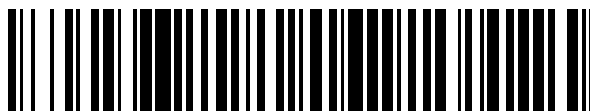


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 178**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2016 PCT/EP2016/061913**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193117**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2016 E 16729800 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3303625**

54 Título: **Procedimiento de identificación de sujetos con un cáncer de piel melanoma agresivo en el diagnóstico**

30 Prioridad:

29.05.2015 EP 15169951

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

21.11.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT MAASTRICHT (50.0%)
Minderbroedersberg 4-6
6211 LK Maastricht , NL y
ACADEMISCH ZIEKENHUIS MAASTRICHT
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**VAN ENGELAND, MANON;
VAN NESTE, LEANDER PIETER JO y
VAN DEN HURK, KARIN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 732 178 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

Procedimiento de identificación de sujetos con un cáncer de piel melanoma agresivo en el diagnóstico

Campo de la invención

- 5 La invención se encuentra en el campo de la biología molecular y diagnóstico médico. Proporciona medios y procedimientos para la determinación del pronóstico y resultado de la enfermedad de un sujeto que tiene un melanoma.

Antecedentes de la invención

- 10 El melanoma cutáneo es un tumor de piel letal con una incidencia continuamente en aumento, que resulta en una carga creciente para los servicios de salud [1, 2]. En todo el mundo, se ha informado de aproximadamente 232.000 nuevos casos y 55.000 muertes en 2012 [3]. Los pacientes diagnosticados con enfermedad localizada tienen una tasa de supervivencia a los cinco años de más del 95%, después de solamente la escisión quirúrgica [4]. Si el cáncer está más avanzado, sin embargo, las tasas de supervivencia caen sustancialmente, es decir, del 30% al 60% después de cinco años, primariamente dependiendo del espesor del tumor, es decir, la profundidad de Breslow.
- 15 La enfermedad metastática generalmente da lugar a pobres resultados de los pacientes, ya que las opciones de tratamiento fueron limitadas durante mucho tiempo. Sin embargo, el rápido desarrollo de las tecnologías de secuenciación de última generación ha identificado la mayoría de las alteraciones genéticas y rutas moleculares implicadas en el desarrollo del melanoma y proporcionan la base para nuevas terapias dirigidas [5]. Además, se han desarrollado nuevas terapias inmunomoduladoras para el tratamiento del melanoma [6].
- 20 Actualmente, el Comité conjunto Americano del Cáncer (AJCC) clasifica los pacientes basándose predominantemente en las características histológicas del tumor primario, es decir, el espesor de Breslow, ulceración, y tasa mitótica, e indica que la biopsia inicial es un componente crítico tanto del diagnóstico como de la estadificación [7]. Además, la presencia de un estadio avanzado de la enfermedad (estadio III/IV) y, en menor extensión, la edad del paciente, el género, y la localización del tumor, son factores pronósticos del melanoma. El
- 25 espesor de Breslow se ve como el parámetro pronóstico más importante, sin embargo, el 20-30% de los pacientes diagnosticados con melanomas delgados (de $\leq 2,0$ mm de espesor) siguen muriendo de su enfermedad [8, 9]. Por lo tanto, están garantizadas las mejoras en el sistema de estadificación que dan lugar a una predicción más precisa del pronóstico, permitiendo a los médicos afrontar mejor el pronóstico de pacientes individuales. Además, es importante identificar los pacientes de alto riesgo con enfermedad agresiva en un estadio temprano ya que estos pacientes se
- 30 pueden beneficiar de una cirugía más extensa, terapia adyuvante y seguimiento más estrecho.

- En resumen, el melanoma cutáneo es un cáncer de piel altamente agresivo que supone aproximadamente el 75 de muertes relacionadas con un cáncer de piel. Se han descrito biomarcadores para el melanoma basándose en el análisis de la metilación diferencial en la técnica anterior [55-57]. La metilación diferencial del gen LY75 se ha unido a la enfermedad cardíaca [58]. El LY75 se ha descrito como una diana para el tratamiento del melanoma [59]. A
- 35 pesar del aumento de entendimiento de la biología del desarrollo del melanoma y la identificación de las alteraciones moleculares que acompañan la progresión del melanoma [10, 30], la estadificación del melanoma y el sistema de clasificación del AJCC no ha incorporado aún los cambios moleculares potencialmente [7]. Sin embargo, son necesarias mejoras en el sistema actual de estadificación para identificar con mayor precisión los pacientes individuales con enfermedad agresiva en el diagnóstico. Estos pacientes con un llamado mal pronóstico pueden
- 40 beneficiarse de una terapia adicional que dé lugar a un cuidado clínico mejorado y un mejor resultado del paciente.

Sumario de la invención

- Los inventores descubrieron que la metilación del promotor del antígeno linfocitario 75 (LY75), también conocido como CD-205 o DEC-205, es un marcador fuerte que predice un resultado clínico pobre, independientemente de los
- 45 pronosticadores utilizados actualmente en una serie de melanoma independiente. La invención, por lo tanto, se refiere a un procedimiento para determinar si un sujeto que tiene un melanoma tiene un mal pronóstico, comprendiendo el procedimiento la etapa de determinación en una muestra del sujeto si el promotor LY75 está metilado y si el promotor LY75 está metilado, la clasificación del sujeto como que tiene un mal pronóstico.

Descripción detallada de la invención

- Los inventores examinaron el estado de metilación del promotor del antígeno linfocitario 75 (LY75) en una serie bien
- 50 caracterizada de 123 melanomas primarios con datos de seguimiento. Los inventores descubrieron que la metilación del promotor LY75 (HR = 4,442; un 95%-CI 2,307-8,553, $P < 0,001$) junto con ulceración (HR = 2,262; un 95%-CI 1,164-4,396, $P = 0,016$) y enfermedad metastática en el diagnóstico (HR = 5,069; un 95%-CI 2,489-10,325, $P < 0,001$) eran predictores significativos de la supervivencia al melanoma.

El LY75, también conocido como CD-205 o DEC-205, es un receptor de la familia de manosas de unión al colágeno

que se expresa predominantemente en el epitelio cortical tímico y los subconjuntos de células dendríticas mieloides [37]. Se ha informado que el LY75 tiene un papel en la captación endocítica de antígeno que da lugar a una respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ [37-39].

5 El LY75 es el conjunto genético ID ENSG00000054219, situado en el cromosoma 2, con la descripción genética Precursor 75 del antígeno linfocitario (DEC-205) (gp200-MR6) (antígeno CD205).

El promotor del gen LY75 se analizó en cuanto a su estado de metilación en líneas celulares de melanoma y melanocitos epidérmicos normales humanos (NHEM) y en 20 muestras de melanoma primario y 20 muestras de nevus común. Se descubrió que el promotor estaba metilado en 6 de las 6 líneas celulares de melanoma, no en las células NHEM, en el 35% de los melanomas piloto y en el 0% de las muestras de nevi piloto.

10 La metilación del promotor de LY75 se identificó como un fuerte predictor de un mal pronóstico de melanoma e identificaba pacientes con enfermedad agresiva en el diagnóstico independientemente de los parámetros de pronóstico actuales. La metilación del promotor de LY75 es por lo tanto una ayuda importante en la identificación de pacientes que necesitan una cirugía más extensa, tratamiento adyuvante, y un seguimiento más estrecho que dará lugar entonces a un resultado clínico mejor.

15 La invención se refiere por lo tanto a un procedimiento para la determinación de si un sujeto que tenga un melanoma tiene un mal pronóstico, comprendiendo el procedimiento una etapa de determinación en una muestra del sujeto si el promotor LY75 está metilado y si el promotor LY75 está metilado, clasificando el sujeto como que tiene un mal pronóstico.

20 En la serie de pacientes examinados en el presente documento, un mayor espesor de Breslow, la presencia de ulceración, y la presencia de enfermedad metastática en el diagnóstico eran los principales indicadores pronósticos ($P < 0,001$, Tabla 4; curvas de supervivencia de Kaplan-Meier representadas en la Figura 1A, B y C, respectivamente).

25 Adicionalmente, una edad mayor en el diagnóstico, la presencia de mitosis tumorales, y la localización en la cabeza y cuello eran predictores significativos de mal pronóstico (Tabla 3), indicando que esta serie era adecuada para estudiar el valor pronóstico adicional de los marcadores de metilación ya que refleja la progresión total de la enfermedad de una tendencia similar a la población general.

La expresión "mal pronóstico" se utiliza en el presente documento para indicar que puede esperarse o predecirse que los pacientes con un promotor LY75 metilado tengan una esperanza de vida más corta que los que tienen un promotor LY75 no metilado.

30

Tabla 4. Asociaciones de características clinicopatológicas y el marcador de metilación LY75 con la supervivencia específica del melanoma

	Análisis univariados			Análisis multivariados *			Final **	
	HR	95% CI	Valor de P	HR	95% CI	Valor de P	HR	95% CI
Marcadores pronósticos actuales								
Género (masculino vs femenino)	1,675	0,900-3,116	,103	1,612	0,810-3,206	,174	-	-
Edad (continua)	1,026	1,004-1,050	,023	1,007	0,982-1,032	,595	-	-
Localización (cabeza/cuello vs otras)	2,875	1,451-5,697	,002	2,206	1,018-4,780	,045	-	-
Espesor de Breslow (continuo)	1,175	1,114-1,239	<,001	1,154	1,073-1,242	<,001	-	-
Ulceración (sí vs no)	3,355	1,827-6,160	<,001	1,864	0,908-3,827	,090	2,262	1,164-4,396
Estado de la enfermedad (estado III/IV vs estadio I/II)	6,498	3,372-12,520	<,001	3,957	1,856-8,436	<,001	5,069	2,489-10,325
Mitosis (>1 mm ² vs <1 mm ²) ***	30,835	1,405-676,773	,030	-	-	-	-	-
Marcador de metilación; metilado vs no metilado (% de metilación)								
LY75	29/114 (25%)	5,395	2,854-10,200	<,001	4,011	1,693-9,502	4,442	2,307-8,553

* Los análisis de regresión de riesgos proporcionales multivariados de Cox se ajustaron para el género, edad, localización, espesor de Breslow, ulceración y estadio de la enfermedad. ** Los análisis finales eran el resultado de la eliminación hacia atrás por etapas sobre el modelo saturado de regresión de riesgos proporcionales multivariados de Cox con los marcadores pronósticos actuales (excepto para la mitosis tumoral) y los marcadores de metilación como covariantes. *** El amplio intervalo de confianza del 95% para la tasa mitótica se puede explicar por el hecho de que ninguno de los pacientes murió de melanoma cuando las mitosis estaban ausentes, como resultado el análisis estadístico era problemático por la presencia de un valor igual a cero. Adicionalmente, el sistema de estadificación AJCC [7] utiliza la presencia de mitosis solamente para categorizar el melanoma R1 (<1,0 mm de espesor). Por estas razones se omitieron las mitosis tumorales en los análisis multivariados.

La ulceración tumoral y la enfermedad metastática en el diagnóstico eran, junto con la metilación de LY75, los predictores más significativos de supervivencia. Utilizando el criterio de información de Akaike (AIC) se demostró que la metilación de LY75 como único marcador de metilación siempre superaba este panel.

Como la supervivencia al melanoma depende mucho de la formación de metástasis letales, los inventores se preguntaban si la metilación de LY75 era un predictor significativo de la formación de metástasis distantes en los pacientes en estadio I y II. DE 95 pacientes en estadio I y II con un estado de metilación conocido, un total de 26 pacientes desarrollaron la enfermedad metastática. Utilizando los análisis univariados, los inventores observaron un fuerte valor pronóstico de la metilación de LY75 para predecir la formación de metástasis distantes, HR=7,835, un 95%-CI 3,554-17,274, $P<0,001$. Aplicando análisis multivariados, la metilación del promotor de LY75 (HRLY75=7,924, un 95%-CI 3,492-17,980, $P<0,001$) seguía siendo el mejor predictor de desarrollo de enfermedad metastática junto con la ulceración (HR ulceración=3,477, 95%-CI 1,579-7,655, $P=0,002$) y la edad (HRedad=1,040, 95%-CI 1,009-1,072, $P=0,011$).

Para validar la asociación observada de la metilación de LY75 con la formación de metástasis distantes, los inventores evaluaron el conjunto de datos del Atlas de Datos Genómicos del Cáncer (TCGA). Esta base de datos proporciona los datos de seguimiento de 44 melanomas primarios de los cuales 14 pacientes recayeron. (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/>)

Para el análisis, se seleccionó una única sonda representativa de la región (cg24478096; en la que se emplearon la sonda A: AAACAACAAAACCTATAACATCAAAACACCCAACAACTACAAAATAACA (SEQ ID NO: 7), y la sonda B: AAACAACAAAACCTATAACGTCGAAACACCCAACGAACCTACGAAATAACG (SEQ ID NO: 8). La sonda A detecta alelos no metilados y la sonda B detecta alelos metilados.

Como valor de corte, se escogió un valor β normalizado de 0,2, en el que β es igual a las intensidades de las sondas A y B de acuerdo con la ecuación: $B/(A+B)$. En otras palabras, si la intensidad de la sonda B era mayor del 20% de la intensidad total de las sondas A y B juntas, la muestra se valoraba como que tenía metilado el promotor LY75. Las muestras con un valor $\beta > 0,2$ se valoraban por lo tanto como metiladas y las muestras con un valor β por debajo o en 0,2 se valoraban como no metiladas.

Esto no quiere decir que se empleen otros valores de corte de manera ventajosa. Dependiendo de la especificidad y sensibilidad deseadas del procedimiento, el valor de corte se puede ajustar.

La etapa de determinación de si un sujeto tiene un promotor LY75 metilado puede incluir ventajosamente una etapa de determinación de si el nivel de metilación del promotor LY75 está por encima de un valor de referencia o valor de corte. Un experto en la técnica puede ser bien consciente de las maneras para obtener dicho valor de referencia. Puede ser, por ejemplo, el valor obtenido utilizando las mismas sondas y procedimientos que se describen en el presente documento cuando se aplican a un individuo normal o un panel de individuos normales. También puede ser un valor escogido arbitrariamente o se puede determinar por ensayo y error. Un valor de referencia preferido es un valor beta de más de 0,2 como se determina con un conjunto de sondas apropiado, tal como por ejemplo las sondas A y B de acuerdo con las SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, respectivamente.

El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier demostraba que los melanomas primarios que estaban metilados tenían un riesgo significativamente alto de desarrollar la enfermedad metastática (rango logarítmico $P=0,020$).

La eliminación de etapas retrógradas en el modelo de regresión de riesgos proporcionales multivariado de Cox con estadio de enfermedad, espesor de Breslow, ulceración tumoral, género, y edad como covariados revelaba que la metilación de LY75 es el mejor marcador único para predecir la recurrencia en esta serie (HRLY75=3,568, un 95%-CI 1,142-11,149, $P=0,029$).

Entre los pacientes con melanoma en estadio I y II, la metilación de LY75 era el predictor más fuerte (HR=7,924, un 95%-CI 3,492-17,980, $P<0,001$) de desarrollo de metástasis distantes, junto con la ulceración tumoral (HR=3,477, un 95%-CI 1,579-7,655, $P=0,002$) y mayor edad en el diagnóstico (HR=1,040, un 95%-CI 1,009-1,072, $P=0,011$). La metilación de LY75 superaba el espesor de Breslow, el parámetro pronóstico clínico más importante. Esto es especialmente interesante ya que la incidencia de pacientes diagnosticados con melanoma delgado ha aumentado y una proporción creciente de las muertes relacionadas con el melanoma se producían entre estos pacientes [8, 9, 36]. Por lo tanto, a pesar de su pronóstico generalmente favorable, los melanomas delgados contribuyen considerablemente (aproximadamente en un 25%) a la mortalidad por melanoma. La identificación de una fuerte relación entre la metilación de LY75 y el mal pronóstico que sea independiente del espesor de Breslow proporciona una manera prometedora para identificar pacientes de alto riesgo, que no se detectan mediante los factores de riesgo tradicionales, que pueden beneficiarse de la terapia adyuvante y el seguimiento más estrecho.

Sin el deseo de quedar ligados por teoría alguna, los inventores hicieron la hipótesis de que el mal resultado clínico de los pacientes con tumores con LY75 metilado se podía explicar parcialmente por un mal reconocimiento inmunitario, aunque no pudieron observar una asociación significativa de metilación con ausencia de linfocitos infiltrantes del tumor (TIL) en sus series (datos no mostrados). Sin embargo, puede ser también que los TIL sean funcionalmente deficientes o se activen de manera incompleta como se ve comúnmente durante la progresión tumoral [40]. El melanoma se trata cada vez más con terapias inmunomoduladoras tales como con anticuerpos anti-

CTLA4 y anti-PD1 que aprovechan la capacidad de los linfocitos T CD8+ para eliminar células de melanoma inmunogénicas [41, 42]. Aunque las respuestas pueden ser duraderas, la tasa de respuesta a estas terapias es baja en general (aproximadamente de un 25% de los pacientes) [6] y los marcadores que predicen la respuesta es algo de lo que se carece [43]. Por lo tanto, es concebible que la metilación del LY75 puede reflejar también una mala respuesta a las terapias inmunitarias.

En resumen, la metilación del LY75 se reconoce como un fuerte predictor independiente de mal pronóstico, tanto en la predicción de la muerte específica por melanoma como en la predicción de formación de metástasis distantes en los pacientes con melanoma en estadio I y II.

Leyenda de las figuras

Figura 1: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los mejores marcadores de pronóstico.

(A) curva de Kaplan-Meier de la supervivencia específica de melanoma de pacientes agrupados de acuerdo con el espesor del tumor primario dividido por el estadio tumoral del AJCC. (B) Curva de Kaplan-Meier de supervivencia específica de melanoma de pacientes agrupados de acuerdo con la presencia o ausencia de ulceración tumoral. (C) Curva de Kaplan-Meier de supervivencia específica de melanoma de pacientes agrupados de acuerdo a la localización de la enfermedad (Estadios I/II) y enfermedad metastásica (Estadios III/IV). (D) Curva de Kaplan-Meier de la supervivencia específica de melanoma de pacientes agrupados de acuerdo con la metilación del promotor LY75.

Figura 2: Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de acuerdo con el estado del promotor LY75 metilado

Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de supervivencia libre de recurrencia de pacientes del TCGA agrupados de acuerdo con el estado de metilación de LY75 y la sonda cg24478096.

Ejemplos

Ejemplo 1: Cultivo celular y secuenciación de MBD

Se llevó a cabo la secuenciación del dominio de unión a metilo (MBD) sobre seis líneas celulares de melanoma (WM35, WM3248, WM164, A375, M14, SK-MEL-28) y melanocitos epidérmicos normales humanos (NHEM) proporcionados por el Dr. Leon van Kempen (McGill University, Montreal, Canadá). Se llevó a cabo la autenticación de todas las líneas celulares utilizando un perfil de repeticiones cortas en tándem (STR) (DSMZ, Braunschweig, Alemania). Las líneas celulares WM se cultivaron en medio W489 que consistía en cuatro partes de MCDB153 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países bajos) y una parte de L15 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países bajos), las células A375, M14, y SK-MEL-28 se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Invitrogen, Breda, Países bajos). Las células se suplementaron con un 2% o un 10% de suero bovino fetal inactivado por calor (Hyclone Perbio Science, Erembodegem-Aalst, Bélgica), respectivamente. Las células NHEM se cultivaron en un medio listo para usarse suministrado por Promocell (Heidelberg, Alemania). El ADN genómico se aisló utilizando el kit de aislamiento de ADN Puregene® (Gentra systems, Minneapolis, MN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

El ADN genómico de todas las muestras se sometió a secuenciación de enriquecimiento de metilación utilizando el kit MethylCap con una elución salina alta (Diagenode, Lieja, Bélgica) como se había descrito anteriormente [25]. Para cada muestra, y cada núcleo de metilación, se utilizó un recuento máximo de lectura en los análisis corriente abajo.

Ejemplo 2: Secuenciación del ARN total

La secuenciación en las células WM35, WM3248, M14, y SK-MEL-28 se llevó a cabo para determinar la metilación funcional, es decir, la metilación asociada con la expresión genética regulada negativamente [26]. En resumen, se aisló el ácido ribonucleico total (ARN) utilizando el procedimiento convencional de extracción de ARN TRIzol® (Invitrogen, Bleiswijk, Países bajos) y se almacenó a -80 °C. Para la preparación de la biblioteca de secuenciación del ARN total se llevó a cabo utilizando una versión modificada del protocolo de Illumina 'Preparación de la muestra par secuenciación de ARNm direccional' con el ARN total en vez de con el ARNm. El ADN ribosómico se vació de la fracción de ADN utilizando el protocolo de normalización de nucleasa termoestable específica de dúplex de Illumina para la secuenciación bidireccional de ARNm (nota de la aplicación 15014673).

Ejemplo 3: Datos Infinium-450K

Como el Atlas Genómico del Cáncer (TCGA) no tienen disponibles los datos de metilación en muestras de control, los inventores llevaron a cabo los ensayos Infinium-450K sobre 14 nevi recién congelados recolectados de los archivos del Hospital Universitario de Lovaina, Bélgica, para ser capaces de determinar la metilación específica del melanoma (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras utilizadas para el análisis de metilación		
Características	N.º de Pacientes	%
Nevi comunes utilizados para el análisis de Infinium-450K (n=14)		
<i>Género</i>		
Femenino	5	36
Masculino	9	64
<i>Edad (años)</i>	20,6 ± 24,	
<i>Localización</i>		
Cabeza y cuello	3	21
Tronco	8	57
Extremidades	3	21
Nevi comunes utilizados para la valoración con MSP (n=20)		
<i>Género</i>		
Femenino	5	50
Masculino	9	50
<i>Edad (años)</i>	31,7 ± 14,3	
<i>Localización</i>		
Cabeza y cuello	3	22
Tronco	11	57
Extremidades	5	21

El ADN genómico de las 14 muestras de nevus se extrajo y como se había descrito anteriormente [27]. Se llevó a cabo la cuantificación utilizando un lector de placas Qubit 2.0 (Invitrogen, Bleiswijk, Países bajos) y colorante PicoGreen (Invitrogen, Bleiswijk, Países bajos). La calidad del ADN se inspeccionó sobre geles de agarosa teñidos con SYBR® Safe (Invitrogen, Bleiswijk, Países bajos). La conversión con bisulfito de las muestras de ADN se llevó a cabo utilizando el kit de metilación de ADN EZ (Zymo Research, Orange, CA) y el ADN convertido se hibridó a los chips perlas Infinium-450K, seguido por el protocolo de metilación HD Infinium de Illumina como se ha descrito en otro sitio [28].

Ejemplo 4: Muestras de los pacientes

Se examinó la metilación de la isla CpG del promotor LY75 en una serie bien caracterizada de nevi comunes fijados con formalina embebidos en parafina (FFPE) (n = 20) y melanomas primarios (n = 123) de pacientes diagnosticados en el Centro Médico de la Universidad de Maastricht, Países bajos y el Hospital Universitario de Lovaina, Bélgica. La recolección, almacenamiento y uso de todos los tejidos y datos de los pacientes se llevaron a cabo de acuerdo con el “Código para el uso secundario apropiado de tejidos humanos de los Países Bajos”. Todas las muestras utilizadas y los datos correspondientes se desunieron y anonimizaron. El uso de muestras de melanoma y tejido sano se aprobaron por el comité científico de Recolección de Tejido Patológico de Maastricht (MPTC). La información clinicopatológica detallada de las muestras del melanoma se muestran en la Tabla 2, las características de las muestras del nevus se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 2. Características clinicopatológicas de 123 casos de melanoma primario con seguimiento

Características	N.º de Pacientes*	%
<i>Género</i>		
Femenino	82	67
Masculino	41	33
<i>Edad (años)</i>		
Media	59,9 ± 16,9	
≤50 años	37	30
>50 años	86	70

(continuación)

Características	N.º de Pacientes*	%
Estadio de enfermedad		
Localizado - Estadio I/II	103	84
Metastatizado - Estadio III/IV	20	16
Espesor de Breslow, mm		
0,01-1,0	32	26
1,01-2,0	29	24
2,01-4,0	29	24
> 4,0	33	27
Ulceración		
Ausente	86	70
Presente	37	30
Tasa mitótica		
<1/mm ²	23	19
>1/mm ²	99	81
TIL		
Ausente	29	24
No activo	69	57
Activo	24	20
Subtipo histológico		
SSM	85	73
NM	21	18
LMM	9	8
ALM	2	2
Localización		
Cabeza y cuello	21	17
Tronco	33	28
Extremidades	67	55
Formación de metástasis distantes		
No	80	65
Sí	43	35
Muertes relacionadas con la enfermedad		
No	81	66
Sí	42	34
Media de seguimiento (meses)	75,3 ± 57,0	
ALM, melanoma lentigoso acral; LMM, melanoma lentigoso maligno; NM, melanoma nodular; SSM, melanoma superficial diseminado; TIL, linfocitos infiltrantes del tumor		

Ejemplo 5: Aislamiento de ADN, conversión con bisulfito, y análisis de metilación de la isla CpG del promotor

- 5 Se tiñó una sección de 4 mm de cada bloque de tejido FFPE con hematoxilina y eosina (H/E) y fue revisada por un dermatopatólogo experto. Los casos que contenían > 50% de células de nevus o melanoma se incluyeron. Posteriormente, se cortaron diez secciones de 10 mm y se hizo otra sección de H/E para confirmar el porcentaje de células de nevus y melanoma. A continuación, se desparafinaron cubreobjetos y se extrajo el ADN después de la macrodisección con el Kit Micro ADN QIAamp (Qiagen, Venlo, Países Bajos). Se utilizó la cuantificación por
- 10 NanoDrop para estimar la calidad y concentración del ADN extraído (Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000). Se llevó a cabo una modificación con bisulfito sódico de 500 ng de ADN genómico utilizando el Kit Bisulfito EpiTect (Qiagen, Venlo, Países Bajos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A continuación de la conversión por bisulfito, se llevaron a cabo los análisis de reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación (MSP), múltiple, anidada como se había descrito en otro sitio [19] Las secuencias de los cebadores y las condiciones se muestran en la Tabla 3. El número de ciclos de PCR que se llevó a cabo era de 30.

Las condiciones de la PCR eran las siguientes: La mezcla de PCR contenía 1 x tampón de PCR (16,6 mM de sulfato amónico/67 mM de Tris, pH 8,8/6,7 mM de MgCl₂/10 mM de 2-mercaptoetanol), dNTP (cada uno a 1,25 mM), cebadores (300 ng de cada uno por reacción), y ADN modificado con bisulfito (50 ng) en un volumen final de 50 µl. Las reacciones se comenzaron con calor a 95 °C durante 5 minutos antes de la adición de 1,25 unidades de polimerasa Taq (BRL). Se llevó a cabo la amplificación en un termociclador durante 30 ciclos (30 s a 95 °C, 30 s a la temperatura de hibridación de 64 °C, y 30 s a 72 °C), seguido por una extensión final de 4 min a 72 °C. Se llevó a cabo una PCR flanqueante a 56 °C durante 35 ciclos.

Las reacciones de la PCR se llevaron a cabo con controles para los alelos no metilados (por ejemplo, un ADN humano de control no metilado, ADN de control EpiTect, Qiagen, nº de Cat. 59568), alelos metilados (ADN de linfocito normal tratado *in vitro* con Sssl metiltransferasa [New England Biolabs], y un control de ADN no matriz.

Se cargaron diez ml de cada reacción MSP en geles de agarosa al 2% que contenían La tinción en gel de ácido nucleico GelStar (Cambrex, New Jersey, EE.UU.), y se visualizaron bajo iluminación UV. La presencia de un producto de la PCR llevado a cabo con los cebadores metilados indica la presencia de ADN metilado y predice un mal pronóstico del paciente con melanoma.

Tabla 3: Secuencias de cebadores y condiciones utilizadas para el gen LY75:

Dirección	Posición	Secuencia	SEQ ID NO:	Temp (°C)
Cebador en sentido (5' → 3')	Anidado	TTAGGATGAGGATAGGTTGGG	1	56
	No metilado	GGATAGGTTGGGTGATTTTTTGT	2	64
	Metilado	GGTTGGGCGATTTTTCGTC	3	64
Cebador antisentido (3' → 5')	Anidado	CAAACATAAAAAACAACAACTATAAC	4	56
	No metilado	AAACTATAACATCAAAACACCCAACA	5	64
	Metilado	TATAACGTCGAAACACCCAACG	6	64

Las reacciones de MSP anidadas se llevaron a cabo con controles para alelos no metilados (ADN humano de control no metilado, ADN de control EpiTect, Qiagen, nº de Cat 59568), alelos metilados (ADN normal de linfocito tratado *in vitro* con Sssl metiltransferasa [New England Biolabs], y un control de ADN no matriz.

Para asegurar la reproducibilidad, las reacciones MPS se llevaron a cabo por duplicado comenzando a partir de la amplificación de ADN con cebadores flanqueantes. Los resultados discordantes se analizaron una tercera vez, y se utilizó el principio de la mayoría de los votos para determinar el estado de metilación.

Ejemplo 6: Análisis estadístico

Se utilizó una regresión de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el efecto de la metilación genética y las variables clinicopatológicas sobre la supervivencia específica del melanoma, dando como resultado relaciones de riesgos (HR) y sus correspondientes intervalos de confianza del 95% (95%-CI). Para la metilación de LY75, se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para evaluar el efecto de la metilación sobre la formación metástasis distantes (supervivencia libre de melanoma).

El tiempo de supervivencia se definió como el tiempo entre el primer diagnóstico y la primera fecha de diagnóstico de una metástasis distante. El criterio de información de Akaike (AIC) se utilizó para evaluar la capacidad predictiva de los modelos con marcadores de metilación únicos y múltiples. El modelo con el AIC más bajo se escogió como el mejor modelo. Todos los valores de P expuestos eran de dos lados, y se consideraba un P<0,05 como estadísticamente significativo. Los análisis se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 21 (IBM, New York, EE. UU.) y R (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

Referencias

1. MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. Ann Oncol, 2009. 20 Suppl 6: p. vi1-7.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, y col. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer, 2010. 127(12): p. 2893-2917.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F.

GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 01/09/2014.

4. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature*, 2007. 445(7130): p. 851-857.

5. Griewank KG, Scolyer RA, Thompson JF, y col. Genetic alterations and personalized medicine in melanoma: progress and future prospects. *J Natl Cancer Inst*, 2014. 106(2): p. djt435.

6. Miller DM, Flaherty KT, Tsao H. Current status and future directions of molecularly targeted therapies and immunotherapies for melanoma. *Semin Cutan Med Surg*, 2014. 33(2): p. 60-67.

7. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, y col. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 2009. 27(36): p. 6199-6206.

8. Criscione VD, Weinstock MA. Melanoma thickness trends in the United States, 1988-2006. *J Invest Dermatol*, 2010. 130(3): p. 793-797.

9. Whiteman DC, Baade PD, Olsen CM. More People Die from Thin Melanomas (1 mm) than from Thick Melanomas (>4 mm) in Queensland, Australia. *J Invest Dermatol*, 2014. p.

10. van den Hurk K, Niessen HE, Veeck J, y col. Genetics and epigenetics of cutaneous malignant melanoma: a concert out of tune. *Biochim Biophys Acta*, 2012. 1826(1): p. 89-102.

11. Laird PW. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(4): p. 253-266.

12. Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nat Rev Genet*, 2012. 13(10): p. 679-692.

13. Conway K, Edmiston SN, Khondker ZS, y col. DNA-methylation profiling distinguishes malignant melanomas from benign nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011. 24(2): p. 352-360.

14. Sigalotti L, Covre A, Fratta E, y col. Whole genome methylation profiles as independent markers of survival in stage IIIC melanoma patients. *J Transl Med*, 2012. 10: p. 185.

15. Gao L, Smit MA, van den Oord JJ, y col. Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing of MAPK13 in primary cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013. 26(4): p. 542-554.

16. Rakosy Z, Ecsedi S, Toth R, y col. Integrative genomics identifies gene signature associated with melanoma ulceration. *PLoS One*, 2013. 8(1): p. e54958.

17. Thomas NE, Slater NA, Edmiston SN, y col. DNA methylation profiles in primary cutaneous melanomas are associated with clinically significant pathologic features. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2014. 27(6): p. 1097-1105.

18. Ecsedi S, Hernandez-Vargas H, Lima SC, y col. DNA methylation characteristics of primary melanomas with distinct biological behaviour. *PLoS One*, 2014. 9(5): p. e96612.

19. Gao L, van den Hurk K, Moerkerk PT, y col. Promoter CpG Island Hypermethylation in Dysplastic Nevus and Melanoma: CLDN11 as an Epigenetic Biomarker for Malignancy. *J Invest Dermatol*, 2014. p.

20. Carmona FJ, Villanueva A, Vidal A, y col. Epigenetic disruption of cadherin-11 in human cancer metastasis. *J Pathol*, 2012. 228(2): p. 230-240.

21. Deng Z, Niu G, Cai L, y col. The prognostic significance of CD44V6, CDH11, and betacatenin expression in patients with osteosarcoma. *Biomed Res Int*, 2013. 2013: p. 496193.

22. Li L, Ying J, Li H, y col. The human cadherin 11 is a pro-apoptotic tumor suppressor modulating cell stemness through Wnt/beta-catenin signaling and silenced in common carcinomas. *Oncogene*, 2012. 31(34): p. 3901-3912.

23. Song YH, Shiota M, Kuroiwa K, y col. The important role of glycine N-methyltransferase in the carcinogenesis and progression of prostate cancer. *Mod Pathol*, 2011. 24(9): p. 1272-1280.

24. Huang YC, Chen M, Shyr YM, y col. Glycine N-methyltransferase is a favorable prognostic marker for human cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. 23(9): p. 1384-1389.

25. De Meyer T, Mampaey E, Vlemmix M, y col. Quality evaluation of methyl binding domain based kits for enrichment DNA-methylation sequencing. *PLoS One*, 2013. 8(3): p. e59068.

26. van Vlodrop IJ, Niessen HE, Derks S, y col. Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location! *Clin Cancer Res*, 2011. 17(13): p. 4225-4231.

27. van den Hurk K, Balint B, Toomey S, O'Leary P.C., Unwin L, Sheahan K, McDermott E.W., Murphy I, 2van den Oord J.J., Rafferty M, FitzGerald D, Moran J, Cummins R, MacEneaney O, Kay E, O'Brien C.P., Finn S.P., Heffron C.C.B.B., Murphy M, Yela R, Power D.G., Regan P.J., McDermott C, O'Keefe A, Orosz Z, Donnellan P.P., Crown J.P., Hennessy B.T, and Gallagher W.M.. High-throughput oncogene mutation profiling reveals demographic differences in BRAF mutation rates among melanoma patients. *Melanoma Research. Mel Res*, 2015. In press: p.

28. Sandoval J, Heyn H, Moran S, y col. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome. *Epigenetics*, 2011. 6(6): p. 692-702.

29. Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM, y col. Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol*, 2004. 26(5-6): p. 291-299.

30. Miller AJ, Mihm MC, Jr. Melanoma. *N Engl J Med*, 2006. 355(1): p. 51-65.

31. Colabroy KL, Zhai H, Li T, y col. The mechanism of inactivation of 3-hydroxyanthranilate-3,4-dioxygenase by 4-chloro-3-hydroxyanthranilate. *Biochemistry*, 2005. 44(21): p. 7623-7631.

32. Mahapatra S, Klee EW, Young CY, y col. Global methylation profiling for risk prediction of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2012. 18(10): p. 2882-2895.

33. Litovkin K, Joniau S, Lerut E, y col. Methylation of PITX2, HOXD3, RASSF1 and TDRD1 predicts biochemical recurrence in high-risk prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014. 140(11): p. 1849-1861.

34. Huang YW, Jansen RA, Fabbri E, y col. Identification of candidate epigenetic biomarkers for ovarian cancer

detection. *Oncol Rep*, 2009. 22(4): p. 853-861.

35. Huang YW, Luo J, Weng YI, y col. Promoter hypermethylation of CIDEA, HAAO and RXFP3 associated with microsatellite instability in endometrial carcinomas. *Gynecol Oncol*, 2010. 117(2): p. 239-247.

36. Welch HG, Woloshin S, Schwartz LM. Skin biopsy rates and incidence of melanoma: population based ecological study. *BMJ*, 2005. 331(7515): p. 481.

37. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, y col. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature*, 1995. 375(6527): p. 151-155.

38. Bozzacco L, Trumpfheller C, Siegal FP, y col. DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(4): p. 1289-1294.

39. Cheong C, Choi JH, Vitale L, y col. Improved cellular and humoral immune responses in vivo following targeting of HIV Gag to dendritic cells within human anti-human DEC205 monoclonal antibody. *Blood*, 2010. 116(19): p. 3828-3838.

40. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, y col. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*, 2000. 74: p. 181-273.

41. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, y col. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*, 2012. 366(26): p. 2455-2465.

42. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, y col. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 2010. 363(8): p. 711-723.

43. Griewank KG, Ugurel S, Schadendorf D, y col. New developments in biomarkers for melanoma. *Curr Opin Oncol*, 2013. 25(2): p. 145-151.

44. al-Tubuly AA, Luqmani YA, Shousha S, y col. Differential expression of gp200-MR6 molecule in benign hyperplasia and down-regulation in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*, 1996. 74(7): p. 1005-1011.

45. Tungekar MF, Gatter KC, Ritter MA. Bladder carcinomas and normal urothelium universally express gp200-MR6, a molecule functionally associated with the interleukin 4 receptor (CD 124). *Br J Cancer*, 1996. 73(4): p. 429-432.

46. Al-Tubuly AA, Spijker R, Pignatelli M, y col. Inhibition of growth and enhancement of differentiation of colorectal carcinoma cell lines by MAb MR6 and IL-4. *Int J Cancer*, 1997. 71(4): p. 605-611.

47. Kaklamanis L, Koukourakis MI, Leek R, y col. Loss of interleukin 4 receptor-associated molecule gp200-MR6 in human breast cancer: prognostic significance. *Br J Cancer*, 1996. 74(10): p. 1627-1631.

48. Haas J, Frese KS, Park YJ, y col. Alterations in cardiac DNA methylation in human dilated cardiomyopathy. *EMBO Mol Med*, 2013. 5(3): p. 413-429.

49. Giridhar PV, Funk HM, Gallo CA, y col. Interleukin-6 receptor enhances early colonization of the murine omentum by upregulation of a mannose family receptor, LY75, in ovarian tumor cells. *Clin Exp Metastasis*, 2011. 28(8): p. 887-897.

50. Chapman EJ, Kelly G, Knowles MA. Genes involved in differentiation, stem cell renewal, and tumorigenesis are modulated in telomerase-immortalized human urothelial cells. *Mol Cancer Res*, 2008. 6(7): p. 1154-1168.

51. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, y col. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*, 2013. 339(6122): p. 959-961.

52. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, y col. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science*, 2013. 339(6122): p. 957-959.

53. Griewank KG, Murali R, Puig-Butlle JA, y col. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 2014. 106(9): p.

54. Ioannidis JP. Biomarker failures. *Clin Chem*, 2013. 59(1): p. 202-204.

55. De Araujo E. *Biomed Research International*, 2015. 94(4): p. 1115-8.

56. Documento WO 2012/037128 (Univ. North Carolina).

57. Abbas, O. *The American Journal of Dermatopathology*, 2014. 36(5): p. 363-379.

58. Documento WO 2013/135830 (Univ. Ruprecht Karls Heidelberg).

59. Documento WO 2015/052537 (Oxford Biotherapeutics LTD).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universiteit Maastricht and Academisch Ziekenhuis Maastricht

<120> PROCEDIMIENTO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SUJETOS CON UN CÁNCER DE PIEL MELANOMA AGRESIVO EN EL DIAGNÓSTICO

<130> 309 WO

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado		
	<400> 1		
	ttaggatgag gataggttg g	21	
5	<210> 2		
	<211> 24		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado		
	<400> 2		
	ggataggttg ggtgatttt tggt	24	
	<210> 3		
	<211> 19		
15	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado		
	<400> 3		
20	ggttgggcga ttttcgtc	19	
	<210> 4		
	<211> 27		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
25	<220>		
	<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado		
	<400> 4		
	caactaaaa aacaacaaaa ctataac	27	
	<210> 5		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado		
35	<400> 5		
	aaactataac atcaaaacac ccaaca	26	
	<210> 6		
	<211> 22		
	<212> ADN		
40	<213> secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado		
	<400> 6		
	tataacgtcg aaacacccaa cg	22	
45	<210> 7		
	<211> 50		
	<212> ADN		
	<213> secuencia artificial		
	<220>		
50	<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado		

ES 2 732 178 T3

<400> 7
aaacaacaaa actataacat caaaacaccc aacaaactac aaaactaaca 50

5 <210> 8
<211> 50
<212> ADN
<213> secuencia artificial

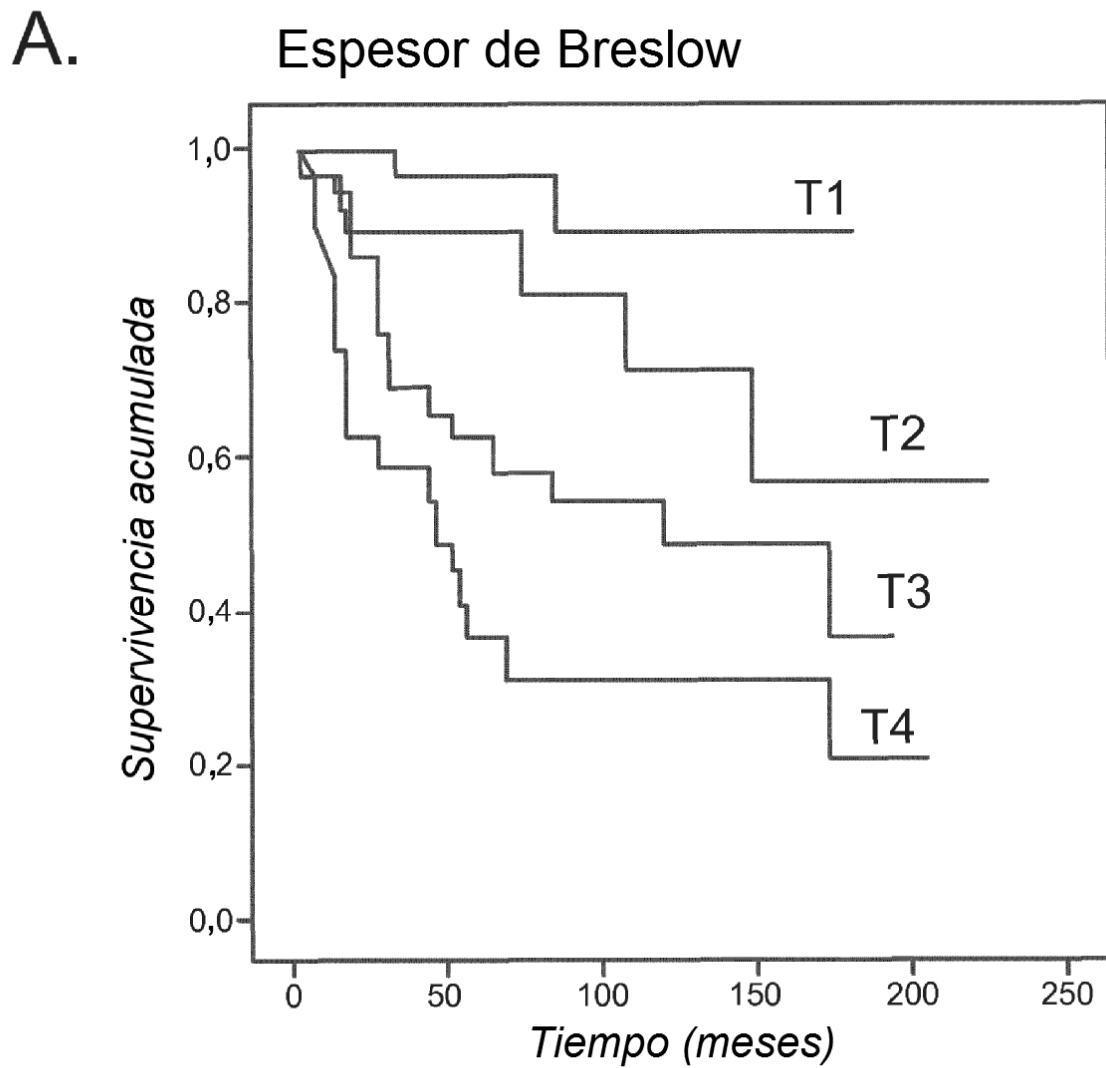
<220>
<223> Sondas y cebadores para la detección del promotor LY75 metilado

10 <400> 8
aaacaacaaa actataacgt cgaaacaccc aacgaactac gaaactaacg 50

REIVINDICACIONES

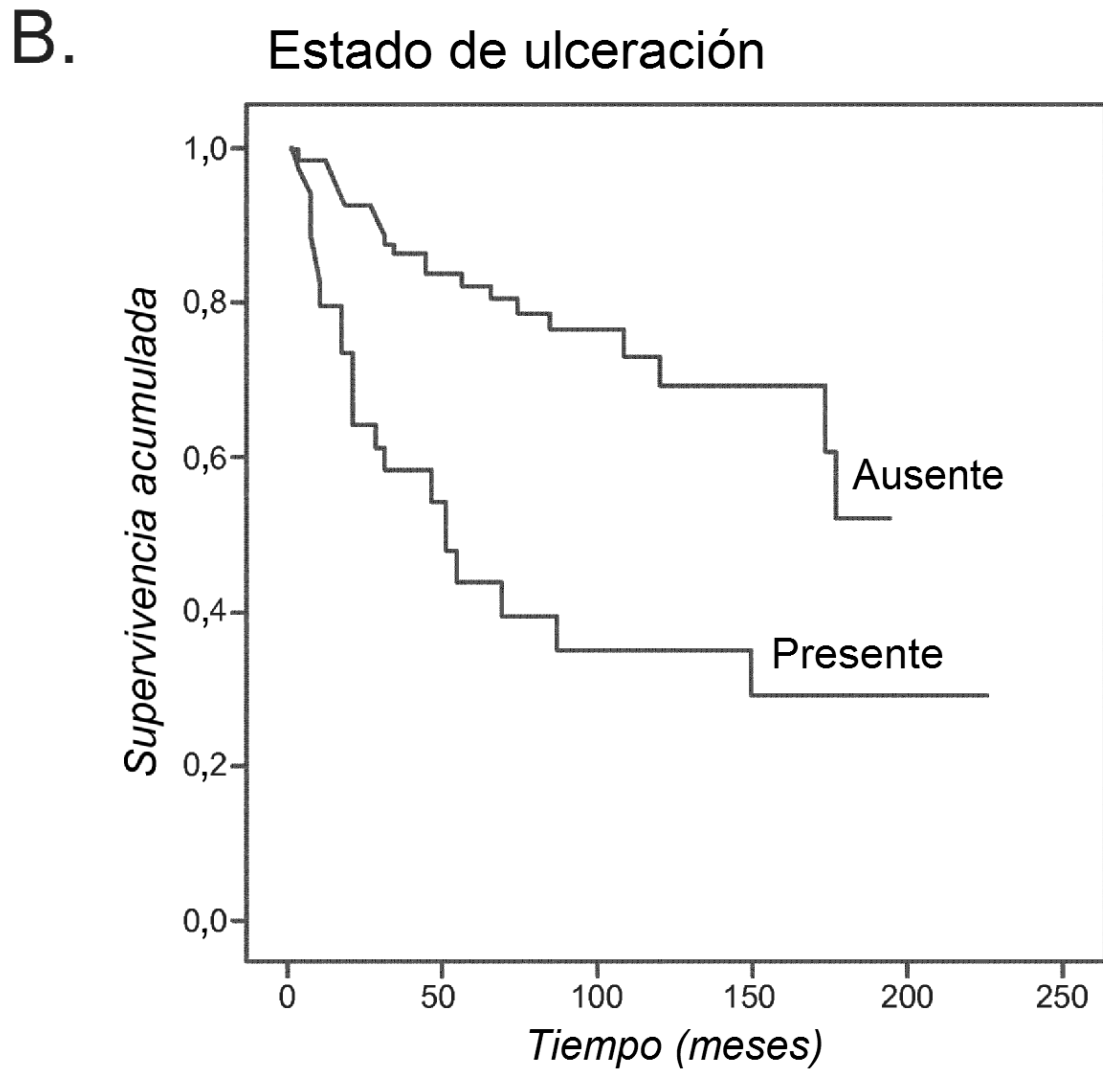
- 5 1. Un procedimiento de determinación de si un sujeto que tenga un melanoma tiene un mal pronóstico, comprendiendo el procedimiento la etapa de determinar en una muestra del sujeto si el promotor LY75 está metilado y si el promotor LY75 está metilado, clasificar el sujeto como que tiene un mal pronóstico, en el que la muestra es una muestra de melanoma.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la muestra se obtiene de una biopsia tomada del sujeto.
- 10 3. Un procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 en el que se lleva a cabo una etapa adicional seleccionada de entre el grupo que consiste en la determinación de ulceración tumoral, determinación de la enfermedad metastática en el diagnóstico, estadio de la enfermedad, y el espesor de Breslow del melanoma.
4. Un procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que la etapa de determinación en una muestra del sujeto si el promotor LY75 está metilado se lleva a cabo mediante un análisis de reacción en cadena de polimerasa múltiple específica de metilación.
- 15 5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 4 en el que la reacción en cadena de polimerasa múltiple específica de metilación se una reacción en cadena de polimerasa múltiple específica de metilación anidada.

Figura 1A

*Número en riesgo*

T1 ($\leq 1,0$ mm)	32	25	10	3	
T1 (1,0-2,0 mm)	29	19	8	4	1
T1 (2,0-4,0 mm)	29	19	12	9	
T1 ($>4,0$ mm)	33	11	5	4	1

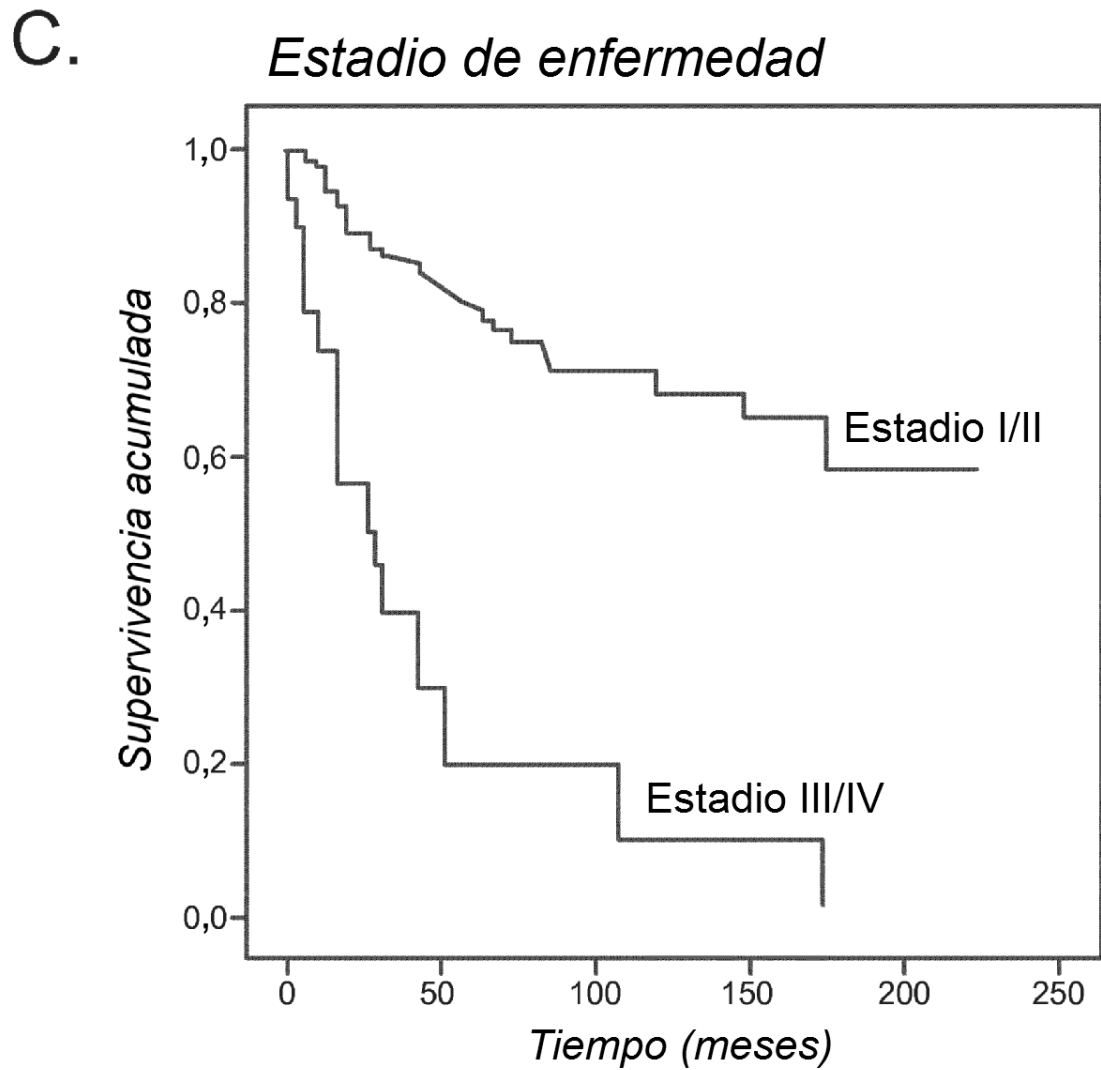
Figura 1B



Número en riesgo

Ausente	86	59	28	15	
Presente	37	15	7	5	2

Figura 1C



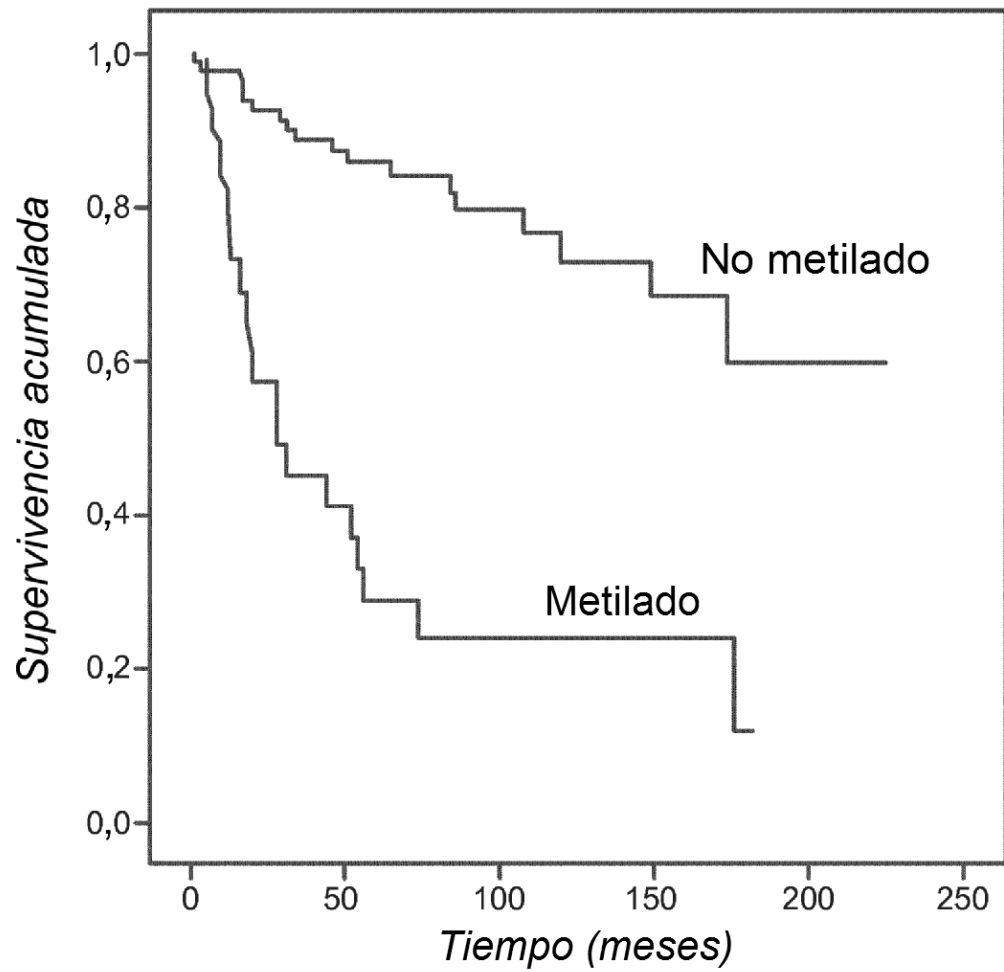
Número en riesgo

Estadio I/II	103	71	33	19	2
Estadio III/IV	20	3	2	1	

Figura 1D

D.

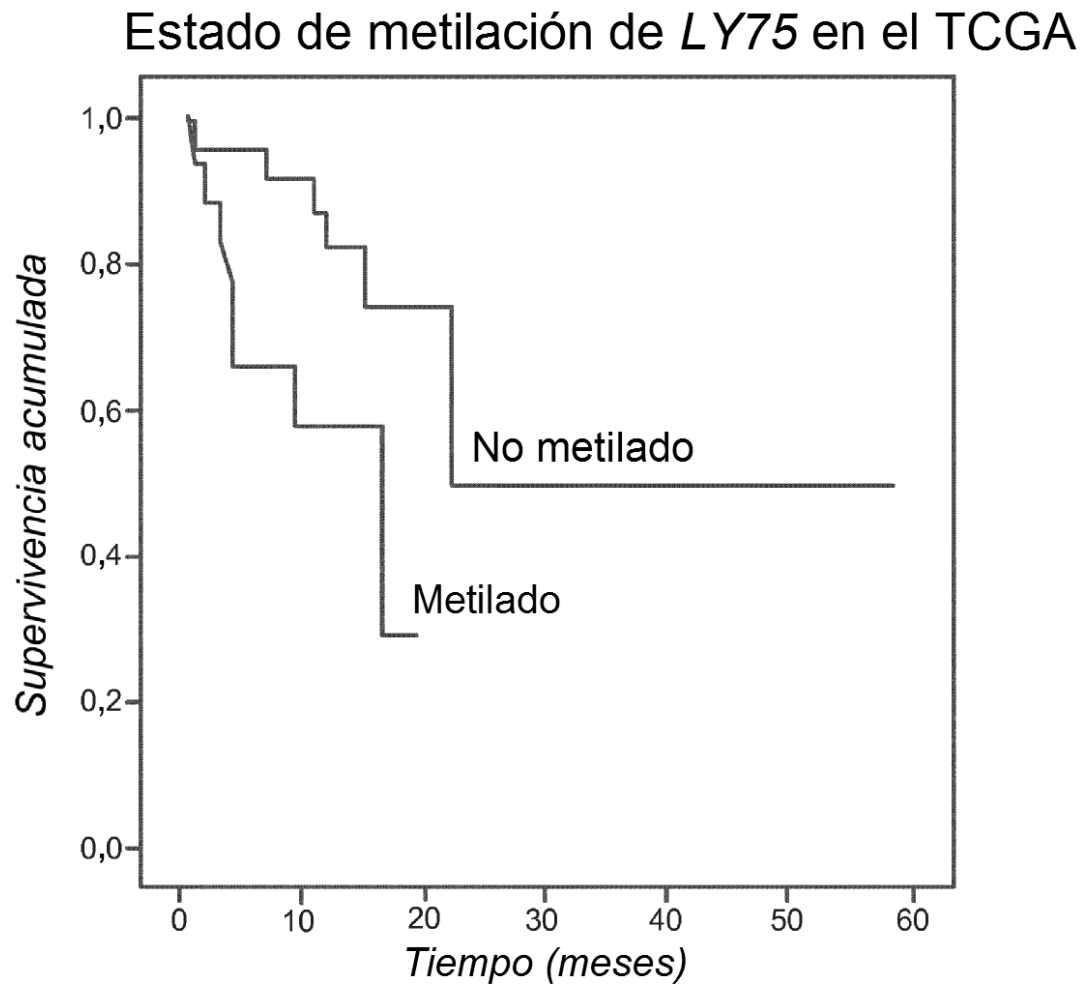
Estado de metilación de *LY75*



Número en riesgo

No metilado	85	58	29	15	2
Metilado	29	10	5	4	

Figura 2



Número en riesgo

No metilado	25	21	5	1	1	1
Metilado	19	7				