuclear y citoplasmática p16 ($p < 0,001$) en comparación con sólo tinción citoplasmática o ninguna tinción. De manera similar, la falta de tinción universal de la membrana CD44 ($p < 0,0001$) se asoció con la positividad p16. La falta de membrana universal EGFR y tinción citoplasmática en los tumores p16 positivos también alcanzó importancia estadística ($p = 0,02$). La queratinización, el género, la etnia, la raza, el consumo de tabaco y de alcohol no estaban significativamente relacionados con la positividad de p16 en este estudio.

Los niveles de SolCD44 y de proteínas totales en el enjuague oral no mostraron diferencias significativas con base en el estado de p16 si se usó la definición de p16⁺ como 1) 50 % o más células tumorales p16⁺ o 2) cualquier tinción nuclear p16 en oposición a solamente tinción citoplasmática/sin tinción. Sin embargo, tanto para solCD44 como para la proteína total, los niveles significativamente más altos se asociaron con recidiva o progresión (CD44: 10,8 vs. 4,3 $p = 0,043$, proteína 1,2 vs. 0,8 $p = 0,030$). Con base en Kaplan-Meier, prueba de grado logarítmico y análisis de regresión de Cox, los predictores significativos de supervivencia libre de progresión fueron CD44 (≥ 10 vs. < 10 , HR=3,18 $p = 0,011$), proteína (≥ 1 vs. < 1 , HR=3,24, $p = 0,009$), etapa T (T4 vs. T1-III, HR=2,99, $p < 0,049$), raza (Negro vs. Blanco, HR=5,43, $p < 0,0001$) y etnia (no-hispano vs. hispano, HR=3,00, $p < 0,014$). El género casi alcanzó significación (femenino vs. masculino, HR=2,39, $p < 0,072$). De manera similar, los predictores significativos de supervivencia global fueron CD44 ≥ 10 (HR=4,60, $p = 0,005$), proteína ≥ 1 (HR=3,38, $p = 0,17$), etapa T4 (HR=2,97, $p = 0,035$), raza negra (HR=6,53, $p < 0,001$) y la etnia no hispana (HR=4,01, $p = 0,008$). Las siguientes variables no mostraron importancia como predictor de la supervivencia libre de progresión y de la supervivencia global: el estado de p16, patrón de tinción de CD44, patrón de tinción de EGFR, queratinización, historia de consumo de tabaco, historial de consumo de alcohol, sitio (cavidad oral versus orofaríngea), estado del nódulo y edad. Además, CD44 y

proteína conservaron la magnitud de efecto y la significación en el análisis bivariado, incluida la etapa de la enfermedad.

- 5 En este grupo de HNSCC, sólo 5 sujetos nunca fueron fumadores; de estos, 4 fueron HPV⁺. De los nunca fumadores y HPV⁺ todos estaban vivos y 1 en recidiva. Por lo tanto, la falta de asociación entre el estado p16 y el pronóstico puede deberse a los pocos nunca fumadores en el estudio, ya que varios estudios muestran que los HPV⁺ no fumadores tienen un pronóstico notablemente mejor en comparación con los HPV⁺ fumadores.
- 10 Para investigar más a fondo las asociaciones significativas entre p16, CD44 y localización EGFR, se realizó tinción de inmunofluorescencia. La Figura 6 muestra la tinción de p16- IHC típica donde la tinción es citoplasmática y difusa. En este caso, CD44 se tiñe en la membrana y universalmente a lo largo del tumor. CD44 y EGFR se colocalizan en la membrana celular y también hay cierta tinción citoplasmática de EGFR.
- 15 Sin embargo, cuando los tumores son p16⁺, como se muestra en la Figura 7, los núcleos se tiñen fuertemente para p16 y también hay tinción citoplasmática. Sin embargo, la tinción de la membrana CD44 se pierde, sólo los linfocitos invasores retienen la expresión de CD44. La expresión de EGFR no se ve en absoluto.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar un riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) en un sujeto infectado con papilomavirus humano (HPV), comprendiendo el método:
- 5 a) proporcionar una muestra obtenida a partir de un fluido corporal del sujeto;
- b) ensayar un nivel de solCD44 en la muestra;
- c) ensayar un nivel de proteína total en la muestra;
- 10 d) combinar el nivel de solCD44 medido en la muestra con el nivel de proteína total medido en la muestra y el estado de HPV del sujeto, proporcionando así una puntuación combinada;
- e) proporcionar una puntuación predictiva para tener el riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, en el que la puntuación predictiva se obtiene mediante un análisis estadístico de solCD44 y la proteína total medida y estado de HPV de una población con un riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello; y
- 15 f) determinar el riesgo de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en el sujeto cuando la puntuación combinada excede la puntuación predictiva.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el riesgo es un riesgo de recurrencia de HNSCC.
3. El método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el fluido corporal es saliva.
- 20 4. El método de la reivindicación 3, en el que la muestra de saliva es un enjuague oral.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se usa un anticuerpo dirigido contra CD44 para ensayar el nivel de solCD44.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, en el que el ensayo es un Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima, un ensayo de flujo lateral o inmunoprecipitación Western, o comprende técnicas de inmunoprecipitación, inmunofluorescencia o inmunohistoquímica.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además el ensayo del nivel de al menos uno de: ácido hialurónico (HA) e hialuronidasa (HAasa) en la muestra.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el sujeto infectado con papilomavirus humano se identifica detectando p16^{INK4a}.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sujeto infectado con papilomavirus humano se identifica detectando ADN o ARN de HPV, proteína de HPV o cambios epigenéticos.
- 40 10. Un kit, que comprende:
- al menos un anticuerpo que se enlaza específicamente a p16^{INK4a};
- al menos un anticuerpo que se enlaza específicamente a CD44; y
- un reactivo para determinar la concentración de proteína total en una muestra.
- 45 11. El kit de la reivindicación 10, en el que al menos un anticuerpo que se enlaza específicamente a p16^{INK4a} comprende el idiotipo del clon del anticuerpo E6H4.
12. El kit de la reivindicación 10 u 11, que comprende además una muestra de referencia de CD44, una muestra de referencia de p16, o una combinación de los mismos.
- 50 13. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende además uno o más agentes colorimétricos para la detección del anticuerpo que se enlaza específicamente a p16^{INK4a}, el anticuerpo que se enlaza específicamente a CD44, o una combinación de los mismos.
- 55 14. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que el kit es un inmunoensayo de flujo lateral.
15. El kit de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que el kit comprende una placa de pozos múltiples opcionalmente revestida con el anticuerpo que se enlaza específicamente a p16^{INK4a}, el anticuerpo que se enlaza específicamente a CD44, o una combinación de los mismos.

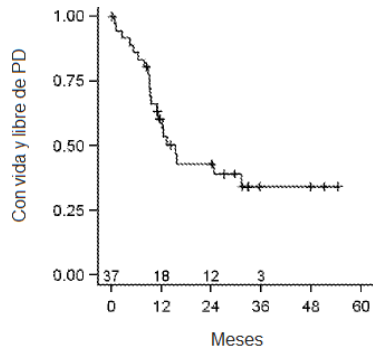


FIGURA 1A

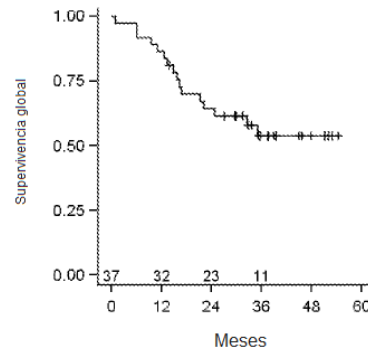


FIGURA 1B

5

	PFS	OS
Mediana	15.4 meses (9.6, --)	No se obtuvo
Tasa de 12 meses	60.3% (42.3, 74.3%)	86.5% (70.5, 94.1%)
Tasa de 24 meses	43.1% (25.8, 59.2%)	64.3% (46.6, 77.5%)
Tasa de 36 meses	34.3% (17.7, 51.5%)	53.8% (35.4, 69.0%)

FIGURA 1C

		N	Mediana	Min	Max	Media	Std
os_mes	Todos	37	29.8	1.0	54.4	28.6	14.7
	Fallecidos	16	15.2	1.0	35.0	16.2	9.2
	Con vida	21	37.4	13.9	54.4	38.1	10.2
pfs_mes	All	37	11.7	0.3	54.4	17.5	14.2
	pd	16	28.3	0.3	54.4	26.5	16.1
	No pd	21	9.4	0.8	31.2	10.6	7.2

FIGURA 1D

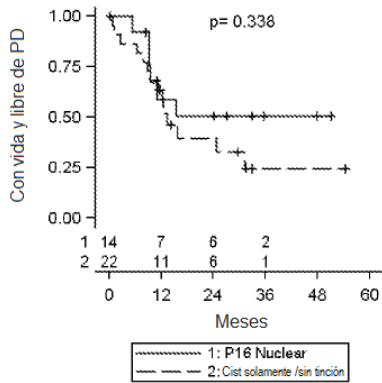


FIGURA 2A

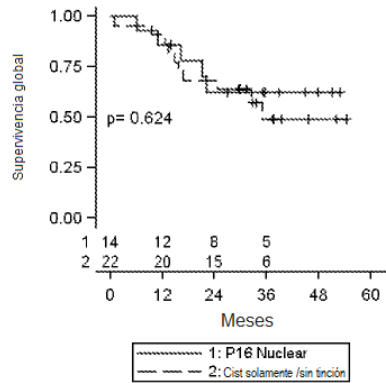


FIGURA 2B

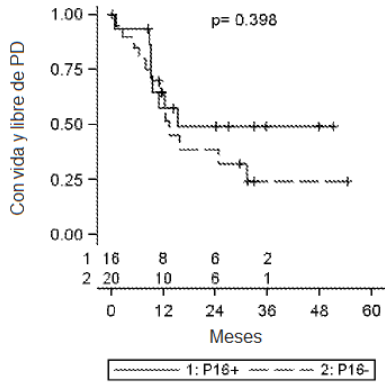


FIGURA 2C

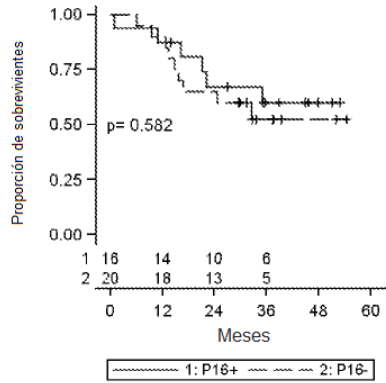


FIGURA 2D

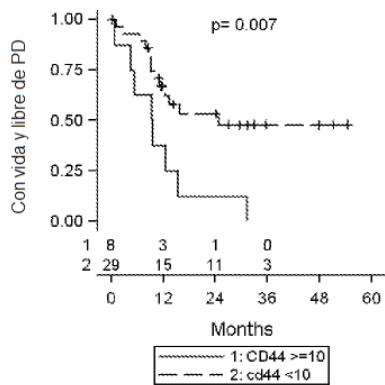


FIGURA 2E

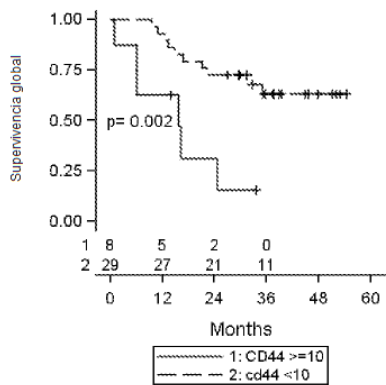


FIGURA 2F

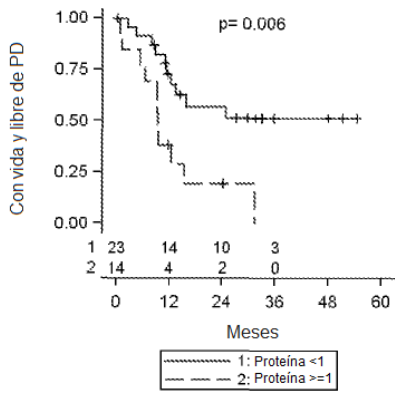


FIGURA 2G

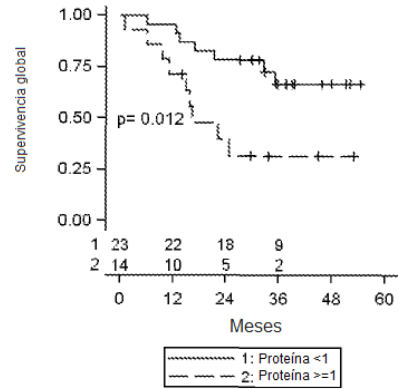


FIGURA 2H

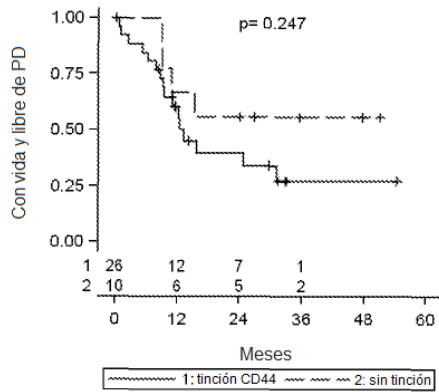


FIGURA 2I

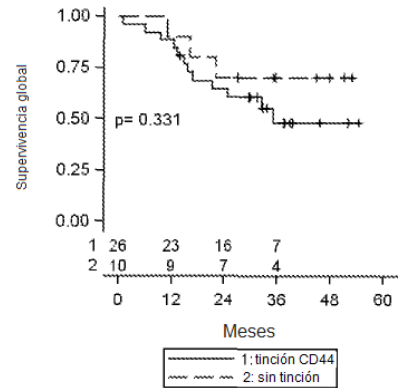


FIGURA 2J

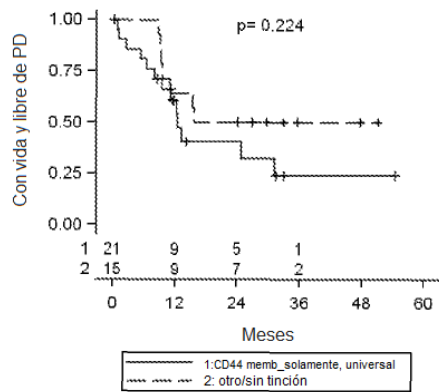


FIGURA 2K

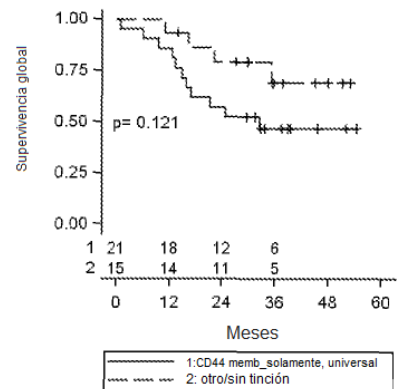


FIGURA 2L

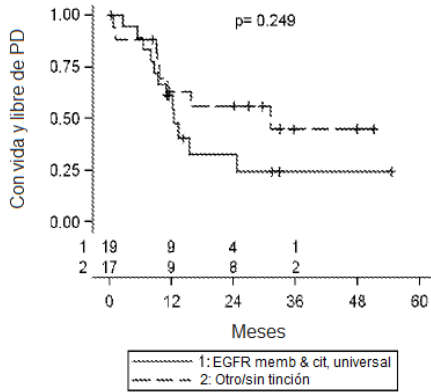


FIGURA 2M

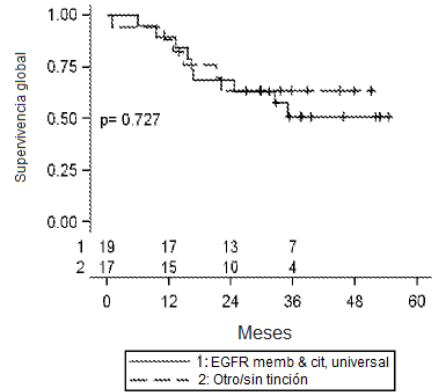


FIGURA 2N

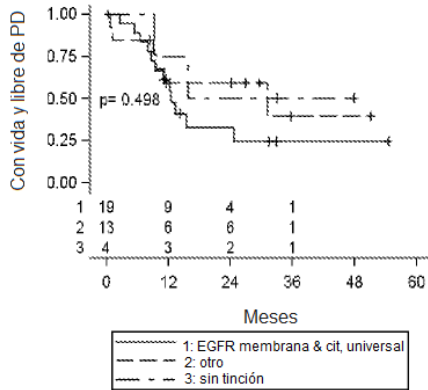


FIGURA 2O

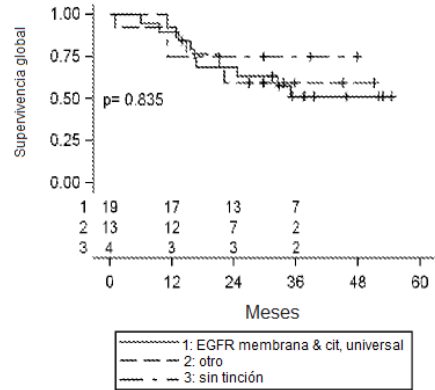


FIGURA 2P

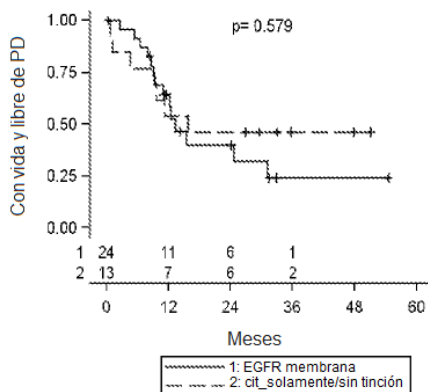


FIGURA 2Q

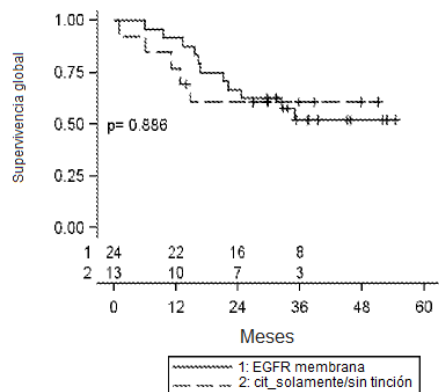


FIGURA 2R

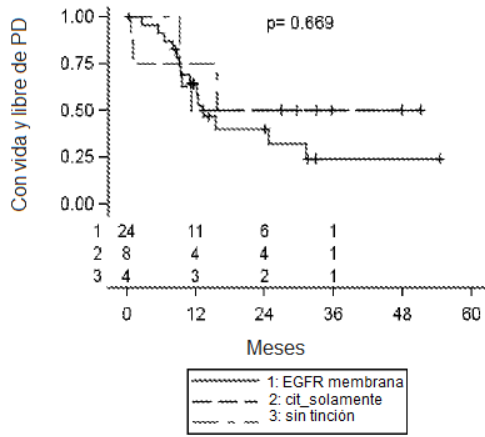


FIGURA 2S

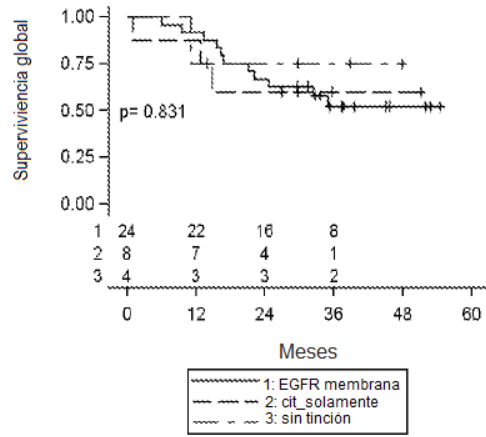


FIGURA 2T

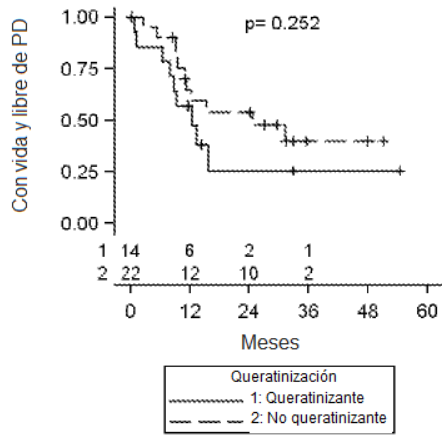


FIGURA 2U

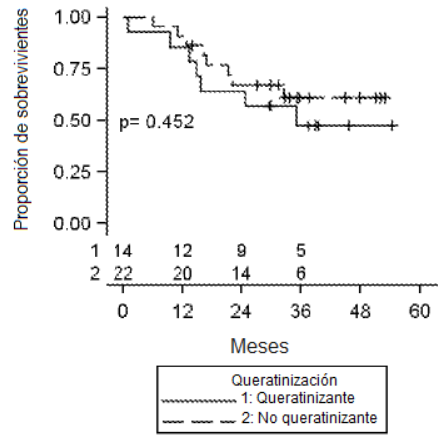


FIGURA 2V

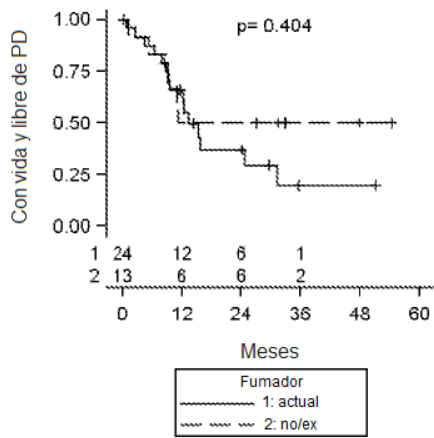


FIGURA 2W

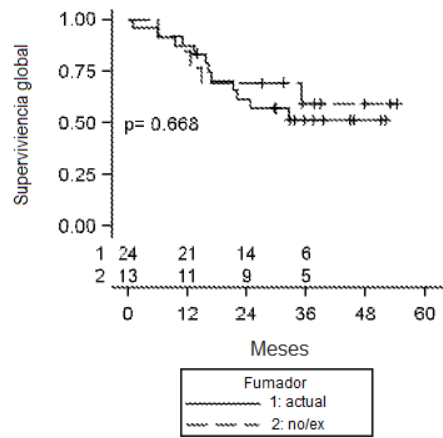


FIGURA 2X

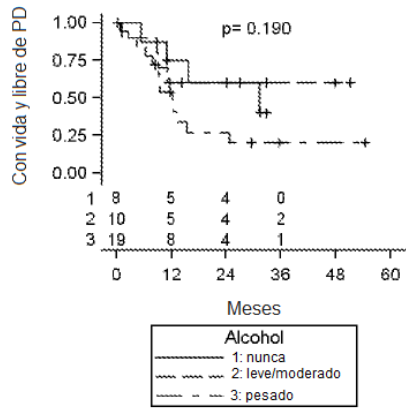


FIGURA 2Y

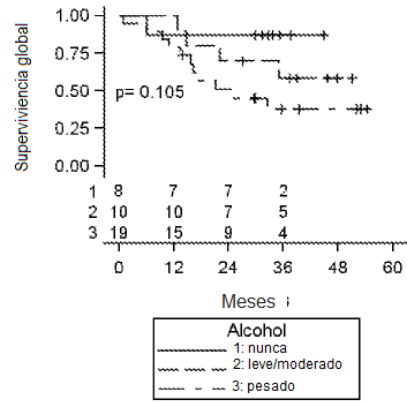


FIGURA 2Z

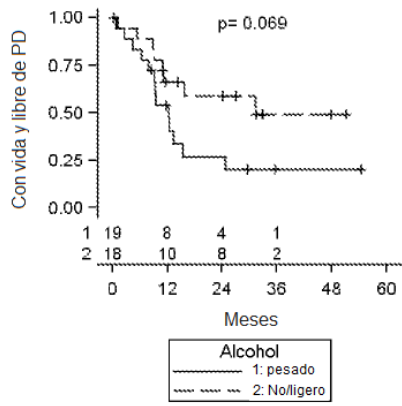


FIGURA 2AA

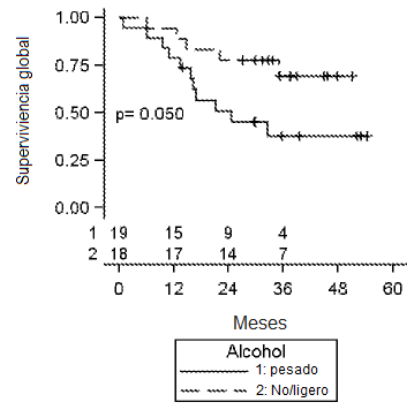


FIGURA 2BB

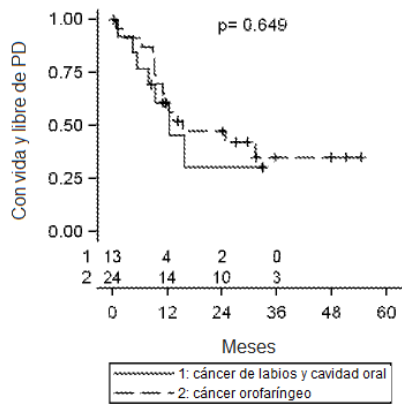


FIGURA 2CC

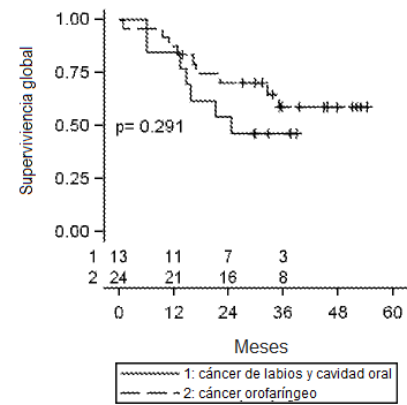


FIGURA 2DD

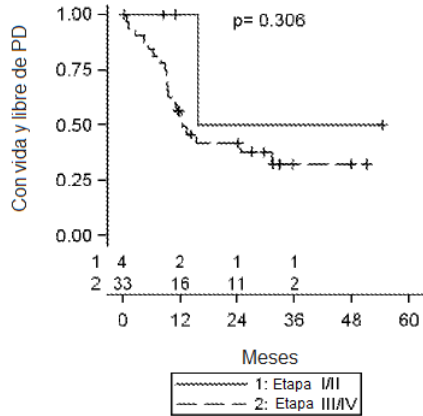


FIGURA 2EE

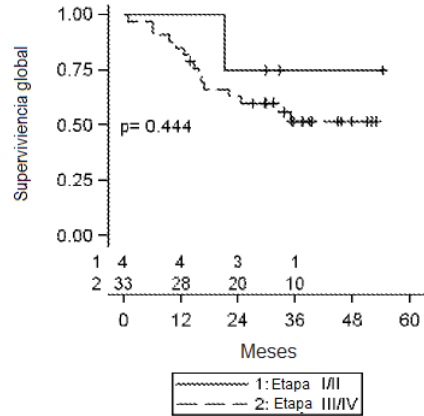


FIGURA 2FF

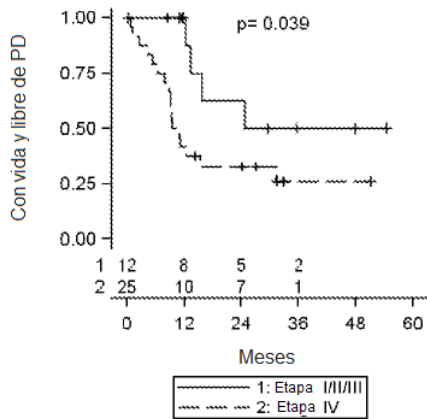


FIGURA 2GG

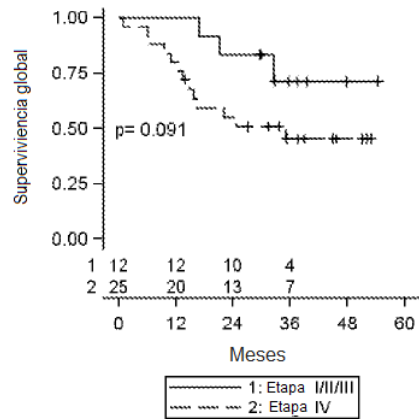


FIGURA 2HH

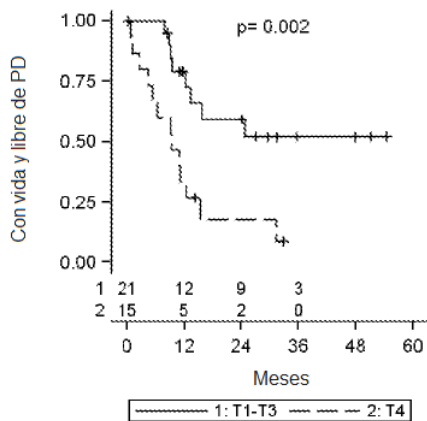


FIGURA 2II

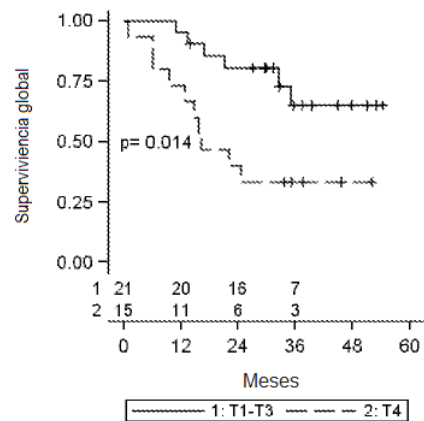


FIGURA 2JJ

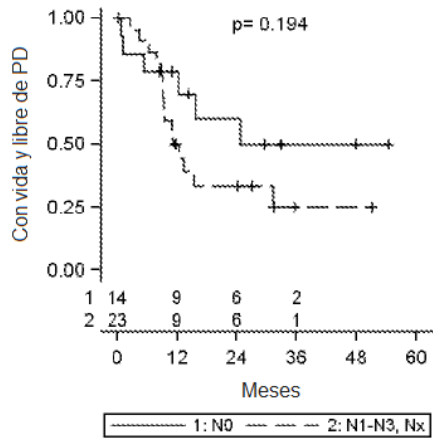


FIGURA 2KK

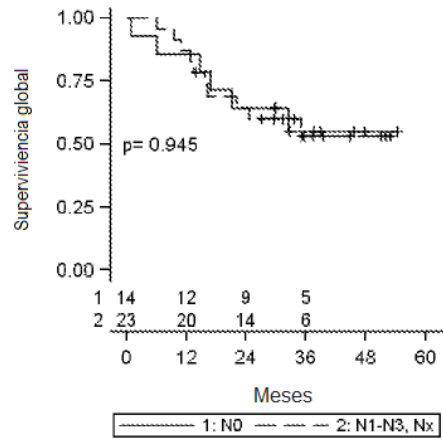


FIGURA 2LL

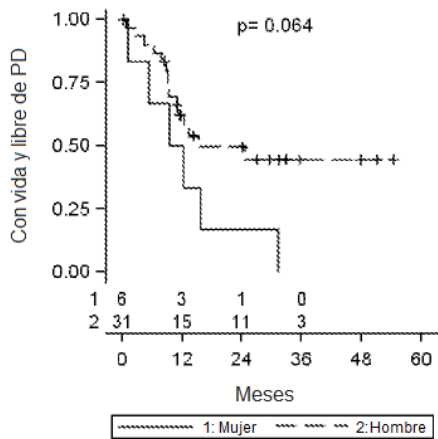


FIGURA 2MM

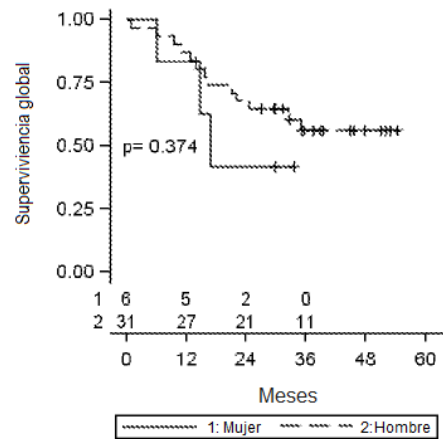


FIGURA 2NN

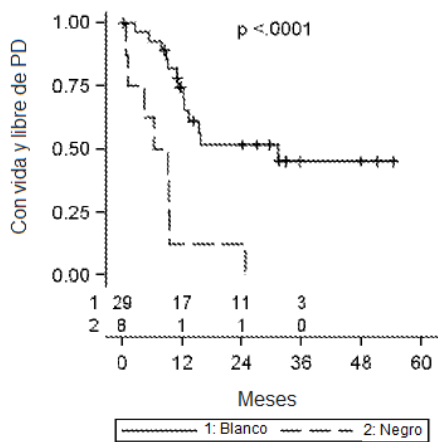


FIGURA 2OO

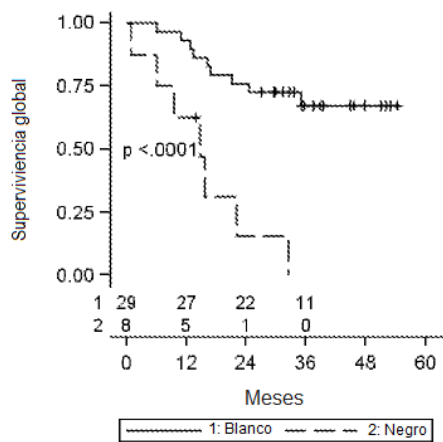


FIGURA 2PP

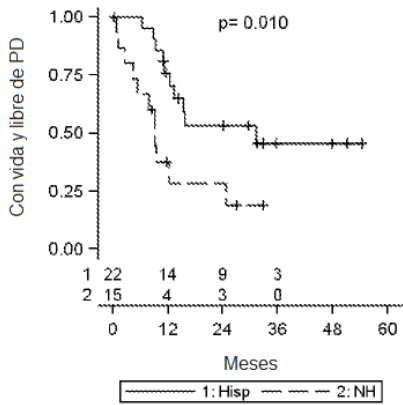


FIGURA 2QQ

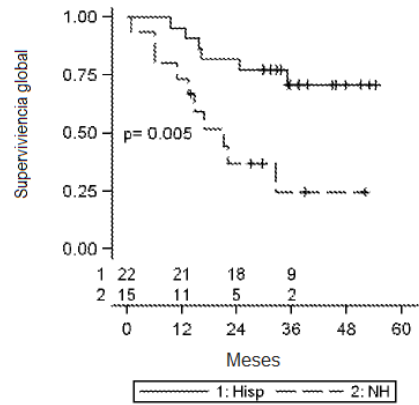


FIGURA 2RR

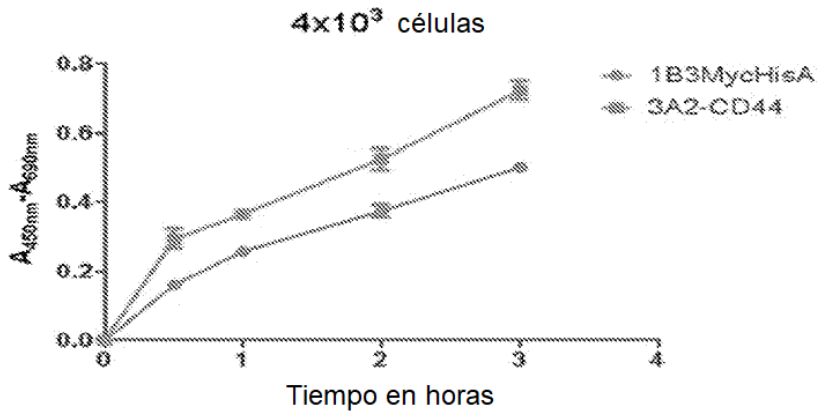


FIGURA 3A

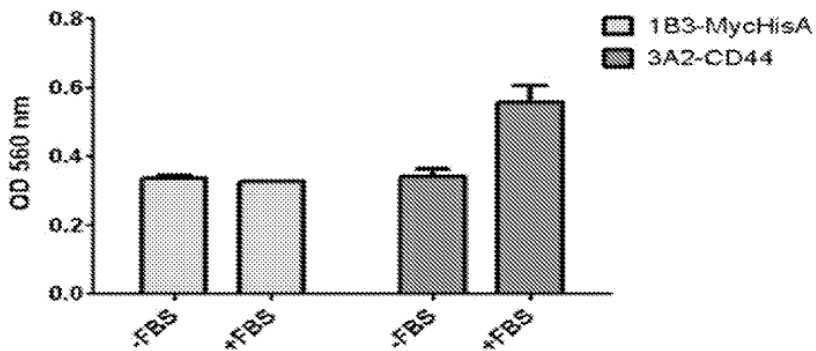


FIGURA 3B

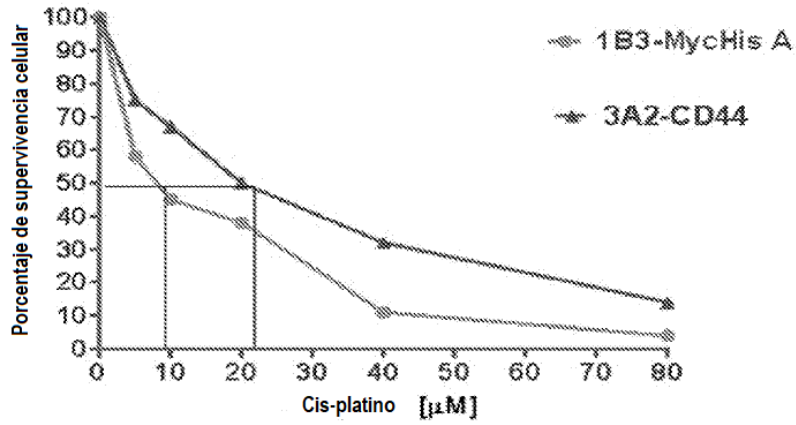


FIGURA 3C

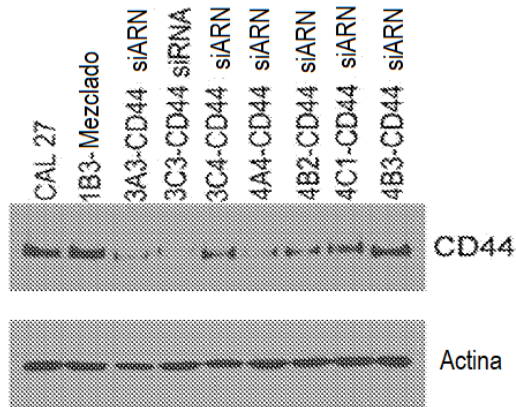


FIGURA 4A

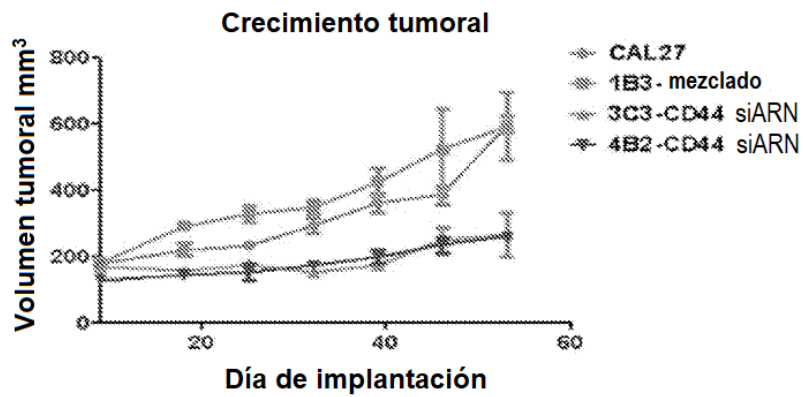


FIGURA 4B

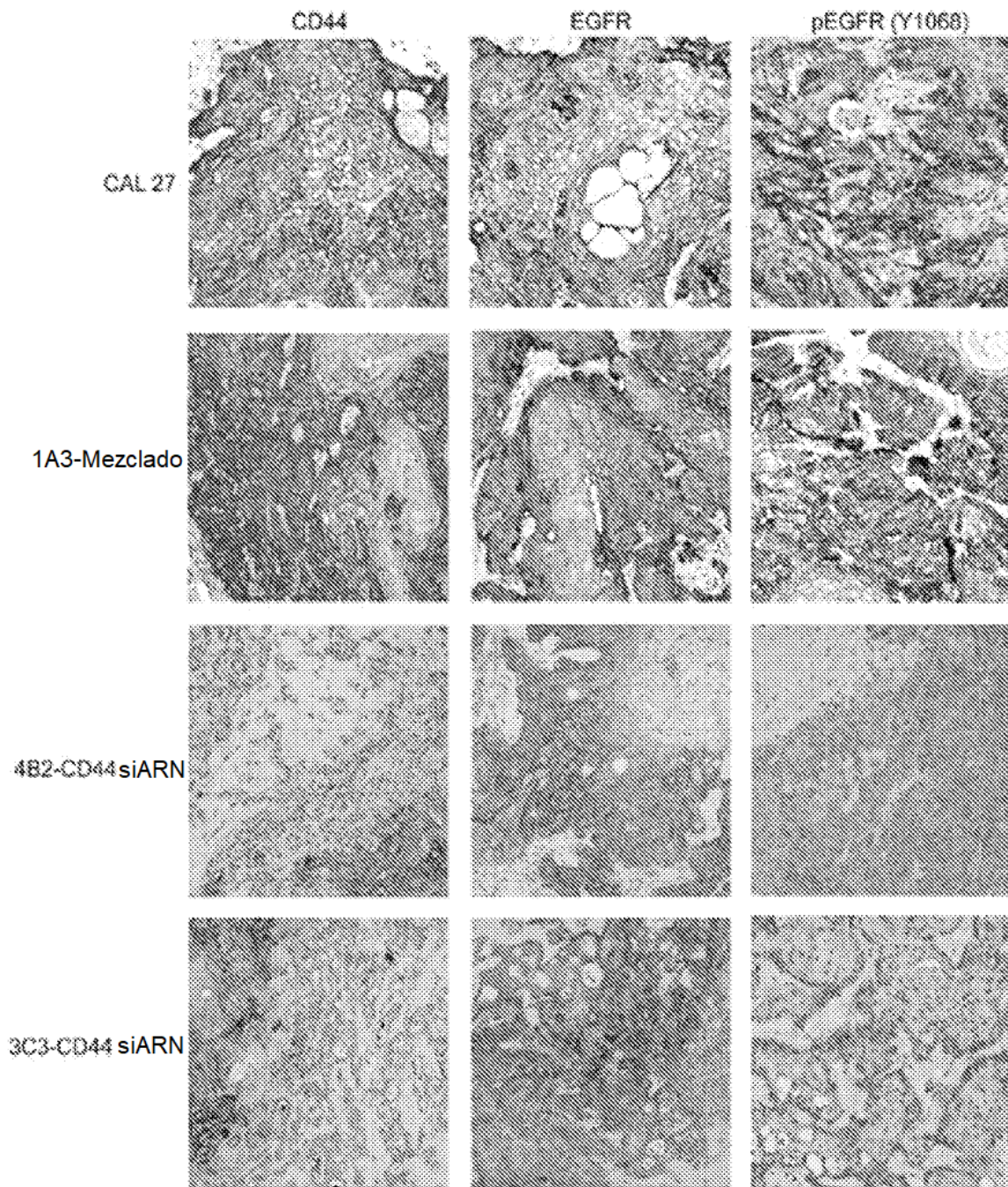


FIGURA 5

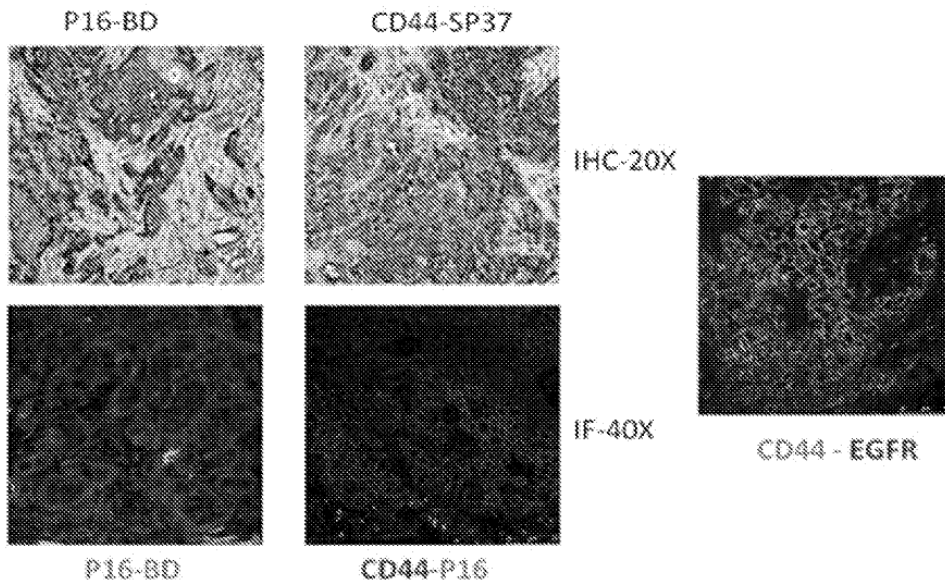


FIGURA 6

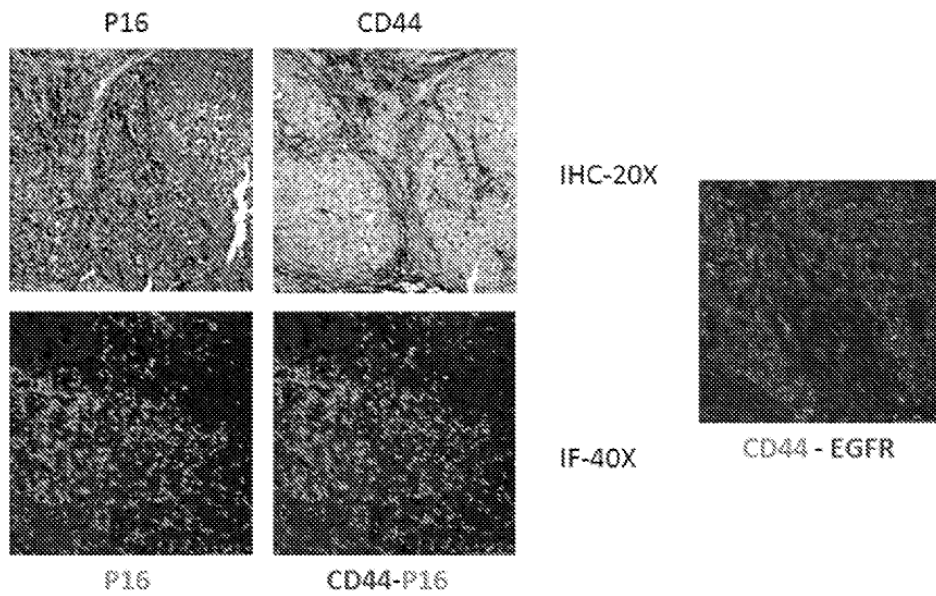


FIGURA 7