

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 614**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.11.2015 PCT/GB2015/053347**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2016 WO16075440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.11.2015 E 15794627 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3218720**

54 Título: **Biomarcadores para progresión de enfermedad en melanoma**

30 Prioridad:

10.11.2014 GB 201419976

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

26.03.2019

73 Titular/es:

**AMLO BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)
c/o Rmt Accountants & Business Advisors Ltd,
Gosforth Park Avenue
Newcastle Upon Tyne, NE12 8EG, GB**

72 Inventor/es:

**LABUS, MARIE;
LOVAT, PENNY y
ELLIS, ROBERT**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 705 614 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

Biomarcadores para progresión de enfermedad en melanoma

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, entre otros, a agentes terapéuticos capaces de inhibir, prevenir o retrasar la metástasis del melanoma para uso en el tratamiento del melanoma, métodos para diagnosticar un mayor riesgo de metástasis en un sujeto que padece melanoma. Más particularmente, la invención se refiere a identificar si un sujeto que padece melanoma tiene un riesgo mayor de metástasis al determinar la expresión de Ambra-1 y Loricrina en una muestra de tejido obtenida del sujeto.

Antecedentes de la invención

15 El melanoma es responsable de solo el 2.3% de todos los cánceres de piel, pero es la forma más peligrosa para la vida, ya que es responsable de más del 75% de las muertes por cáncer de piel. El melanoma cutáneo es actualmente una de las principales preocupaciones de salud pública debido a las crecientes tasas de incidentes en todo el mundo, que cobran la vida de más de 2000 personas en el Reino Unido cada año. La tasa de aumento es más alta que para cualquier otro tipo de cáncer y se ha comparado con una epidemia. Parte del aumento puede deberse a mejoras en la vigilancia y
20 detección temprana, así como a cambios en los criterios de diagnóstico; sin embargo, se considera que una proporción sustancial del aumento es real. El aumento se ha relacionado con un aumento en la exposición al sol y/o un mayor uso de camas solares artificiales.

25 Las tasas europeas de incidentes estandarizadas por edad se han multiplicado por 4 en las mujeres y 7 en los hombres durante los últimos 30 años. El melanoma es ahora el quinto cáncer más común en el Reino Unido, y representa el 4% de todos los casos nuevos de cáncer. Las tasas de mortalidad también han aumentado, pero a una tasa desproporcionadamente menor que la incidencia, de modo que la proporción de muertes con respecto a los casos de pacientes disminuyó de manera constante en los últimos 50 años. Aun así, el melanoma es responsable de casi 50,000
30 muertes anuales en todo el mundo.

Los factores que afectan el pronóstico incluyen el grosor del tumor en milímetros (profundidad de Breslow), la profundidad relacionada con las estructuras de la piel (nivel de Clark), el tipo de melanoma, la presencia de metástasis y la presencia de ulceración. Los melanomas primarios que demuestran una ulceración epidérmica en el momento del diagnóstico predicen un aumento en las tasas de metástasis y resultados más pobres en comparación con los tumores no ulcerados.
35 Sin embargo, la biología subyacente de la ulceración sigue siendo enigmática.

El tratamiento del melanoma en etapa temprana (etapa AJCC 1a o 1b) implica la extirpación del tejido que rodea al melanoma, conocido como escisión local amplia. Esto suele ser seguido por un examen regular del paciente para la recurrencia de la enfermedad en un período de 1 a 5 años. La terapia, como la quimioterapia, no se administra a pacientes con melanoma en etapa temprana.
40

Para los pacientes con tumores más gruesos (AJCC etapas 2a, 2b o 2c), a una escisión local amplia se puede seguir una biopsia de ganglio linfático centinela para determinar si la enfermedad se ha diseminado a los ganglios linfáticos. Si es así, se puede realizar una disección de ganglios linfáticos. El tratamiento después de la cirugía para ayudar a prevenir que el melanoma regrese o se disemine se conoce como terapia adyuvante. La terapia adyuvante puede ser quimioterapia o terapia biológica (por ejemplo, tratamiento con interferón). Sin embargo, la terapia adyuvante generalmente solo se ofrece a pacientes con melanoma en etapa 2 como parte de un ensayo clínico.
45

La quimioterapia, la radioterapia y/o la terapia biológica se pueden usar para tratar los melanomas recurrentes en pacientes a los que se les haya extirpado un tumor en la etapa 2, para ayudar a controlar una mayor progresión metastásica en pacientes con enfermedad limitada a los ganglios linfáticos (etapa 3) o para reducir el melanoma en los pacientes con enfermedad metastásica avanzada (etapa 4 del AJCC) para reducir los síntomas.
50

Lim et al 2013 se relaciona con el papel funcional de Ambra-1 en la invasión y metástasis del melanoma ([https://research.ncl.ac.uk/expeditionresearchscholarships/postergalleries/2013posters/Andrea% 20Lim.pdf](https://research.ncl.ac.uk/expeditionresearchscholarships/postergalleries/2013posters/Andrea%20Lim.pdf)).
55

Riker Adam et al 2008 se relaciona con los perfiles de expresión génica del melanoma primario y metastásico (BMC Medical Genomics, Vol. 1, no. 1, p13, p1755-8794).

60 Sigue existiendo la necesidad de mejorar el tratamiento de los pacientes que padecen melanoma y disminuir la probabilidad de progresión a metástasis.

Es un objetivo de algunas realizaciones de la presente invención mitigar al menos parcialmente algunos de los problemas identificados en la técnica anterior.

65 Resumen de ciertas realizaciones de la invención

La invención proporciona:

- Un método in vitro para determinar si un sujeto con melanoma tiene un mayor riesgo de metástasis, el método comprende:

(i) determinar la expresión de Ambra-1 y Loricrina en una muestra de tejido obtenida del sujeto, en donde la muestra de tejido comprende tejido que recubre un melanoma primario; y

(ii) comparar la expresión obtenida en (i) con un tejido de referencia o los niveles obtenidos a partir del mismo,

donde una disminución en la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido en comparación con el tejido o los niveles de referencia, o una pérdida de expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido, es indicativa de un mayor riesgo de metástasis; y

- Un agente terapéutico capaz de inhibir, prevenir o retrasar la metástasis del melanoma para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto, en el que se ha identificado que dicho sujeto tiene un mayor riesgo de metástasis de acuerdo con el método anterior.

Ambra-1 (molécula activadora en la proteína de autofagia regulada por Beclin-1) es una proteína que contiene WD40. Los estudios han implicado a Ambra-1 en el control de la autofagia, en el que se cree que Ambra-1 funciona como una plataforma de interacción proteína-proteína. Se cree que el papel principal de Ambra-1 durante la autofagia es como miembro del complejo Beclin-1/VPS34 que participa en la formación de membranas ricas en PI3K durante la fase de nucleación de la autofagia. Los estudios han sugerido que Ambra-1 también actúa directamente como un regulador corriente arriba de la actividad autofágica. La secuencia de aminoácidos de Ambra-1 se muestra en las Figuras.

Además, se ha demostrado que Ambra-1 desempeña un papel en la diferenciación celular. La inactivación funcional de Ambra-1 en un modelo de ratón condujo a la letalidad en el útero con defectos graves del tubo neural asociados con un deterioro autofágico y una proliferación celular desequilibrada. A la inversa, se ha demostrado que la sobreexpresión de Ambra-1 disminuye las tasas de proliferación celular en el tejido neural, lo que apoya su papel como un actor clave en la proliferación epitelial.

Loricrina es una proteína rica en glicina-serina-cisteína que, en humanos, está codificada por el gen LOR. El gen LOR es parte de un grupo de genes en el cromosoma 1 llamado complejo de diferenciación epidérmica. Estos genes están involucrados en la formación y el mantenimiento de la capa externa de la piel (la epidermis), particularmente su superficie externa resistente (el estrato córneo). El estrato córneo, que se forma en un proceso conocido como cornificación, proporciona una barrera sólida entre el cuerpo y su entorno. Cada célula del estrato córneo, llamada corneocito, está rodeada por una cubierta de proteína llamada envoltura cornificada (CE). La loricrina es la proteína predominante de la envoltura cornificada. Los enlaces entre la loricrina y otros componentes de las envolturas mantienen unidos a los corneocitos y ayudan a darle fuerza al estrato córneo. La secuencia de aminoácidos de Loricrina se muestra en las Figuras.

El sujeto puede ser un humano o un animal que sufre de melanoma. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente humano. En algunas realizaciones, el sujeto ya ha sido diagnosticado con melanoma

En algunas realizaciones, el sujeto padece melanoma AJCC etapa 1, etapa 2, etapa 3 o etapa 4. En algunas realizaciones, el sujeto padece melanoma AJCC etapa 1a, etapa 1b, etapa 2a, etapa 2b o etapa 2c. En algunas realizaciones, el sujeto padece melanoma AJCC en etapa 1a o etapa 1b. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento comprenden además la representación de un tumor primario presente en una muestra de tejido obtenida de un sujeto de acuerdo con la representación AJCC.

El tratamiento para el melanoma en etapa temprana generalmente implica cirugía para extirpar el(los) tumor(es). La terapia se usa generalmente para controlar la diseminación de metástasis en las últimas etapas de la enfermedad, momento en el cual el pronóstico suele ser bajo. La identificación de aquellos sujetos que se encuentran en las primeras etapas de la enfermedad pero que tienen un riesgo alto o mayor de metástasis permitiría, de manera ventajosa, adaptar el tratamiento en consecuencia. Por ejemplo, la terapia podría administrarse a esos sujetos antes de lo que normalmente podría administrarse, inhibiendo, previniendo o retrasando la metástasis y mejorando el pronóstico de los sujetos.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el sujeto, antes de la identificación, no es elegible para el tratamiento con agentes terapéuticos. En ciertas realizaciones, un sujeto puede ser sometido a un régimen de tratamiento en una etapa anterior o menos progresiva en comparación con los métodos de la técnica anterior para tratar el melanoma en los que un paciente solo recibe tratamiento con un agente terapéutico cuando padece melanoma AJCC etapa 3 o 4, o recurrencia de la enfermedad después de un melanoma en etapa 2 o 3 de AJCC.

En algunas realizaciones, el sujeto tiene un melanoma ulcerado.

Inesperadamente, los presentes inventores han identificado una correlación entre los niveles de expresión de Ambra-1 y Loricrina y la probabilidad de metástasis en un sujeto con melanoma. En particular, se considera que una disminución en el nivel de expresión, o una pérdida de expresión, tanto de Ambra-1 como de Loricrina indica que el sujeto tiene un mayor riesgo de metástasis.

5

Como se usa en este documento, una disminución o pérdida en la expresión de Ambra-1 y Loricrina se entenderá que significa que el nivel de expresión de Ambra-1 y Loricrina es menor que aproximadamente el 75% del nivel de referencia respectivo.

10

En algunas realizaciones, una disminución en la expresión de Ambra-1 y Loricrina se entenderá que significa que el nivel de expresión de Ambra-1 y Loricrina es de aproximadamente 25 a aproximadamente 75% del nivel de referencia respectivo. En algunas realizaciones, una pérdida de expresión de Ambra-1 y Loricrina se entenderá que significa que el nivel de expresión de Ambra-1 y Loricrina es menor que aproximadamente el 25% del nivel de referencia de la proteína relevante. Se entiende que expresión normal significa que la expresión tanto de Ambra-1 como de Loricrina es mayor que aproximadamente el 75% del nivel de referencia respectivo.

15

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el nivel de expresión de Ambra-1 en la muestra de tejido es de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 75% del nivel de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de Ambra-1 no es mayor que 75%, no mayor que 70%, no mayor que 60%, no mayor que 50%, no mayor que 40% o no mayor que 30% del nivel de referencia.

20

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de Loricrina en la muestra de tejido es de aproximadamente 25% a aproximadamente 75% del nivel de referencia. En algunas realizaciones, el nivel de expresión de Loricrina no es mayor que 75%, no mayor que 70%, no mayor que 60%, no mayor que 50%, no mayor que 40% o no mayor que 30% del nivel de referencia.

25

En algunas realizaciones, no hay sustancialmente expresión de Ambra-1 y/o Loricrina en la muestra de tejido. En ciertas realizaciones, la expresión de Ambra-1 y/o Loricrina es inferior al 25%.

30

En algunas realizaciones, un mayor riesgo de metástasis significa una tasa de supervivencia de 7 años sin metástasis (también conocida como "libre de enfermedad") de menos del 50%, por ejemplo, menos del 40%, por ejemplo, menos del 30%, por ejemplo, menos del 20%, por ejemplo, menos del 10% o menos del 5%, por ejemplo.

35

En consecuencia, Ambra-1 y Loricrina pueden considerarse biomarcadores para la progresión de la enfermedad de melanoma a metástasis. Por lo tanto, se puede considerar que las realizaciones de la presente invención proporcionan métodos para predecir la progresión del melanoma a metástasis en un sujeto. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona además el uso de Ambra-1 y Loricrina, en una muestra de tejido que comprende tejido que recubre un melanoma primario, como biomarcadores de pronóstico para la progresión de la enfermedad de melanoma a metástasis. Adecuadamente, Ambra-1 y Loricrina pueden considerarse biomarcadores para estratificar a los sujetos con melanoma en aquellos con mayor probabilidad de desarrollar metástasis y aquellos con menor probabilidad de desarrollar metástasis. Ventajosamente, los métodos de ciertas realizaciones de la invención ayudan a identificar qué sujetos con melanoma tienen más probabilidades de beneficiarse del tratamiento con un agente terapéutico. Adecuadamente, ciertas realizaciones de la presente invención pueden permitir el tratamiento con un agente terapéutico para un paciente que de otro modo no habría sido elegible para el tratamiento con un agente terapéutico.

40

45

En lugar de determinar los niveles de expresión de los biomarcadores en el propio tumor, los métodos de ciertas realizaciones de la invención comprenden determinar los niveles de expresión de Ambra-1 y Loricrina en el tejido que recubre un melanoma primario. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la reducción o pérdida de la expresión de estas proteínas puede indicar una ruptura de la epidermis que recubre, y el tejido endotelial que recubre los vasos sanguíneos o linfáticos subyacentes, al tumor, lo que sugiere que las células cancerosas pueden ser capaces de o puede que ya hayan migrado del tumor primario. Tal migración puede conducir a metástasis.

50

La muestra de tejido comprende tejido que cubre un melanoma primario. En algunas formas de realización, la muestra de tejido comprende al menos una porción de la epidermis peritumoral que recubre el melanoma primario. En algunas realizaciones, la muestra de tejido comprende además una porción de tejido normal adyacente al melanoma primario. En algunas realizaciones, la porción de tejido normal proporciona una referencia. Apropiadamente, la referencia es un tejido de referencia y/o proporciona un nivel de referencia de Ambra-1 y Loricrina.

55

En algunas realizaciones, el método comprende determinar los niveles de expresión de Ambra-1 y Loricrina en la epidermis. Los queratinocitos son células que constituyen aproximadamente el 90% de la epidermis. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la muestra de tejido comprende queratinocitos que recubren el melanoma primario. Apropiadamente, el sujeto puede identificarse como en mayor riesgo de metástasis, en donde dicha identificación comprende determinar que el sujeto tiene una disminución o pérdida de la expresión de Ambra-1 y Loricrina en queratinocitos que recubren el melanoma primario del sujeto.

60

65

En algunas realizaciones, la muestra de tejido se ha obtenido previamente del sujeto, de manera que el propio muestreo no forma parte de los métodos de la invención. La muestra puede haberse obtenido inmediatamente antes del método, o una cantidad de horas, días o semanas antes del método.

5 Apropiadamente, la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido se compara con una o más referencias. Apropiadamente, la referencia es un tejido, o niveles de expresión obtenidos a partir de él.

10 En algunas realizaciones, la referencia comprende niveles de expresión de Ambra-1 y Loricrina que son característicos del tejido normal. Apropiadamente, los niveles de referencia de Loricrina y Ambra-1 pueden obtenerse determinando la expresión de Loricrina y Ambra-1 en un tejido de referencia. En algunas realizaciones, los niveles de expresión de Loricrina y Ambra-1 en un tejido de referencia se determinan mediante evaluación visual o automatizada.

15 En algunas realizaciones, los niveles de referencia de Ambra-1 y la expresión de Loricrina que son característicos del tejido normal se obtienen determinando los niveles de expresión en muestras de tejido obtenidas de uno o más (por ejemplo, una cohorte) de sujetos sanos.

20 En algunas realizaciones, el tejido de referencia comprende tejido normal. En algunas realizaciones, el tejido normal comprende epidermis de un sitio que no incluye un melanoma primario. En algunas realizaciones, el tejido de referencia (o niveles obtenidos a partir de él) es una referencia interna (es decir, obtenida del sujeto). En algunas realizaciones, el tejido de referencia es un tejido normal obtenido de un sitio adyacente al melanoma primario. En otras realizaciones, el tejido de referencia se obtiene de un sitio del sujeto que está alejado del melanoma primario. Por lo tanto, en alguna realización, el nivel de referencia es el nivel de expresión de Loricrina y/o Ambra-1 en tejido normal. El tejido de referencia se toma adecuadamente de la epidermis normal y el nivel de referencia es un nivel de expresión en los queratinocitos de la epidermis normal. La expresión de Ambra-1 y/o loricrina en el tejido de referencia, por ejemplo, para generar niveles de referencia, se puede determinar utilizando los métodos descritos en este documento.

30 Apropiadamente, la muestra de tejido puede ser una biopsia, o una sección de la misma, obtenida del sujeto. Se puede obtener una muestra de tejido, como una biopsia, a través de una variedad de métodos de muestreo conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen una biopsia por punción, una biopsia por afeitado, una escisión local amplia y otros medios. Apropiadamente, la muestra de tumor se toma de un sitio quirúrgico en el que se ha extirpado el melanoma primario de un sujeto.

35 Apropiadamente, la muestra de tejido puede ser congelada, fresca, fija (por ejemplo, fijada con formalina), centrifugada y/o incrustada (por ejemplo, incrustada en parafina), etc. La muestra de tejido puede ser o haber sido sometida a una variedad de técnicas de almacenamiento y preparación post-recolección bien conocidas (por ejemplo, extracción de ácido nucleico y/o proteína, fijación, almacenamiento, congelación, ultrafiltración, concentración, evaporación, centrifugación, etc.) antes de evaluar la cantidad de Ambra-1 y Loricrina en la muestra. Del mismo modo, las biopsias también pueden someterse a técnicas de preparación y almacenamiento posteriores a la recolección, por ejemplo, la fijación. Una muestra de tejido, o una sección del mismo, puede montarse en un soporte sólido, como una lámina.

40 En algunas realizaciones, la determinación de la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido comprende medir los niveles de cada una de las proteínas presentes en la muestra de tejido. Esto se puede lograr mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos incluyen inmunoensayos, por ejemplo, inmunohistoquímica, ELISA, transferencias de Western, inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE e inmunocitoquímica, y similares.

45 Por lo tanto, en algunas realizaciones, la determinación de los niveles de expresión de Ambra-1 y Loricrina comprende llevar a cabo un ensayo. En algunas realizaciones, el ensayo es un ensayo in vitro.

50 En algunas realizaciones, se identifica que el sujeto tiene un mayor riesgo de metástasis al determinar la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido en un método que comprende:

poner en contacto la muestra de tejido con un primer ligando específico para Ambra-1, en donde la presencia de Ambra-1 crea un complejo Ambra-1-ligando;

55 poner en contacto la muestra de tejido con un segundo ligando específico para Loricrina, en donde la presencia de Loricrina crea un complejo de Loricrina-ligando; y

detectar y/o cuantificar el complejo Ambra-1-ligando y el complejo Loricrina-ligando.

60 En algunas realizaciones, el primer ligando comprende un anticuerpo antiAmbra-1 o aptámero. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiAmbra-1 o aptámero se une específicamente a una proteína que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO. 1.

65 En algunas realizaciones, el segundo ligando comprende un anticuerpo antiLoricrina o aptámero. En algunas realizaciones, el anticuerpo antiLoricrina o aptámero se une específicamente a una proteína que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO. 2.

5 Las secuencias de aminoácidos de Ambra-1 humano y Loricrina se proporcionan en el presente documento como ejemplos, sin embargo, se apreciará que las variantes de estas secuencias pueden ser conocidas o identificadas. En algunas realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano. Por lo tanto, también debe apreciarse que las referencias en este documento a Ambra-1 (o SEQ ID NO. 1) y Loricrina (o SEQ ID NO. 2) incluyen las secuencias de sus homólogos no humanos.

10 En algunas realizaciones, el primer y/o segundo ligando comprende un resto de detección (por ejemplo, una etiqueta fluorescente). Un resto de detección permite la detección directa o indirecta y/o la cuantificación de los complejos formados.

15 En algunas realizaciones, el primer ligando comprende un primer resto de detección y el segundo ligando comprende un segundo resto de detección. El primer resto de detección puede ser el mismo que el segundo resto de detección, o puede ser diferente.

20 En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto una primera porción o sección de la muestra de tejido con el primer ligando, y poner en contacto una segunda porción o sección de la muestra de tejido con el segundo ligando. Esto es particularmente adecuado para realizaciones en las que el primer resto de detección es el mismo que el segundo resto de detección. En algunas realizaciones alternativas, el método comprende poner en contacto la muestra de tejido, o una porción o sección de la misma, con el primer ligando y poner en contacto la misma muestra de tejido, o la porción o sección de la misma, con el segundo ligando. Puede ser posible detectar y/o cuantificar tanto el complejo Ambra-1-ligando como el complejo Loricrina-ligando en la misma muestra, o porción o sección del mismo, particularmente si los primeros y segundos grupos de detección son diferentes.

25 Apropiadamente, el primer y/o segundo ligandos pueden usarse en combinación con uno o más agentes de captura. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la etapa de detectar y/o cuantificar el complejo Ambra-1-ligando y el complejo Loricrina-ligando comprende poner en contacto la(s) muestra(s) de tejido (o la(s) sección(es) o porción(es) del mismo) con al menos un agente de captura. Apropiadamente, se puede usar un primer agente de captura que se une específicamente al primer ligando para detectar y/o cuantificar el complejo Ambra-1-ligando, mientras que se puede usar un segundo agente de captura que se une específicamente al segundo ligando para detectar y/o o cuantificar el complejo loricrina-ligando. Alternativamente, se puede usar un único agente de captura que sea capaz de unirse específicamente tanto al primer como al segundo ligando.

35 En algunas realizaciones, el agente de captura comprende un resto de unión y un resto de detección.

En algunas realizaciones, el resto de unión es un anticuerpo secundario que se une específicamente al primer y/o segundo ligandos. Por ejemplo, el resto de unión puede ser un anticuerpo universal anti-IgG que es capaz de unirse a los anticuerpos primarios utilizados como el primer y segundo ligando.

40 En algunas realizaciones, el método comprende además uno o más pasos de lavado para eliminar el primer y segundo ligandos no unidos y, opcionalmente, los agentes de captura no unidos.

45 En algunas realizaciones particulares, se proporciona un ensayo in vitro para predecir un mayor riesgo de metástasis en un sujeto que padece melanoma, comprendiendo el ensayo:

poner en contacto una primera parte de una muestra de tejido obtenida del sujeto con un primer ligando específico para Ambra 1, en donde la presencia de Ambra-1 crea un complejo Ambra-1-ligando;

50 poner en contacto una segunda porción de la muestra de tejido con un segundo ligando específico para Loricrina, en donde la presencia de Loricrina crea un complejo de Loricrina-ligando;

lavar las porciones primera y segunda de la muestra de tejido para eliminar los ligandos no unidos;

55 poner en contacto la primera y segunda porciones de la muestra de tejido con un agente de captura, en el que el agente de captura comprende un resto de detección y un resto de unión específico para el primer y segundo ligandos;

lavar las porciones primera y segunda de la muestra de tejido para eliminar el agente de captura no unido; y

60 detectar y/o cuantificar el agente de captura presente en la primera y segunda porciones de la muestra de tejido.

Apropiadamente, un resto de detección adecuado se selecciona de un resto fluorescente, un resto luminiscente, un resto bioluminiscente, un material radiactivo, un resto colorimétrico, una nanopartícula que tiene propiedades detectables adecuadas, un resto cromogénico, biotina o una enzima.

65 Los restos fluorescentes adecuados incluyen proteínas fluorescentes (como la ficoeritrina (PE), complejo de proteína peridina-clorofila (PerCP) y alofocianina (APC)) colorantes fluorescentes (como isotiocianato de fluoresceína (FITC),

- 5 rodaminas (Rs) y cianinas (Cys)), complejos fluorescentes en tándem (como Aloficocianina-Cianina 7 (APC-Cy7), complejo Peridina-Chlorofila-Proteína-Cianina 5 (PerCP-cy5) y ficoeritrina-Texas Red (PE-TexasRed)) y nanocristales (como QDot 525), QDot 545 y QDot 625). La presencia de complejos Ambra-1-ligando y Loricrina-ligando puede detectarse utilizando microscopía de fluorescencia mediante el uso de ligandos fluorescentes o un agente de captura que comprende un resto de detección fluorescente.
- 10 En aspectos de la divulgación en donde el resto de detección comprende una enzima, la presencia del complejo Ambra-1-ligando y el complejo Loricrina-ligando se puede detectar y/o cuantificar detectando y/o cuantificando el producto de reacción de una reacción de un sustrato catalizado por la enzima. En estos aspectos, el método comprende además añadir un sustrato de la enzima y detectar y/o cuantificar el producto de la reacción realizada en el sustrato por la enzima. Por ejemplo, la reacción puede dar como resultado la producción de un precipitado coloreado, que se detectaría mediante microscopía óptica. Las enzimas adecuadas incluyen, por ejemplo, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante. Un sustrato cromogénico de la fosfatasa alcalina es PNPP (fosfato de p-nitrofenilo, sal disódica). PNPP produce un producto de reacción amarillo soluble en agua que absorbe luz a 405 nm. Los sustratos cromogénicos de la peroxidasa de rábano picante incluyen ABTS (2,2'-Azinobis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]-sal de diamonio), que produce un producto de reacción verde, OPD (dihidrocloruro de o-fenilendiamina) que produce un producto de reacción amarillo-naranja, y sustratos solubles de TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) producen un color azul al detectar HRP. Los expertos en la técnica conocerán otras combinaciones adecuadas de enzima-sustrato, métodos para detectar el ligando Ambra-1 y los complejos loricrina-ligando, y los restos de detección adecuados.
- 20 En algunos aspectos de la divulgación, el primer y/o segundo ligando o el agente de captura se inmovilizan en una superficie de fase sólida, por ejemplo, una micromatriz, portaobjetos, pozo o perla.
- 25 En algunas realizaciones, la expresión de Ambra-1 y Loricrina se detecta y/o cuantifica por evaluación visual, por ejemplo, microscopía. En otros aspectos, la expresión de Ambra-1 y Loricrina se detecta y/o cuantifica mediante un escáner de láminas automatizadas.
- 30 También se proporciona aquí un kit para predecir un mayor riesgo de desarrollar metástasis de un sujeto que padece melanoma, el kit comprende:
- un primer ligando específico para Ambra-1; y
 - un segundo ligando específico para loricrina.
- 35 En algunos aspectos de la divulgación, el kit comprende además instrucciones para usar el kit para predecir el riesgo de metástasis en un sujeto que padece melanoma.
- 40 En algunos aspectos de la divulgación, el kit comprende además al menos un agente de captura. Apropiadamente, un agente de captura puede comprender un resto de detección y un resto de unión específico para el primer y/o segundo ligando.
- 45 En algunos aspectos de la divulgación, el primer y/o segundo ligando y/o el agente de captura comprenden una enzima como un resto de detección, y el kit comprende además un sustrato de la enzima.
- 50 Apropiadamente, el kit puede comprender además uno o más componentes adicionales tales como reactivos y/o aparatos necesarios para llevar a cabo un ensayo in vitro, por ejemplo, tampones, fijadores, soluciones de lavado, reactivos de bloqueo, diluyentes, cromógenos, enzimas, sustratos, tubos de ensayo, placas, pipetas, etc.
- 55 El kit divulgado en este documento puede ventajosamente usarse para llevar a cabo un método de la invención y podría emplearse en una variedad de aplicaciones, por ejemplo, en el campo de diagnóstico o como herramienta de investigación. Se apreciará que las partes del kit se pueden empaquetar individualmente en viales o en combinación en contenedores o unidades de múltiples contenedores. Apropiadamente, la fabricación del kit sigue los procedimientos estándar que conoce el experto en la materia.
- 60 En algunas realizaciones, se administra un agente terapéutico al sujeto no más de 12 semanas, no más de 10 semanas, no más de 6 semanas, no más de 4 semanas, no más de 2 semanas o no más de 1 semana después de que el sujeto se identifica por tener una disminución o pérdida de la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido.
- 65 En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico. Cualquier agente quimioterapéutico adecuado disponible puede administrarse al sujeto. Como se usa en este documento, un "agente quimioterapéutico" significa cualquier agente terapéutico útil para el tratamiento del cáncer, y abarca moléculas pequeñas, así como agentes biológicos, tales como anticuerpos. En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico se selecciona de Dacarbazina (DTIC), Temozolomida, Nab-paclitaxel, Paclitaxel, Carmustina (BCNU), Cisplatino, Carboplatino, Vinblastina, interleucina 2, interferón alfa, anticuerpos (por ejemplo, ipilimumab, anticuerpo anti-PD1) e inhibidores de B-Raf (por ejemplo, vemurafenib, dabrafenib).

Las vías de administración no limitantes del agente terapéutico incluyen administración oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal o intrabronquial (por ejemplo, como se efectúa por inhalación). En algunas realizaciones, el agente terapéutico se administra por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa. Los modos comunes de administración mediante los cuales se puede administrar el agente terapéutico incluyen, por ejemplo, la administración como una dosis de bolo o como una infusión durante un período de tiempo establecido.

Se puede administrar un agente terapéutico en una cantidad eficaz para prevenir, inhibir o retrasar el desarrollo de metástasis.

Las dosis adecuadas y los regímenes de dosificación para un sujeto dado y un agente terapéutico se pueden determinar utilizando una variedad de métodos diferentes, como el área de la superficie corporal o el peso corporal, o de acuerdo con la literatura especializada y/o los protocolos hospitalarios individuales. Las dosis pueden ajustarse aún más después de considerar el recuento de neutrófilos del sujeto, la función renal y hepática y el historial de cualquier efecto adverso previo al agente terapéutico. Las dosis también pueden diferir dependiendo de si un agente terapéutico se usa solo o en combinación.

El experto en la materia reconocerá que el médico tratante puede determinar otros modos de administración, dosis de agentes terapéuticos y regímenes de tratamiento de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica.

Se describe aquí un método para determinar un régimen de tratamiento para un sujeto que padece melanoma, comprendiendo el método:

a) obtener una muestra de tejido del sujeto, en el que la muestra de tejido comprende tejido que cubre un melanoma primario;

b) determinar la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido;

c) comparar la expresión obtenida en (b) con un tejido de referencia o los niveles obtenidos a partir del mismo, y

d) (i) si la expresión de Ambra-1 y Loricrina es normal o está en aumento, siguiendo una ruta de atención normal reconocida, o (ii) si la expresión de Ambra-1 y Loricrina disminuye o se pierde, tratando al sujeto con un régimen de tratamiento sistémico contra el cáncer.

Una "vía de atención reconocida normal", como será conocida por los expertos en la técnica, se entenderá que significa que se realiza una extirpación más amplia de la cicatriz dejada por la escisión del melanoma primario en el sujeto. El tamaño de la escisión más amplia será determinado por un médico o cirujano, según la profundidad de Breslow del melanoma primario. Una ruta normal de atención reconocida puede comprender además una evaluación clínica regular (por ejemplo, cada 3-12 meses) del sujeto hasta por 5 años. En algunas realizaciones en las que el melanoma primario está en etapa 2b o 2c, la vía normal de atención reconocida puede comprender además realizar una exploración por CT de representación en el sujeto, desde la cabeza hasta la pelvis, en el momento del diagnóstico. Algunos centros de tratamiento ofrecen una biopsia de ganglio linfático centinela de todos los tumores en etapa 2a, 2b y 2c. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la vía de atención normal reconocida puede comprender además la realización de una biopsia de ganglio linfático centinela.

En algunos aspectos, un régimen de tratamiento sistémico contra el cáncer comprende administrar un agente terapéutico al sujeto.

Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan un agente terapéutico para uso en el tratamiento de un sujeto que padece melanoma, en donde dicho sujeto se ha identificado por tener un riesgo creciente de metástasis de acuerdo con el método de la invención.

Idealmente, un sujeto identificado con un mayor riesgo de metástasis se trata lo antes posible para minimizar las posibilidades de desarrollo de metástasis. Por lo tanto, el agente terapéutico para uso en el tratamiento de melanoma en un sujeto es capaz de prevenir, inhibir o retrasar la metástasis del melanoma en el sujeto.

En algunas realizaciones, un sujeto es tratado inmediatamente o poco después de ser identificado por tener un mayor riesgo de metástasis.

En algunas realizaciones, el tratamiento con el agente terapéutico se lleva a cabo después de la cirugía para extirpar el melanoma primario.

En algunas realizaciones, un método de tratamiento o un régimen de tratamiento puede incluir además uno o más de: imágenes intensificadas (por ejemplo, Tomografía computarizada, PET, IRM, rayos X) del sujeto; discusión y/u ofrecimiento o realización de una biopsia de ganglio linfático centinela; Linfadenectomía parcial o completa; inclusión del sujeto en ensayos clínicos; y radioterapia.

Descripción detallada de ciertas realizaciones

Las realizaciones de la invención se describirán ahora solo a modo de ejemplo, y con referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 5 Las figuras 1A-1D son imágenes de microscopía de luz que muestran la expresión de Ambra-1 en la epidermis normal (Figura 1A) y la epidermis peritumoral (Figuras 1B-1D) que recubren los melanomas AJCC en etapa I. Barras de escala: 50 μ m.
- 10 Las figuras 2A-2C son imágenes de microscopía inmunofluorescente que muestran la expresión de Loricrina en la epidermis normal (Figura 2A), y la epidermis peritumoral (Figura 2B-2C) que cubre los melanomas AJCC en etapa I. Barras de escala: 50 μ m).
- 15 La figura 3A muestra un análisis univariado de la expresión epidérmica Ambra-1 en todos los melanomas en etapa AJCC. Curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta la detección de la primera metástasis) en epidermis de melanoma primario sin alteración en la expresión de Ambra-1 (línea superior), expresión de Ambra-1 disminuida o ausente (línea discontinua) o tumores ulcerados (línea de fondo). Prueba de Log-Rand (Mantel-Cox) $P < 0.0001$. DFS = 100% sin pérdida de Ambra-1, 72.1% Ambra-1, disminuido o ausente 35.7% ulcerado. Análisis directo de Ambra-1 sin pérdida y Ambra-1 Log-Rank disminuido/ausente (Mantel-Cox) Prueba $P = 0.0270$, HR 3.56 (95% CI 1.16-10.93);
- 20 La figura 3B muestra un análisis multivariado de la expresión de Ambra-1 en una cohorte piloto de melanomas en etapa 1 de AJCC. Curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta que se detectó la primera metástasis) en epidermis primarias de melanoma en etapa 1 AJCC que no revelaron alteración en la expresión de Ambra-1 (línea superior) en comparación con tumores en etapa 1 con Ambra-1 epidérmico ausente (línea de fondo). DFS = 100% sin pérdida de Ambra-1, 83.3% de Ambra-1 disminuido o ausente. Prueba de Log-Rand (Mantel-Cox) $P = 0.0575$, HR 4.29 (95% CI 0.95-19.25);
- 25 La figura 4A es una curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta la primera metástasis detectada) en epidermis en las que se mantuvo la expresión de Ambra-1 (línea superior) en comparación con aquellas en las que se perdió la expresión de Ambra-1 (línea inferior), en todos los tipos de tumores. $P = 0.0007$, HR 10.1 (95% CI 2.65-38.5);
- 30 La figura 4B es una curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta la primera metástasis detectada) en epidermis en las que se mantuvo la expresión de loricrina (línea superior) en comparación con aquellas en las que se perdió la expresión de loricrina (línea inferior), en todos los tipos de tumores $P = 0.0006$, HR 18.4 (95% CI 3.5-96.2);
- 35 La figura 4C es una curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta que se detecta la primera metástasis) en epidermis en las que se mantuvo la expresión tanto de Ambra-1 como de Loricrina (línea superior) en comparación con aquellas en las que la expresión de Ambra-1 y Loricrina se perdió (línea inferior), en todos los tipos de tumores. $P = < 0.0001$, HR 39.6 (95% CI 6.4-243.9);
- 40 La figura 5A es una curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta la detección de la primera metástasis) en epidermis primarias de melanoma en etapa 1 de AJCC en las que se mantuvo la expresión de Ambra-1 (línea superior) en comparación con aquellas en las que se perdió la expresión de Ambra-1 (línea inferior). $P = 0.001$, HR 24.12 (95% CI 3.6-161);
- 45 La figura 5B es una curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta la detección de la primera metástasis) en epidermis de melanoma primario en el AJCC etapa 1 en las que se mantuvo la expresión de loricrina (línea superior) en comparación con aquellas en las que se perdió la expresión de loricrina (línea inferior). $P < 0.0001$, HR 210 (95% CI 16.86-2624);
- 50 La figura 5C es una curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta que se detectó la primera metástasis) en epidermis de melanoma primario en el AJCC en etapa 1 en las que se mantuvo la expresión tanto de Ambra-1 como de Loricrina (línea superior) en comparación con aquellas en las que se perdió la expresión de Ambra-1 y Loricrina (línea inferior). $P = 0.0002$, HR 93.5 (95% CI 8.67-1008);
- 55 La figura 6 muestra la secuencia de aminoácidos de Ambra-1 de Homo sapiens del UniProtKB (número de acceso primario Q9C0C7-1, isoforma 1) (SEQ ID NO. 1); y
- 60 La figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos de la Loricrina de Homo sapiens de UniProtKB (número de acceso primario P23490) (SEQ ID NO. 2).

La figura 8 muestra una gama de imágenes de microscopía de expresión de Ambra-1 (anticuerpo antiAmbra-1 (Abcam Biochemicals, Cambridge, Reino Unido; 69501; 1:200)) en la epidermis normal (a), o melanomas de la etapa 1 suprayacentes (b). Ambra-1 mantenido, (c). Ambra-1 disminuyó y (d) Ambra-1 se perdió por completo).

5 La figura 9 muestra una gama de imágenes de microscopía de expresión de loricrina (anticuerpo antiLoricrina (Abcam Biochemicals, Cambridge, Reino Unido; 24722; 1:500)) en la epidermis normal (a), o melanomas de etapa 1 suprayacentes (b) mantenida por Loricrina, (c) Loricrina se perdió completamente.

10 La figura 10 muestra la asociación entre la puntuación visual dada al cambio de Ambra-1 peritumoral (sin pérdida, alguna pérdida o pérdida completa) en comparación con los resultados del análisis cuantitativo de la disminución porcentual de la positividad de la tinción en la epidermis normal en comparación con la periepidermis tumoral. Las líneas horizontales representan el porcentaje de puntuación medio \pm error estándar de la media (0 = 12.05, 1 = 25.16, 3 = 46.92). ANOVA de una vía <0.0001 ****;

15 la figura 11 muestra la asociación entre la puntuación visual dada al cambio de Ambra-1 peritumoral con o ninguna pérdida de tinción en comparación con la pérdida completa de tinción. Las líneas horizontales representan el porcentaje medio de puntuación \pm desviación estándar (no/cierta pérdida de media = 18.12 DE 12.97, media de pérdida completa = 46.92 DE 15.34). Mann-Whitney P <0.0001 ****

20 La figura 12 muestra un análisis univariado de la expresión de Ambra-1 epidérmica en todos los melanomas en AJCC en etapa 1. Curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta la detección de la primera metástasis) en epidermis con melanoma primario sin pérdida o expresión reducida de Ambra-1 (línea negra), versus expresión ausente de Ambra-1 (línea roja). DFS = 97.7% sin pérdida/disminución de Ambra-1 (n=44), 94.3% de ausencia de Ambra-1 (n=35). Prueba de Log-Rank (Mantel-Cox) P = 0.411, HR 2.59 (95% CI 0.26-25.05).

25 La figura 13 muestra el análisis univariado de la expresión combinada de Ambra-1 y Loricrina epidérmico en todos los melanomas AJCC en etapa 1. Curva de Kaplan-Meier que muestra 7 años de supervivencia sin enfermedad (meses hasta la detección de la primera metástasis) en el mantenimiento de epidermis con melanoma primario de cierta expresión epidérmica de Ambra-1 o Loricrina (línea negra de "bajo riesgo"), versus pérdida de expresión epidérmica de Ambra-1 y loricrina (línea roja de "alto riesgo"). DFS = 98.46% Riesgo bajo (n=65), 86.67% Riesgo alto (n = 15). Prueba de Log-Rank (Mantel-Cox) P = 0.025, HR 9.29 (95% CI 1.49-558.0).

Los detalles adicionales de ciertas realizaciones de la invención se proporcionan a continuación.

35 Definiciones

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos biespecíficos, conjugados de anticuerpo-fármaco y dominios y fragmentos de anticuerpos que incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multimeros de los mismos. Los anticuerpos pueden fragmentarse utilizando técnicas convencionales. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo aves y mamíferos (por ejemplo, humanos, murinos, burros, ovejas, conejos, cabras, conejillos de india, camellos, caballos o pollos), animales transgénicos o de fuentes recombinantes. Los anticuerpos pueden prepararse usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

45 Como se usa en este documento, el término "melanoma primario" se refiere a un tumor maligno en la piel en el lugar de origen, independientemente del grosor, en pacientes sin evidencia clínica o histológica de enfermedad metastásica regional o distante.

50 Tal como se usa en el presente documento, la frase "tejido que cubre un melanoma primario" se refiere al tejido epidérmico situado entre un melanoma primario y la superficie de la piel.

55 Como se usa en el presente documento, el término "tejido normal" incluye, por ejemplo, "epidermis normal", que es epidermis sana (es decir, libre de enfermedad). En algunas realizaciones, el tejido normal es una epidermis que se encuentra adyacente al melanoma primario, por ejemplo, dentro de un brazaletes de piel normal que se toma con la muestra de melanoma primario.

60 Como se usa en el presente documento, "epidermis peritumoral" se refiere al tejido epidérmico que se encuentra sobre o alrededor de un tumor.

65 Como se usa aquí en, la "metástasis" se define como la recurrencia o progresión de la enfermedad que puede ocurrir localmente (como la recurrencia local y la enfermedad en tránsito), regional (como la micrometástasis nodal o macrometástasis), o distalmente (como el cerebro, pulmón y otros tejidos). En algunas realizaciones, el término "metástasis" se usa para referirse a la enfermedad metastásica después de un melanoma primario. Por lo general, la metástasis que se origina a partir de un melanoma primario puede diseminarse a los pulmones y/o al cerebro del sujeto, así como a otras ubicaciones.

5 Debe entenderse que el término “comparar” y “compara” como se usa en el presente documento generalmente se refiere a una comparación de parámetros o niveles correspondientes, por ejemplo, una cantidad absoluta se compara con una cantidad de referencia absoluta, mientras que una concentración se compara con una concentración de referencia o una señal de intensidad de señal obtenida de la muestra de tejido se compara con el mismo tipo de intensidad de señal obtenida de la referencia. La comparación puede realizarse manualmente, por ejemplo, mediante una evaluación visual, o puede ser automatizada (por ejemplo, utilizando un escáner automatizado o asistida por ordenador). Por lo tanto, la comparación puede llevarse a cabo por un dispositivo informático.

10 La etapa de un melanoma es una descripción de cuán extendida está. Esto incluye su grosor en la piel, ya sea que se haya diseminado a los ganglios linfáticos cercanos o a cualquier otro órgano, y ciertos otros factores. La etapa se basa en los resultados del examen físico, las biopsias y cualquier prueba de imagen (CT o exploración MRI, etc.) u otras pruebas que se hayan realizado. Tales pruebas serán conocidas por los expertos en la técnica. El sistema que se usa con más frecuencia para clasificar el melanoma es el sistema TNM de la American Joint Commission on Cancer (AJCC). La tabla 15 1 describe las características que identifican cada etapa.

Tabla 1

Etapa 1	
Tumor 1a	Tumor <1.00 mm sin ulceración; sin compromiso de los ganglios linfáticos, sin metástasis distantes
Tumor 1b	<1.00 mm con ulceración; o tumor nivel IV o V de Clark 1.01-2.0 mm sin ulceración; sin afectación de los ganglios linfáticos; sin metástasis distante
Etapa 2	
Tumor 2a	1.01 – 2.0 mm con ulceración; tumor 2.01 -4.0 mm sin ulceración; sin compromiso de los ganglios linfáticos; No hay metástasis distante.
Tumor 2b	2.01 - 4 mm con ulceración.
Tumor 2b	> 4.0 mm sin ulceración; sin compromiso de los ganglios linfáticos; No hay metástasis distante.
Tumor 2c	> 4.0 mm con ulceración; sin implicación nodal; No hay metástasis distante.
Etapa 3	
3a	Tumor de cualquier grosor sin ulceración con 1 ganglio linfático positivo y micrometástasis o macrometástasis.
3b	Tumor de cualquier grosor sin ulceración con 2-3 ganglios linfáticos positivos y micrometástasis o macrometástasis.
3c	Tumor de cualquier grosor y macrometástasis O met(s)/satélite(s) en tránsito sin ganglios linfáticos metastásicos, O 4 o más ganglios linfáticos metastásicos, ganglios enmarañados o combinaciones de met(s)/satélite(s) en tránsito O melanoma ulcerado y ganglios linfáticos metastásicos.
Etapa 4	
4	Tumor de espesor anv con nodos anv y cualquier metástasis

20 **EJEMPLOS**

Materiales y métodos

Ejemplo 1

25

Inmunohistoquímica para Ambra-1 y Loricrina

30 El análisis del tejido del melanoma primario de la cohorte de pacientes que se muestra en la Tabla 2 se realizó mediante tinción inmunohistoquímica de secciones incluidas en parafina fijadas con formalina. Secciones de tejido de 5 a 6 µm de grosor se cocieron en portaobjetos de microscopio X-tra (Leica Microsystems, Milton Keynes, Reino Unido) a 56°C durante la noche. Luego se incubaron en Histoclear (AGTC Bioproducts, Hessle, Reino Unido) durante 20 minutos antes de la rehidratación en 100%, 75%, 50% de etanol y luego en agua destilada durante 5 segundos cada uno. La recuperación del

antígeno se realizó mediante calentamiento por microondas en tampones de recuperación de antígeno precalentado (Ambra-1 (Tris-HCl 10 mM (pH 7.6)), Loricrina (Citrato de Na 10 mM (pH 6.0)) durante 12 minutos antes de dejar que se enfríe durante 20 minutos. Se dejó secar cada sección y se aisló el tejido con una pluma hidrófoba ImmEdge (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EE. UU.). Las secciones luego se incubaron con PBS/Tween al 0.05% (PBS/T) durante 3 minutos para permitir la rehidratación antes de la incubación con 0.2% de Triton X-100 (Sigma, St. Louis, EE. UU.). En PBS/T durante 10 minutos. Después del lavado con PBS/T, las secciones se incubaron en H₂O al 3% en agua durante 10 minutos para bloquear peroxidasa endógena. La Avidina endógena se bloqueó con la solución de Avidina de un kit de Bloqueo de Avidina/Biotina (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EE. UU.) durante 15 minutos, antes de seguir lavando con PBS/T y la incubación con la porción de Biotina del kit durante 15 minutos, con un siguiente lavado PBS/T. El bloqueo de proteínas se realizó incubando secciones en suero de bloqueo al 2% de un kit Vectastain Elite específico para animales (Vector Laboratories Inc., Burlingame, EE. UU.).

Después de un lavado adicional de PBS/T, las secciones se incubaron con anticuerpo primario durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo antiAmbra-1 (Abcam Biochemicals, Cambridge, Reino Unido; 69501; 1:200) o anticuerpo antiLoricrina (Abcam Biochemicals, Cambridge, Reino Unido; 24722; 1:500). Después de 3 lavados con PBS/T, se detectó anticuerpo primario con anticuerpo secundario biotinilado específico del animal durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de 3 lavados más con PBS/T. La tinción se realizó a través de la incubación durante 30 minutos con los reactivos ABC del kit Vectastain Elite (premezclado 30 minutos antes de su uso), seguido de 3 lavados con PBS/T y luego una incubación de 10 minutos con solución VIP (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Estados Unidos). Los portaobjetos se enjuagaron en agua del grifo durante 5 minutos antes de teñir con hematoxilina (Sigma Diagnostics, St. Louis, EE. UU.) durante 2 minutos, seguido de un lavado final de 10 minutos en agua del grifo con cambios frecuentes. Después de la deshidratación a través de etanol al 75% y al 100% durante 5 segundos, las secciones se limpiaron durante 2 minutos en histoclear, se dejaron secar y luego se montaron los cubreobjetos con montaje DPX (VWR International Ltd., Poole, Reino Unido).

25 Determinación de la expresión

La diferencia en los niveles de expresión de Ambra-1 y/o Loricrina entre la epidermis normal y la epidermis peritumoral se determinó inicialmente por acuerdo de consenso de 3 Dermatólogos y un Histopatólogo. La expresión se cuantificó evaluando el porcentaje de células teñidas positivamente en el peritumoral como un porcentaje de la expresión Ambra-1/loricrina determinada en la referencia de control interno de la epidermis normal adyacente utilizando el software de análisis de imágenes Leica QWin (Leica Microsystems). Estas observaciones se clasificaron como "mantenidas" (>75% de la expresión normal), "disminuidas" (25-75% de la expresión normal) o "perdidas" (<25% de la expresión normal). La evaluación de cada sección se realizó sin conocimiento previo del resultado final de la enfermedad.

35

Tabla 2: Grupo de pacientes

Número de pacientes	129
Macho:hembra	66:62
Edad media en el momento del diagnóstico (rango)	58 (17-87)
Etapa AJCC en el momento del diagnóstico.	
1a	40
1b	36
2a	22
2b	18
2c	12
Etapa eventual AJCC (8 años de seguimiento)	
1a	38
1b	27
2a	12
2b	7

2c	4
3	15
4	25
Profundidad media de Breslow (rango)	1.55 mm (0.3-15)
Tumores primarios ulcerados	28

Estadística

5 Todos los análisis estadísticos y la generación de imágenes se realizaron utilizando el software de análisis estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad Software; San Diego, EE. UU.).

10 Todos los análisis univariados y multivariados de las variables de estudio para la supervivencia sin enfermedad se realizaron utilizando las construcciones de la curva de Kaplan-Meier en comparación con el seguimiento de 8 años, así como el análisis log-rank (Mantel-Cox) de los datos comparativos.

Ejemplo 1

Resultados y discusión

15 Los presentes inventores identificaron que una disminución de la expresión de Ambra-1 en la epidermis peritumoral que cubre los melanomas, en particular en los melanomas AJCC en etapa I, se correlaciona significativamente con la disminución de la supervivencia libre de enfermedad durante 7 años. Como se muestra en la figura. 1A, la expresión de Ambra-1 se incrementa desde la capa basal hacia el estrato córneo en la epidermis normal situada adyacente a un melanoma AJCC en etapa 1 compatible con la diferenciación mantenida. Sin embargo, la expresión de Ambra-1 se mantiene (figura 1B), disminuye (figura. 1C) o incluso se pierde (FIG. 1D) en la epidermis que cubre un rango de tumores AJCC en etapa 1.

25 Haciendo referencia a la fig. 3, la pérdida o disminución de la expresión de Ambra-1 epidérmica se correlaciona con un mayor riesgo de metástasis. A lo largo de todos los melanomas AJCC (Figura 3A), el 100% de los pacientes que no mostraron pérdida de la expresión de Ambra-1 estaban libres de enfermedad después de 7 años. Esto disminuyó a 72.1% en pacientes con expresión disminuida o ausente de Ambra-1. Solo el 35.7% de los pacientes con melanomas ulcerados estaban libres de enfermedad después de 7 años. Esto destaca un aumento gradual en el riesgo de enfermedad con la pérdida de Ambra-1 y la ulceración franca asociada eventual del tumor.

30 Tomando solo melanomas AJCC en etapa 1 (Figura 3B), el porcentaje de pacientes que no tenían enfermedad después de 7 años fue del 100% para aquellos sin pérdida de expresión de Ambra-1, reducido a 83.3% para aquellos con expresión de Ambra-1 disminuido o ausente.

35 Las figuras 4A y 5A muestran la correlación entre la expresión de Ambra-1 y la supervivencia sin enfermedad de los sujetos en un grupo más pequeño en el que se evaluaron tanto la expresión de Ambra-1 como la de loricrina, durante 7 años para todos los tipos de tumores (Figura 4A) o solo en la etapa 1 (Figura 5A). En todos los tipos de tumores (Figura 4A), todos los pacientes en los que se mantuvo la expresión de Ambra-1 estaban libres de enfermedad después de 7 años. Para aquellos en los que se perdió la expresión de Ambra-1, solo el 18% estaba libre de enfermedad después de 7 años. Para los tumores en etapa 1, nuevamente el 100% de los pacientes con expresión sostenida de Ambra-1 no desarrollaron metástasis, mientras que la tasa de supervivencia libre de enfermedad fue del 17% para aquellos con pérdida de la expresión de Ambra-1.

45 Contrariamente a las publicaciones actuales en la técnica que implican a Ambra-1 en el control de la autofagia, se cree que el rol de Ambra-1 en este contexto es la regulación a la baja de la diferenciación con la epidermis normal que resulta en una pérdida de integridad. Los inventores han demostrado que la regulación negativa de otras proteínas de autofagia, como ATG1, no afecta el proceso de diferenciación, lo que respalda la hipótesis de que este proceso no está relacionado con la autofagia.

50 Inesperadamente, se encontró que una pérdida de expresión de Loricrina también se correlaciona con un mayor riesgo de metástasis. Las figuras 2A-C muestran imágenes representativas de la expresión normal de loricrina en el estrato córneo (figura 2A), así como en la epidermis peritumoral en la que se pierde la expresión de loricrina (figura 2B) o se mantiene (figura 2C).

55 Haciendo referencia a la fig. 4B y 5B, la pérdida o disminución de la expresión epidérmica de Loricrina se correlaciona con una disminución de la supervivencia libre de enfermedad durante 7 años. En todos los melanomas AJCC (Figura 4B), el 64% de los pacientes en los que se mantuvo la expresión de Loricrina no tenían enfermedad después de 7 años. Sin

embargo, ningún paciente con pérdida de expresión de Loricrina estuvo libre de enfermedad después de 5 años. Para los melanomas AJCC en etapa 1 (Figura 5B), el 100% de los pacientes en los que se mantuvo la expresión de loricrina estaban libres de enfermedad después de 7 años. Ningún paciente con pérdida de expresión de Loricrina estuvo libre de enfermedad después de 5 años. Esto demuestra una correlación estadísticamente significativa entre la expresión de Loricrina y las tasas de supervivencia sin enfermedad en pacientes con melanoma. Sin embargo, al igual que con Ambra-1, la pérdida de Loricrina sola no es predictiva de la progresión de la enfermedad con una precisión del 100%, ya sea para el melanoma AJCC en etapa 1 o para todas las etapas tumorales (consulte la Tabla 3).

Sin embargo, los inventores han determinado que la determinación de la expresión tanto de Ambra-1 como de Loricrina es fuertemente representativa de la progresión de la enfermedad a la metástasis. Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figs. 4C y 5C, y se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3

Marcador	Sensibilidad	Especificidad	PPV ¹	NPV ²
Todas las etapas del tumor n=15				
Pérdida de Ambra-1	100%	80%	83.3%	100%
Pérdida de Loricrina	63.6%	100%	100%	69.2%
Pérdida de Ambra-1 + Loricrina	100%	100%	100%	100%
Melanoma en etapa 1 n=12				
Pérdida de Ambra-1	100%	88.9%	83.3%	100%
Pérdida de Loricrina	80%	100%	100%	90%
Pérdida de Ambra-1 + Loricrina	100%	100%	100%	100%
¹ valor predictivo positivo				
² valor predictivo negativo				

Por lo tanto, se encontró que la combinación de pérdida de Ambra-1 y pérdida de Loricrina identifica con 100% de precisión a los pacientes que desarrollaron metástasis.

Ejemplo 2

Se llevaron a cabo análisis adicionales en 80 muestras retrospectivas de pacientes con melanoma AJCC en etapa 1 reclutados en un grupo independiente de melanoma del Hospital Universitario James Cook (Tabla 4). El análisis revela datos en consonancia con los hallazgos en el grupo retrospectivo inicial detallado anteriormente.

Tabla 4

Número de pacientes	80
Macho:hembra	27:53
Etapa AJCC en el momento del diagnóstico.	
1a	54
1b	26
Etapa eventual AJCC (7 años de seguimiento)	
1a	53
1b	24

4	3
Profundidad media de Breslow (rango)	0.83 mm (0.14 - 1.9)

La tinción inmunohistoquímica se realizó utilizando una contratinción DAB como la tinción especializada más utilizada en el uso clínico. De todas las muestras se tomaron imágenes digitalmente mediante escaneo automático de láminas en un escáner digital de láminas Leica SCN400 (Leica Biosystems) dentro del Biobanco de la Universidad de Newcastle (figuras 8 y 9).

El análisis visual de la pérdida de Ambra-1 epidérmico fue realizado por dos dermatólogos independientes y las puntuaciones asignadas para cada lámina se basaron en el grado de pérdida de Ambra-1 epidérmico en la epidermis peritumoral en comparación con la epidermis normal dentro de la misma sección. Hubo una concordancia del 95% en los puntajes entre dermatólogos, y una revisión adicional de estas láminas dio como resultado un puntaje acordado para cada uno.

Del mismo modo, los mismos dos dermatólogos realizaron un análisis visual de la pérdida de Loricrina epidérmica de forma independiente. Cualquier interrupción en la continuidad de la tinción de loricrina en la epidermis peritumoral que no se debió a la invasión directa del tumor de la epidermis superior se calificó como pérdida de loricrina. La concordancia fue de 97.5% con el acuerdo alcanzado para todas las muestras.

El análisis cuantitativo de Ambra-1 epidérmico se realizó utilizando el software de análisis previamente validado Leica Slidepath Systems. Se seleccionaron cinco áreas representativas de la epidermis normal a 200 aumentos y se obtuvo el porcentaje medio de píxeles DAB positivos. Esto se comparó con el porcentaje medio de píxeles positivos para DAB en diez áreas representativas de la epidermis peritumoral con un aumento de $\times 200$. A continuación, se calculó el porcentaje de disminución general en la expresión de Ambra-1 entre la expresión peritumoral y la de la epidermis normal.

La comparación de las puntuaciones visuales y cuantitativas (figura 10) revela un aumento gradual estadísticamente significativo ($P < 0.0001$) en la puntuación cuantitativa con la disminución del Ambra-1 peritumoral según se analiza visualmente. Esto valida la puntuación visual como un método robusto y confiable para analizar la tinción epidérmica Ambra-1.

Para determinar un punto de corte para el análisis de supervivencia, se volvieron a analizar las puntuaciones visuales y cuantitativas sin o alguna pérdida de Ambra-1 peritumoral en comparación con la pérdida completa (figura 11). Esto muestra un aumento estadísticamente significativo en la puntuación cualitativa en las muestras con puntuación visual que tienen una pérdida completa de Ambra-1 ($P < 0.0001$). Esto valida aún más la idoneidad de la puntuación visual para identificar muestras con pérdida completa de Ambra-1 peritumoral, y una desviación estándar por debajo de la media para la pérdida completa de Ambra-1 (46.92 media DE 15.34) proporciona un corte apropiado del 30% para determinar el análisis cualitativo adicional de la pérdida de Ambra-1.

El análisis univariado de la pérdida de Ambra-1 peritumoral en todos los pacientes no reveló una diferencia general en la supervivencia sin enfermedad entre "Alto riesgo" (tumores con pérdida completa de Ambra-1 peritumoral determinada por una disminución cualitativa en la expresión de $>30\%$) y tumores de "bajo riesgo" (disminución de la expresión cualitativa $<30\%$) (figura 5). DFS = 97.7% Tumores de riesgo bajo ($n = 44$), 94,3% Tumores de riesgo alto ($n=35$). Prueba de Log-Rank (Mantel-Cox) $P = 0.411$, HR 2.59 (95% CI 0.26-25.05). Estos resultados no son compatibles con Ambra-1 como biomarcador pronóstico en este subconjunto de pacientes.

Para evaluar la validez de la combinación de Ambra-1 epidérmico y la expresión de Loricrina como un biomarcador pronóstico, se realizó un análisis univariado en todas las muestras. Se determinó que las muestras de "alto riesgo" tenían una pérdida Ambra-1 peritumoral completa ($>30\%$ de disminución cuantitativa) y una pérdida de loricrina. Todos los demás tumores, con pérdida de Ambra-1 O Loricrina, se consideraron de "bajo riesgo". Estos resultados mostraron un riesgo estadísticamente significativo de metástasis en el grupo de tumores de riesgo alto, aunque el número total de eventos metastásicos fue bajo; Reforzando aún más la utilidad de la combinación de Ambra-1 y Loricrina como biomarcador de pronóstico combinado en la enfermedad en etapa 1 AJCC. DFS = 98.46% Riesgo bajo ($n=65$), 86.67% Riesgo alto ($n=15$). Prueba de Log-Rank (Mantel-Cox) $P = 0.025$, HR 9.29 (95% CI 1.49-558.0).

Tabla 5

Marcador (n=80)	Sensibilidad	Especificidad	PPV	NPV
Pérdida de Ambra	67%	57%	6%	97.7%
Perdida de Loricrina	67%	70%	8%	98.1%
Pérdida combinada de ambra y loricrina.	67%	83%	13%	98.4%

5 El análisis final del biomarcador combinado Ambra-1/Loricrina destaca la especificidad incrementada (83%), los valores predictivos positivos y negativos (13% y 98.4% respectivamente) de Ambra-1/Loricrina combinados por encima y por encima de Ambra-1 o loricrina sola (Tabla 5). Esto indica que el biomarcador combinado agregaría valor pronóstico en la identificación de pacientes de alto riesgo para un aumento de la vigilancia, así como en la identificación de pacientes de bajo riesgo que podrían tranquilizarse con respecto a su pronóstico con mayor certeza.

10 Este es un hallazgo importante, ya que una disminución o pérdida de la expresión de estas dos proteínas puede indicar una ruptura de la epidermis que la cubre y la vasculatura subyacente al tumor, lo que significa que las células cancerosas pueden haber migrado ya del tumor primario en el momento de la escisión del tumor.

15 Ciertas realizaciones de la presente invención proporcionan así un medio para determinar si un sujeto que padece melanoma tiene un mayor riesgo de metástasis. Esto permite que un régimen de tratamiento se adapte en consecuencia, reduciendo así el riesgo de que el sujeto desarrolle metástasis y mejore su pronóstico.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método in vitro para determinar si un sujeto con melanoma tiene un mayor riesgo de metástasis, el método comprende:
- (i) determinar la expresión de Ambra-1 y Loricrina en una muestra de tejido obtenida del sujeto, en donde la muestra de tejido comprende tejido que recubre un melanoma primario; y
- 10 (ii) comparar la expresión obtenida en (i) con un tejido de referencia o los niveles obtenidos a partir del mismo, en donde una disminución en la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido en comparación con el tejido o los niveles de referencia, o una pérdida de expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido, es indicativo de un mayor riesgo de metástasis.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los niveles de referencia son niveles de expresión de Ambra-1 y Loricrina que son característicos del tejido normal, en donde opcionalmente el tejido de referencia comprende tejido normal.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el tejido normal es epidermis de un sitio que no incluye un melanoma primario.
4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el tejido de referencia es una referencia interna, opcionalmente en el que el tejido normal es de un sitio adyacente al melanoma primario.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra de tejido comprende tejido que recubre un melanoma primario y una porción de epidermis normal adyacente al melanoma primario.
6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido es de 25 a 75% del nivel de referencia respectivo.
- 30 7. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1-5, en el que la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido es inferior al 25% del nivel de referencia respectivo, opcionalmente en el que la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido es determinado por la evaluación visual o por un escáner automático de láminas.
- 35 8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la determinación de la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido comprende:
- poner en contacto la muestra de tejido con un primer ligando específico para Ambra-1, en donde la presencia de Ambra-1 crea un complejo Ambra-1-ligando;
- 40 poner en contacto la muestra de tejido con un segundo ligando específico para Loricrina, en donde la presencia de Loricrina crea un complejo de Loricrina-ligando; y
- 45 detectar y/o cuantificar el complejo Ambra-1-ligando y el complejo Loricrina-ligando.
9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el método comprende poner en contacto una primera sección de la muestra de tejido con el primer ligando, y poner en contacto una segunda sección de la muestra de tejido con el segundo ligando.
- 50 10. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra de tejido comprende al menos una porción de una epidermis peritumoral que cubre el melanoma primario.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la muestra de tejido comprende queratinocitos que recubren el melanoma primario y el método comprende determinar la expresión de Ambra-1 y Loricrina en los queratinocitos y además, opcionalmente, en el que el sujeto es un ser humano o animal.
- 55 12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el sujeto padece melanoma en etapa 1 o etapa 2 o etapa 3 o etapa 4 de la American Joint Commission on Cancer (AJCC) en el que opcionalmente el sujeto padece de AJCC en etapa 1a, etapa 1b melanoma en etapa 2a, etapa 2b o etapa 2c y además, opcionalmente, en el que el sujeto tiene un melanoma ulcerado.
- 60 13. Un agente terapéutico capaz de inhibir, prevenir o retrasar la metástasis del melanoma para su uso en el tratamiento del melanoma en un sujeto, en el que se ha identificado que dicho sujeto tiene un mayor riesgo de metástasis según el método de la reivindicación 1.
- 65

5 14. Un agente terapéutico para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el agente terapéutico es un agente quimioterapéutico, en el que opcionalmente el agente quimioterapéutico se selecciona de Dacarbazina (DTIC), Temozolomida, Nabpaclitaxel, Paclitaxel, Carmustina (BCNU), Cisplatín, Carboplatín, Vinblastina, interleucina 2, interferón alfa, anticuerpos o inhibidores de B-Raf en los que, opcionalmente, el sujeto padece melanoma en etapa 1, etapa 2, etapa 3 o etapa 4 de la American Joint Commission on Cancer (AJCC), por ejemplo melanoma etapa 1a, etapa 1b, etapa 2a, etapa 2b o etapa 2c.

10 15. Un agente terapéutico para uso de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el sujeto, antes de la identificación, no es elegible para el tratamiento con agente terapéutico y, opcionalmente, en donde el agente terapéutico es para administración al sujeto no más de 12 semanas después de que el sujeto haya estado identificado como que tiene una disminución o pérdida de la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido y, además, opcionalmente, en donde la expresión de Ambra-1 y Loricrina en la muestra de tejido es de 25 a 75% del nivel de referencia respectivo o menos del 25% del respectivo nivel de referencia.

15

Figura 1

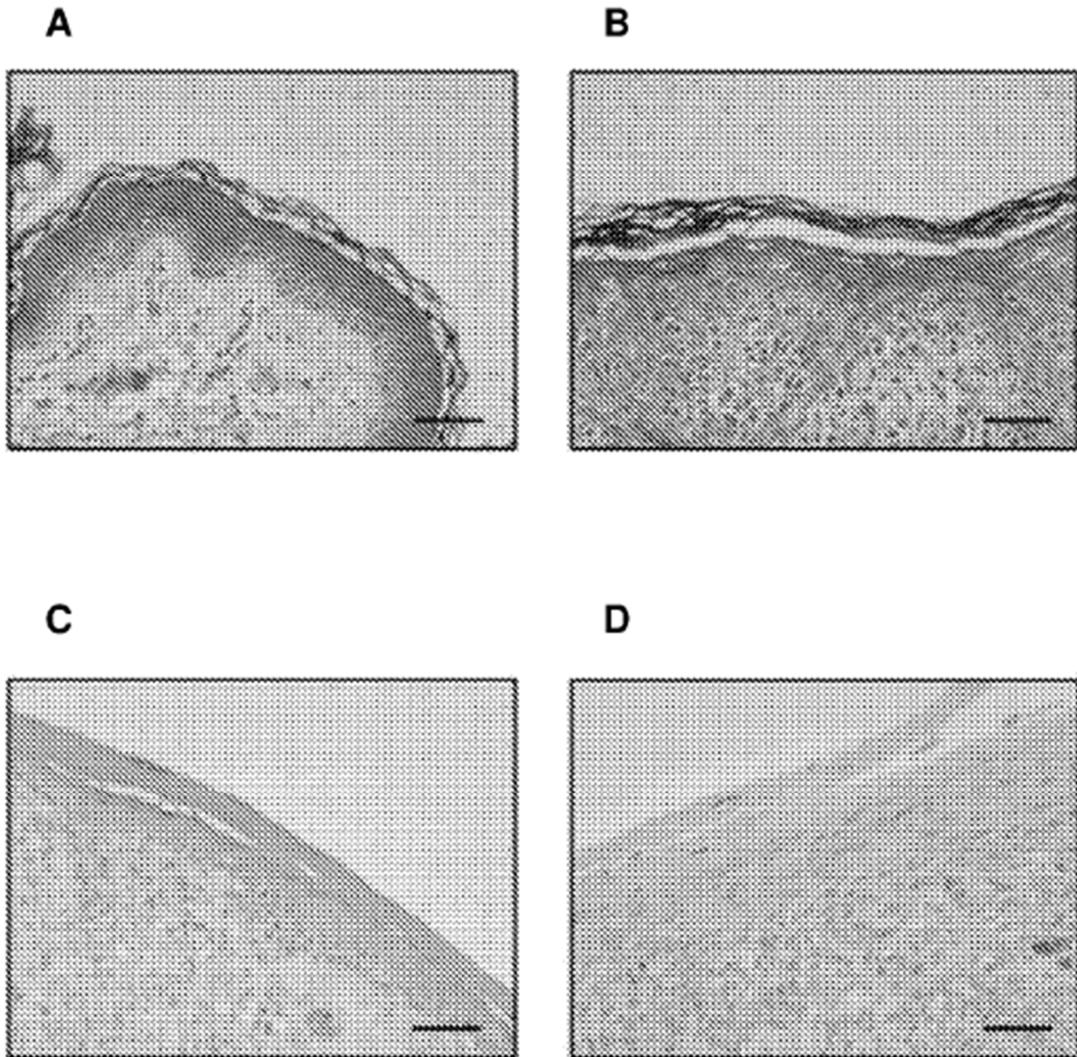


Figura 2

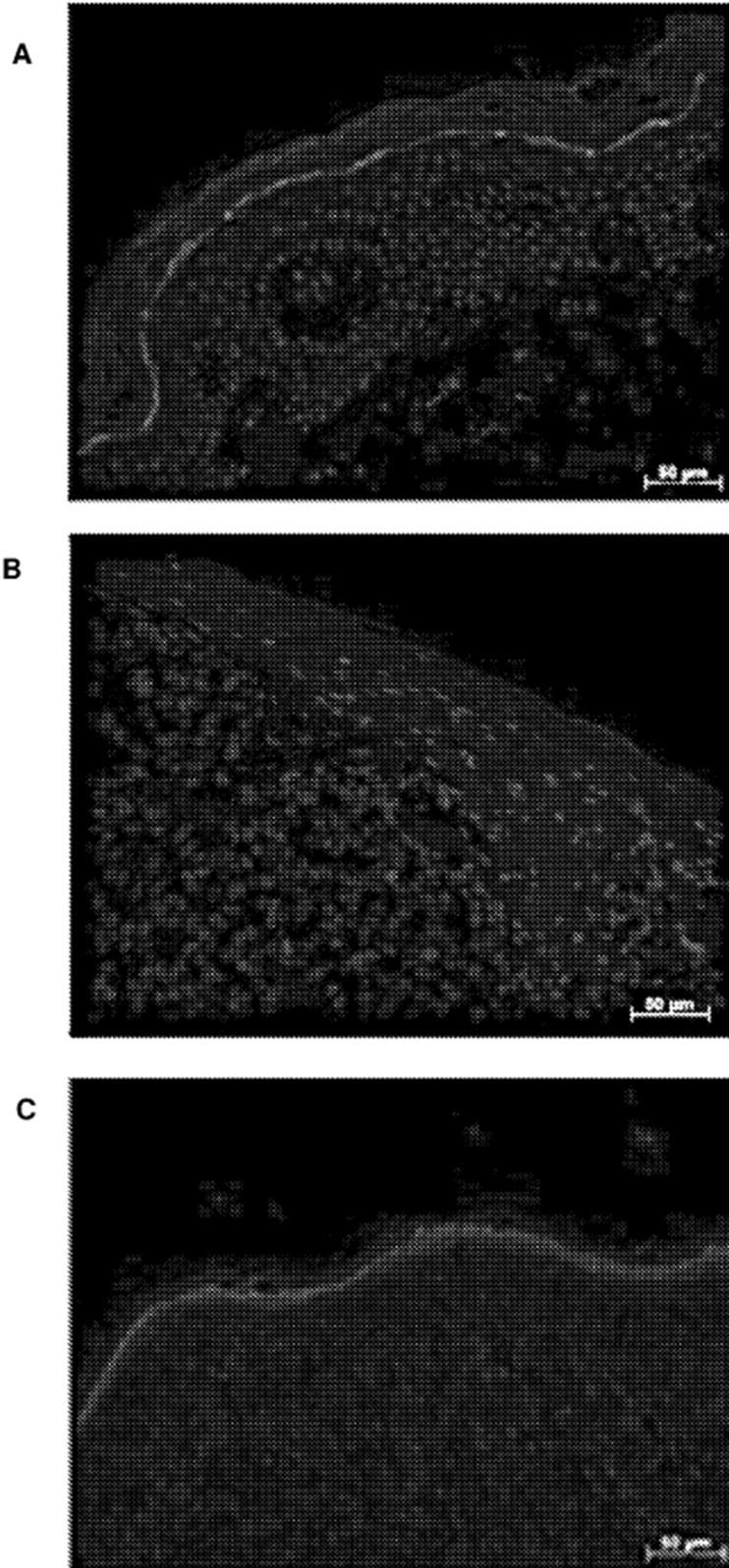


Figura 3A

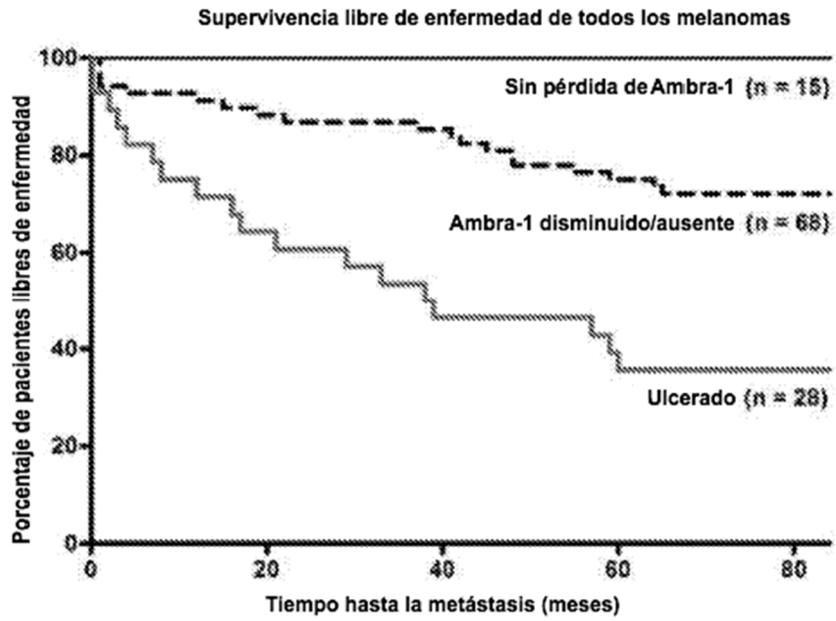


Figura 3B

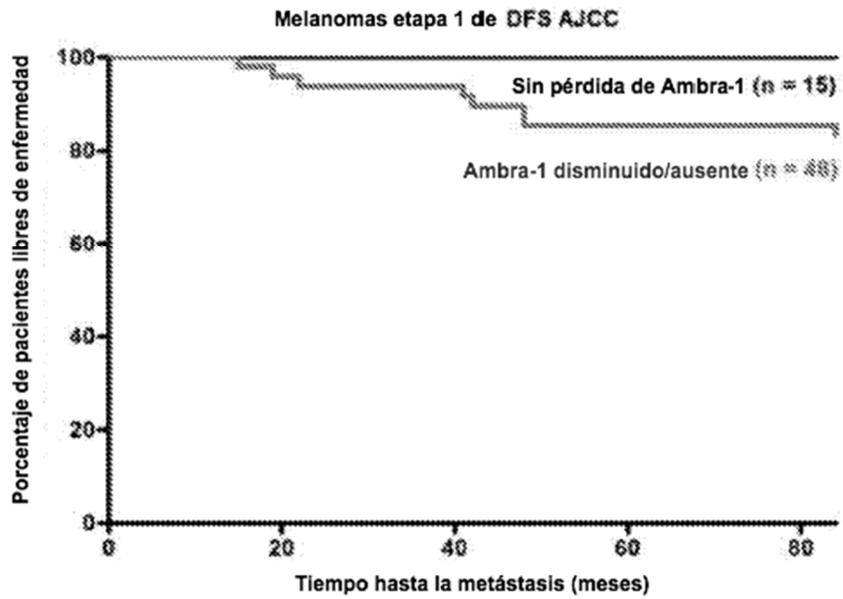


Figura 4A

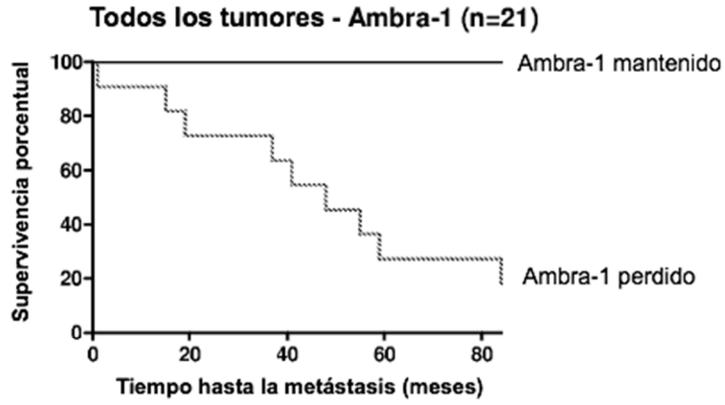


Figura 4B

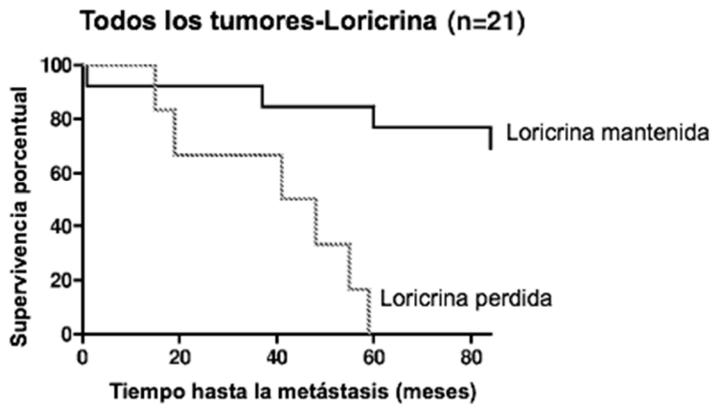


Figura 4C

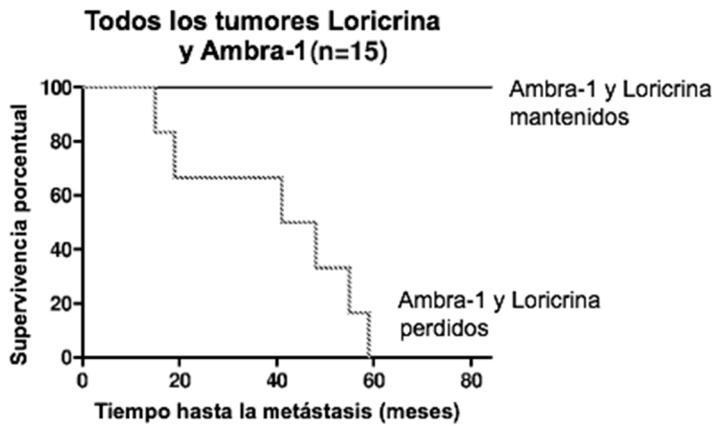


Figura 5A

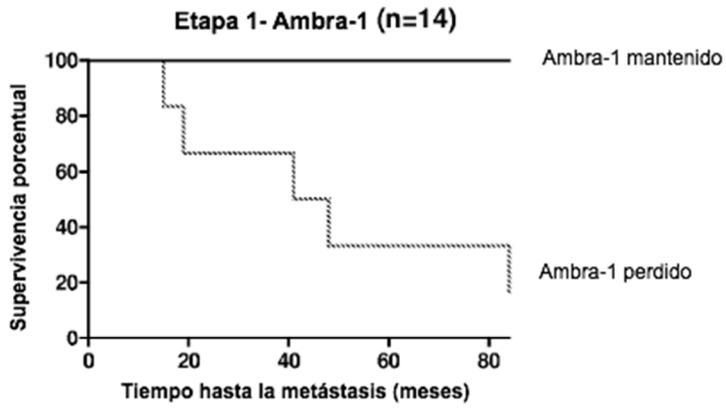


Figura 5B

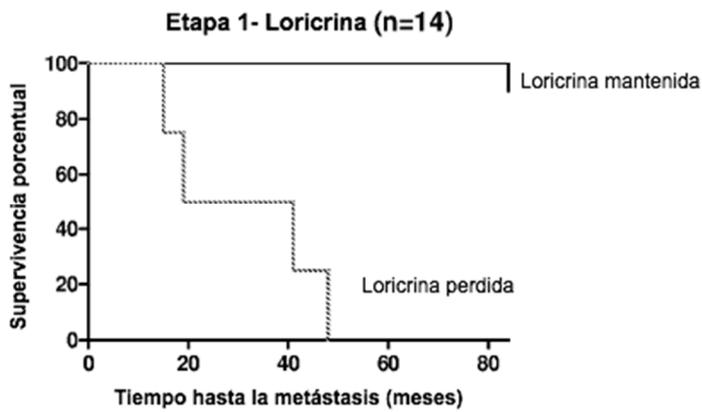


Figura 5C

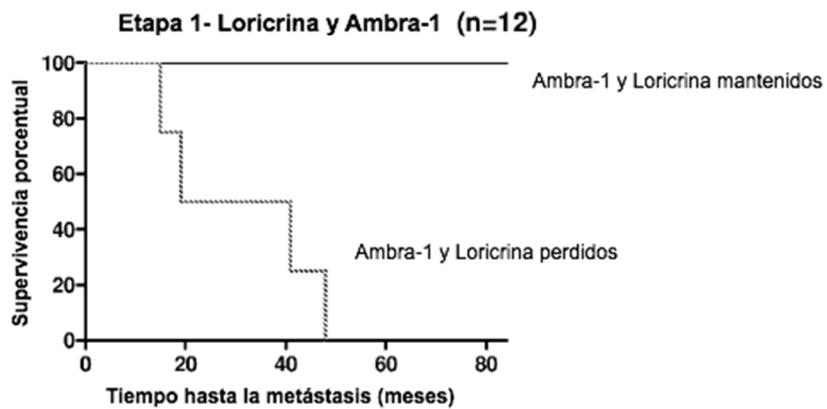


Figura 6

MKVVPEKNAV	RILWGRERGA	RAMGAQRLLO	ELVEDKTRWM	KWEGKRVELP	50
DSRSTFLLA	FSPDRLLAS	THVNHNIYIT	EVKTGKCVHS	LIGHRRTPWC	100
VTFHPTISGL	IASGCLDGEV	RIWDLHGGSE	SWFTDSNNAI	ASLAFHPTAQ	150
LLLIATANEI	HFWDWSRREP	FAVVKTASEM	ERVRLVRFDP	LGHYLLTAIV	200
NPSNQGGDDE	PEIPIDGTEL	SHYRQRALLQ	SQPVRRTPLL	HNFLHMLSSR	250
SSGIQVGEQS	TVQDSATPSP	PPPPPQPSTE	RPRTSAYIRL	RQRVSYPTAE	300
CCQHLGILCL	CSRCSGTRVP	SLLPHQDSVP	PASARATTPS	FSFVQTEPFH	350
PPEQASSTQQ	DQGLLNRPDA	FSTVQSSTAG	NTLRNLSLGP	TRRSLGGPLS	400
SHPSRYHREI	APGLTGSEWT	RTVLSLNSRS	EAESMPPPRT	SASSVSLLSV	450
LRQQEGGSQA	SVYTSATEGR	GFPASGLATE	SDGGNGSSQN	NSGSIRHELQ	500
CDLRRFFLEY	DRLQELDQSL	SGEAPQTQQA	QEMLNNNIES	ERPGPSHQPT	550
PHSSENNSNL	SRGHLNRCRA	CHNLLTFNND	TLRWERTTPN	YSSGEASSSW	600
QVPSSFESVP	SSGSQLPPLE	RTEGQTPSSS	RLELSSSASP	QEERTVGVAF	650
NQETGHWERI	YTQSSRSGTV	SQEALHQDMP	EESSEEDSLR	RRLLESSLIS	700
LSRYDGAGSR	EHPYIPDPAR	LSPAAYYAQR	MIQYLSRRDS	IRQRSMRYQQ	750
NRLRSSTSSS	SSDNQGPSVE	GTDLEFEDFE	DNGDRSRHRA	PRNARMSAPS	800
LGRFVPRRFL	LPEYLPYAGI	FHERGQPGLA	THSSVNRVLA	GAVIGDGQSA	850
VASNIANTTY	RLQWWDFTKF	DLPEISNASV	NVLVQNCKIY	NDASCDISAD	900
GQLLAAFIPS	SQRGFPDEGI	LAVYSLAPHN	LGEMLYTKRF	GPNAISVSLS	950
PMGRYVMVGL	ASRRILLHPS	TEHMVAQVFR	LQQAHGGETS	MRRVFNVLYP	1000
MPADQRRHVS	INSARWLPEP	GLGLAYGTNK	GDLVICRPEA	LNSGVEYYWD	1050
QLNETVFTVH	SNSRSSERPG	TSRATWRTRD	DMGLMNAIGL	QPRNPATSVT	1100
SQGTQTLALQ	LQNAETQTER	EVPEPGTAAS	GPGELEGSEY	GASGEDALSR	1150
IQRLMAEGGM	TAVVQREQST	TMASMGFGN	NIIVSHRIHR	SSQTGTEPGA	1200
AHTSSPQPST	SRGLLPEAGQ	LAERGLSPRT	ASWDQPGTPG	REPTQPTLPS	1250
SSPVPIPVSL	PSAEGPTLHC	ELTNNNHLLD	GGSSRGDAAG	PRGEPRNR	1298

Figura 7

MSYQKKQPTP	QPPVDCVKTS	GGGGGGGSG	GGGCGFFGGG	GSGGGSSGSG	50
CGYSGGGGYS	GGGCGGGSSG	GGGGGGIGGC	GGGSGGSVKY	SGGGGSSGGG	100
SGCFSSGGGG	SGCFSSGGGG	SSGGGSGCFS	SGGGGSSGGG	SGCFSSGGGG	150
FSGQAVQCQS	YGGVSSGGSS	GGGSGCFSSG	GGGGSVCGYS	GGGSGCGGGS	200
SGGSGSGYVS	SQQVTQTSCA	PQPSYGGGSS	GGGSGGSGC	FSSGGGGGSS	250
GCGGGSSGIG	SGCIISGGGS	VCGGGSSGGG	GGGSSVGGSG	SGKGVPICHQ	300
TQQKQAPTWP	SK				312

Fig. 8

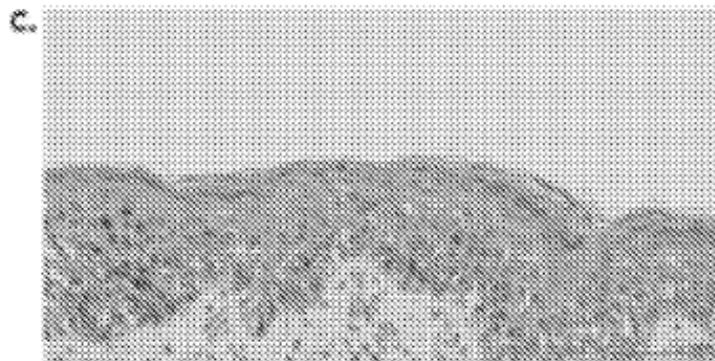


Fig. 9

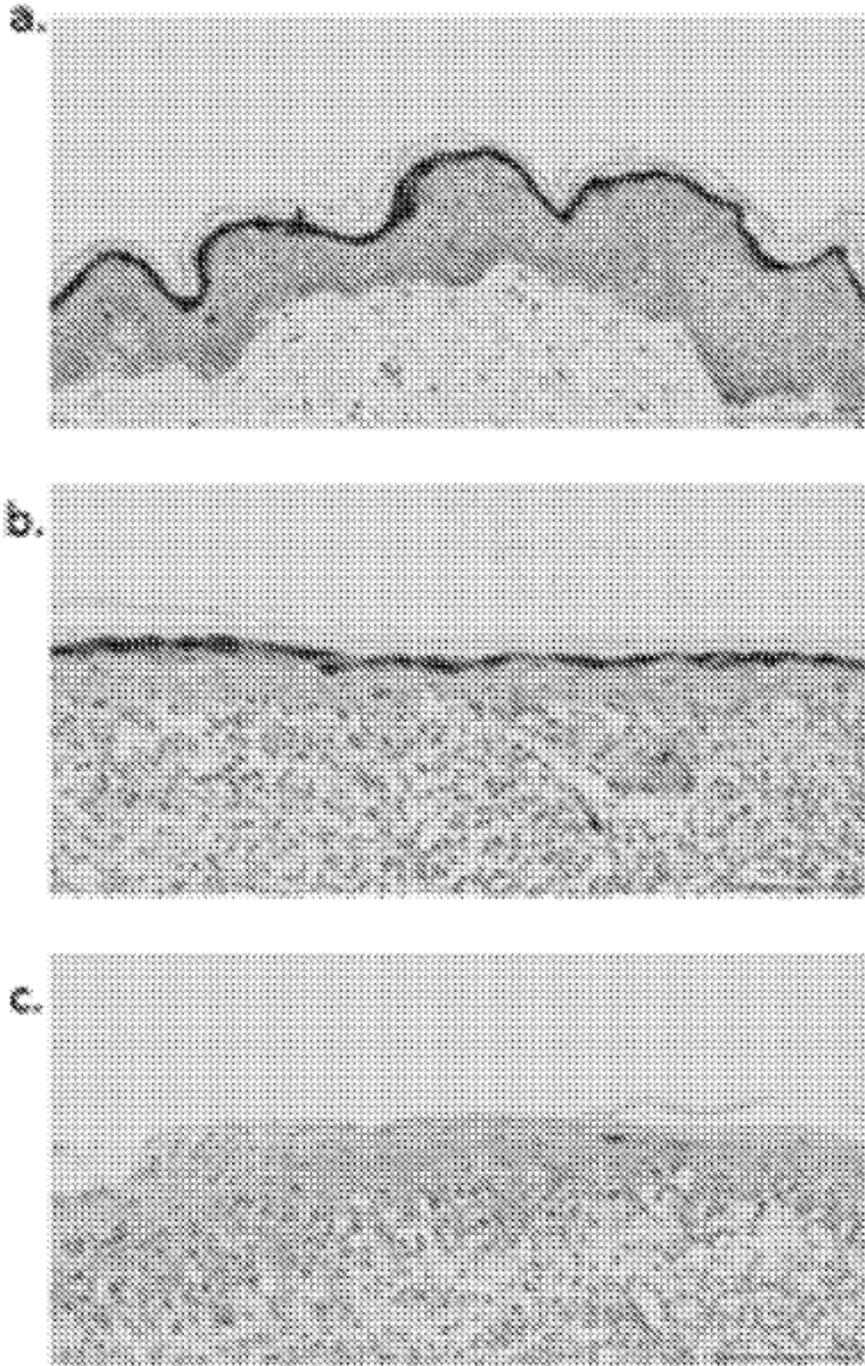


Fig. 10

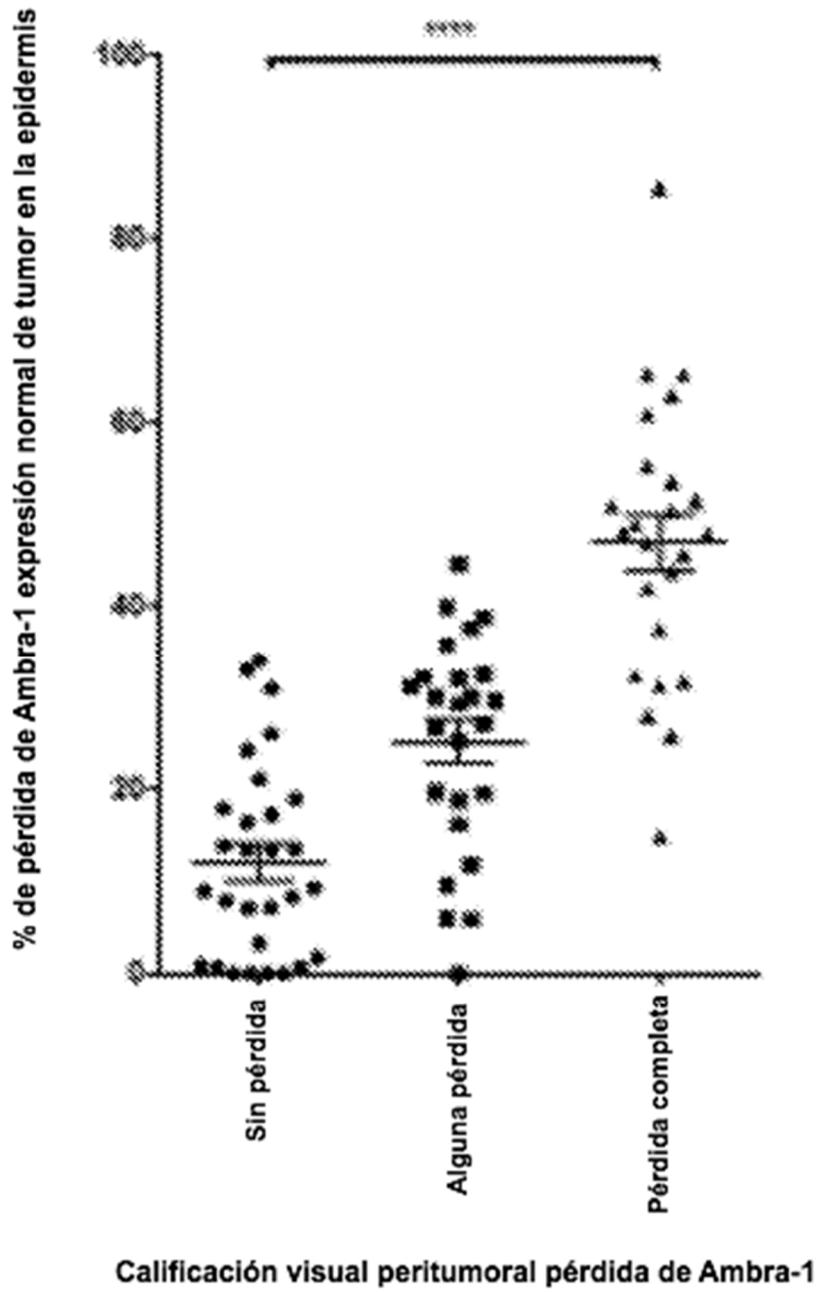


Fig. 11

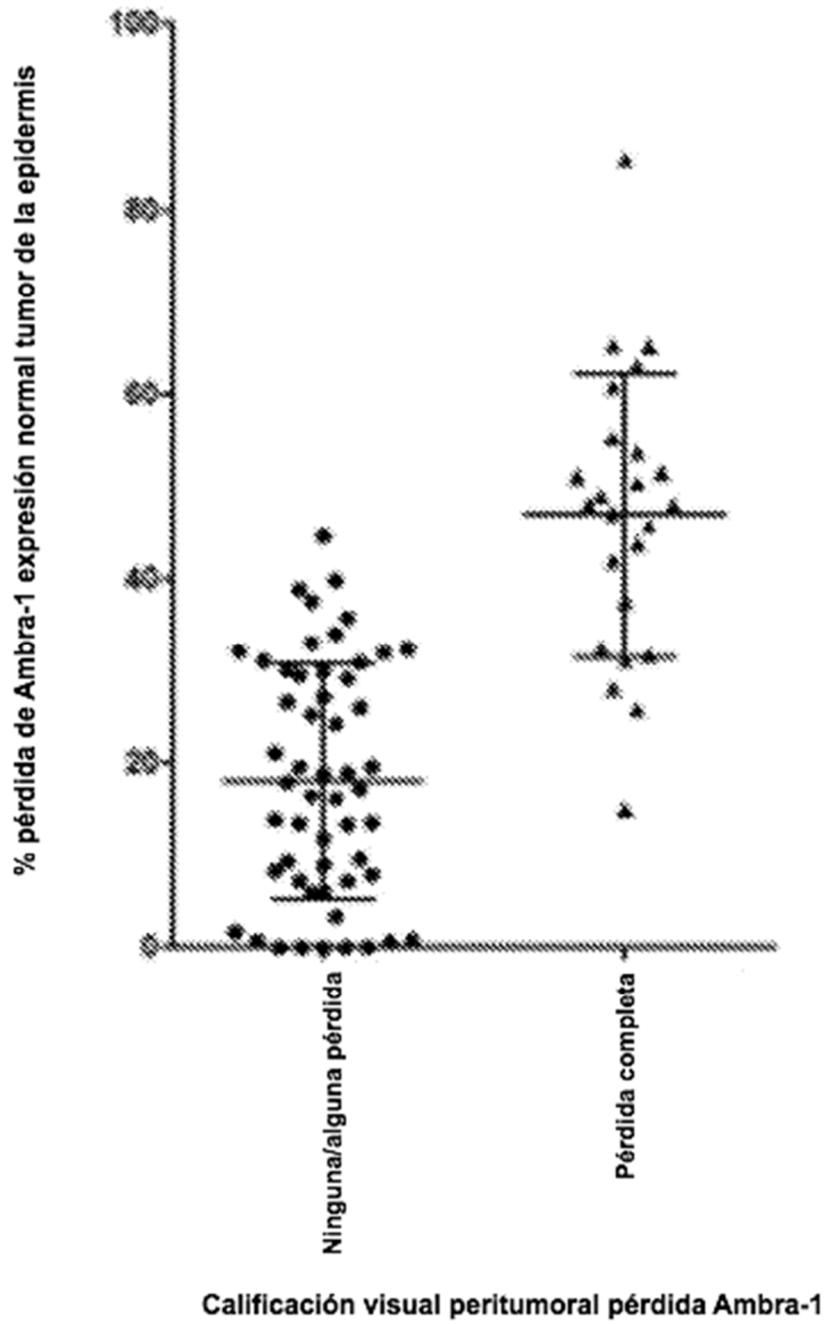


Fig. 12

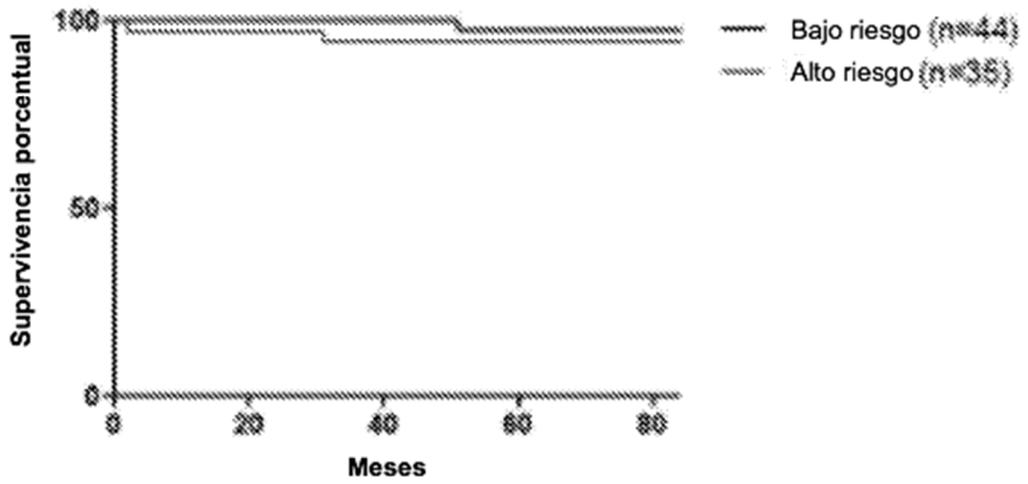


Fig. 13

