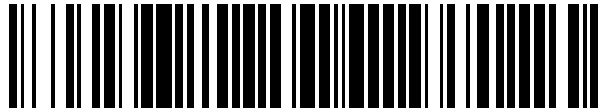


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 777**

21 Número de solicitud: 200901738

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

G01N 33/53

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **31.07.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

Fecha de la concesión: **11.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **23.01.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.01.2012

73 Titular/es:

**HOSPITAL CLINIC DE BARCELONA
CENTRO DE PATENTES DE LA UB
C/ BALDIRI REIXAC, 4
08028 BARCELONA, ES,
UNIVERSIDAD DE BARCELONA;
FUNDACIÓ CLINIC PER A LA RECERCA
BIOMÈDICA y
INSTITUT D'INVESTIGACIONS BIOMÈDIQUES
AUGUST PI I SUNYER (IDIBAPS)**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ GUILLERMO, ARMANDO;
CAMPO GÜERRI, ELÍAS;
JARES GERBOLES, PEDRO;
SALAMERO GARCÍA, OLGA y
FERNÁNDEZ PASCUAL, VERÓNICA**

74 Agente: **Segura Cámara, Pascual**

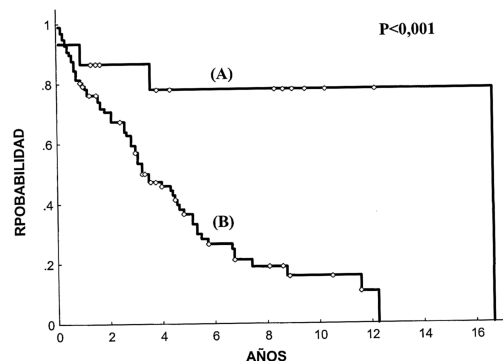
54 Título: **METODO Y KIT PARA EL PRONÓSTICO DEL LINFOMA DE CÉLULAS DEL MANTO.**

57 Resumen:

Método y kit para el pronóstico del linfoma de células del manto.

El método y el kit son útiles como herramientas para clasificar un paciente diagnosticado con linfoma de células del manto dentro de la categoría de indolente o convencional. El método comprende: a) proporcionar una muestra de un paciente que padezca MCL; b) determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: RNGTT, HDGFRP3, FARP1, HMGB3, LGALS3BP, PON2, CDK2AP1, DBN1, CNR1, CNN3, SOX11, SETMAR y CSNK1E en la muestra; y c) comparar el nivel de expresión de cada uno de los genes medidos con respecto al nivel de expresión de los mismos genes en una muestra control; donde la ausencia de expresión o la poca expresión de los genes con respecto a los mismos genes en la muestra control es indicativa del curso clínico indolente del MCL.

FIG. 1



ES 2 352 777 B1

DESCRIPCIÓN

Método y kit para el pronóstico del linfoma de células del manto.

5 La presente invención está relacionada con métodos para el pronóstico del cáncer, particularmente para el pronóstico del linfoma de células del manto, y más particularmente para el pronóstico de un tipo indolente de linfoma de células del manto.

Estado de la técnica

10 El linfoma de células del manto (MCL, "mantle cell lymphoma") es una neoplasia linfoide agresiva con una rápida evolución clínica, una débil respuesta a la terapia, frecuentes recaídas, y una supervivencia media de 3-4 años. El agresivo comportamiento biológico de este linfoma se atribuye a los peculiares mecanismos genéticos y moleculares implicados en su patogénesis que combinan la desregulación constitutiva de la proliferación celular debida a la t(11; 14) (q13; q32) y la sobreexpresión de ciclina D1, con un alto nivel de inestabilidad cromosómica relacionada con la desregulación de la respuesta al daño del ADN y la activación de los mecanismos de supervivencia de la célula. Los pacientes que padecen MCL son tratados con diferentes estrategias incluyendo regímenes intensos de quimioterapia, pero, desgraciadamente, pocos pacientes se pueden curar con las terapias actuales.

20 Además de los bien conocidos distintivos moleculares para el diagnóstico del MCL, a saber la translocación de t(11; 14) y sobreexpresión de ciclina D1, algunos autores han asociado recientemente el MCL con otros marcadores moleculares. Wang *et al.* (cfr. "The sub cellular Sox11 distribution pattern identifies subsets of mantle cell lymphoma: correlation to overall survival", *British Journal of Haematology* 2008, vol. 143, p. 248-252) describe la sobreexpresión de SOX11 en células MCL, mientras que Ortega-Paino *et al.* describe la sobreexpresión de HDGFRP3 en MCL ("Functionally associated targets in mantle cell lymphoma as defined by ADN microarrays and RNA interference". *Blood* 2008. vol. 111, p. 1617-24).

30 Estudios recientes han identificado a un grupo de pacientes diagnosticados con MCL que siguen un curso clínico muy indolente con una larga supervivencia de más de 7-10 años, algunos de ellos no necesitando tratamiento quimioterapéutico (cfr. Espinet B. *et al.*, "Clonal proliferation of cyclin D1-positive mantle lymphocytes in an asymptomatic patient: an early-stage event in the development or an indolent form of a mantle cell lymphoma?", *Human Pathology* 2005, vol. 36, p. 1232-1237; Swerdlow S.H. *et al.*, "From centrocytic to mantle cell lymphoma: a clinicopathologic and molecular review of 3 decades", *Human Pathology* 2002, vol. 33, p. 7-20). Se han reconocido también pequeños subconjuntos de pacientes con una larga evolución similar en la mayoría de estudios clínicos de este tumor (cfr. Orchard J. *et al.*, "A subset of t(11; 14) lymphoma with mantle cell features displays mutated IgVH genes and includes patients with good prognosis, nonnodal disease". *Blood* 2003. vol. 101, p. 4975-81; Martin P, *et al.*, "Outcome of deferred inicial therapy in mantle-cell lymphoma", *J. Clin. Oncol.* 2009, vol. 27, p. 1209-13).

40 Hoy en día, las herramientas de diagnóstico disponibles permiten la identificación de pacientes que padecen el MCL, pero no pueden proporcionar información sobre si la enfermedad sigue su curso de manera indolente.

Por esta razón, existe la necesidad de proporcionar medios para la identificación de un paciente que padece un cáncer indolente de linfoma de células del manto.

45 Explicación de la invención

Los inventores han encontrado que un conjunto de genes están poco expresados o no expresados en células tumorales de pacientes que padecen un linfoma de células del manto con un curso clínico indolente.

50 Hay documentos recientes en el estado de la técnica que revelan una relación entre la expresión de ciertos genes y el MCL. Entre ellos, Wang *et al.* (*supra*) establece una relación directa de la sobreexpresión de SOX11 y el diagnóstico de MCL. De hecho, muchos autores han considerado SOX11 como un biomarcador altamente fidedigno para el diagnóstico de MCL. Similarmente, otros autores han establecido la sobreexpresión de HDGFRP3 en MCL (ver Ortega-Paino *et al.*, *supra*) y que su supresión inhibiría la proliferación del tumor.

55 Sorprendentemente, los Inventores de la presente invención han observado que SOX11 y HDGFRP3, entre otros genes, no están expresados en células MCL extraídas de pacientes diagnosticados con MCL con un curso indolente de la enfermedad.

60 Así, el primer aspecto de la presente invención proporciona un método para el pronóstico de un linfoma de células del manto con un curso clínico indolente, que comprende los pasos de: a) proporcionar una muestra de un paciente que padezca linfoma de células del manto; b) determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: RING1B, HDGFRP3, FARP1, HMGB3, LGALS3BP, PON2, CDK2AP1, DBN1, CNR1, CNN3, SOX11, SEMAR y CSNK1E en la muestra; y c) comparar el nivel de expresión de cada uno de los genes medidos con respecto al nivel de expresión de los mismos genes en una muestra control;

65 donde la ausencia de expresión o la poca expresión de los genes con respecto a los mismos genes en la muestra control es indicativa del curso clínico indolente del linfoma de células del manto.

Tal como se muestra después, el conjunto de genes del método de la presente invención tiene un patrón de expresión diferencial diferente en una muestra de un paciente con linfoma de células del manto con un curso indolente cuando se compara con una muestra de un paciente que padece un MCL convencional. Particularmente, los inventores han encontrado que los genes mencionados están sobreexpresados en células derivadas de MCL convencional y poco expresados o no expresados en iMCL. Este patrón de expresión diferencial hace del método relacionado con el primer aspecto de la invención una valiosa herramienta que permite distinguir con alta precisión entre las dos formas de MCL, el convencional (cMCL, que está relacionado con una progresión rápida y agresiva de la enfermedad) y el indolente (iMCL, que está relacionado con una progresión menos agresiva de la enfermedad).

Hasta ahora, las herramientas disponibles en el estado de la técnica han sido para el diagnóstico de MCL como un linfoma altamente agresivo. De esta manera, cuando se diagnosticaba al sujeto con MCL se le sometía a quimioterapia (que es el tratamiento más agresivo para evitar la progresión del tumor).

Ventajosamente, se puede utilizar el método de la presente invención para identificar a aquellos pacientes con iMCL, que se caracterizan por tener una evolución lenta, en comparación con pacientes con cMCL, que se caracterizan por un tumor altamente agresivo. En otras palabras, el método de la invención puede utilizarse como una herramienta para clasificar un paciente diagnosticado con MCL dentro de la categoría de indolente o convencional. Los pacientes que padecen de una forma indolente de MCL tienen una supervivencia más larga y no necesitan tratarse con una quimioterapia agresiva mientras que los pacientes con cMCL necesitan estar sujetos inmediatamente a una terapia intensiva. Hasta la fecha, no se podía predecir la forma indolente de la enfermedad de ninguna manera, resultando así en la administración de terapias agresivas en pacientes que no las necesitarían y causándoles un sufrimiento innecesario. Consecuentemente, el método de invención es de importancia para el campo de la terapia del cáncer porque permitirá a la comunidad médica la aplicación de estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo en pacientes que padecen MCL.

Como muestra de control de la etapa c), los inventores han utilizado células tumorales extraídas de pacientes a los que se les ha diagnosticado cMCL, es decir pacientes que necesitan terapia a causa de la rápida progresión (siguiendo los criterios estándar descritos por Cheson B.D. *et al.*, Revised Response Criteria for Malignant Lymphoma”, *J. Clin. Oncol.* 2007, vol. 25, p. 579-86).

Por “pronóstico” se incluye el acto o proceso de predecir el curso y el resultado probables de un linfoma, p. ej. determinando la probabilidad de supervivencia.

SOX11 (SRY (región Y determinante del sexo)- caja 11) codifica un miembro de la familia SOX de los factores de transcripción implicados en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino de la célula. Las proteínas se agrupan dentro de esta familia si contienen un dominio HMG (del inglés High Mobility Group) de unión al ADN con una similitud alta en 25 aminoácidos (habitualmente >50%) respecto al dominio HMG de Sry, una proteína determinante del sexo. La secuencia del gen está disponible en la base de datos Genbank con el número de referencia NM_003108. La proteína codificada por SOX11 puede actuar como un regulador transcripcional después de formar un complejo de proteínas con otras proteínas. La proteína puede funcionar en el sistema nervioso en vías de desarrollo y en tumorigénesis. Hay documentos recientes en el estado de la técnica que revelan una relación directa entre la sobreexpresión de SOX11 y el diagnóstico de MCL. Sorprendentemente, tal como se muestra en los ejemplos de abajo, los inventores han observado que el SOX11 no se expresa en células MCL extraídas de pacientes con un curso indolente de la enfermedad.

HDGFRP3 (factor de crecimiento derivado del hepatoma, proteína 3 relacionada, número de referencia de Genbank NM_016073.2) es un miembro de la familia del factor de crecimiento derivado del hepatoma (HDGF). Los HDGFs comparten todos un motivo de secuencia común en su dominio N-terminal, llamado la región HATH (homólogo al término amino de HDGF). Se ha descrito que el HDGF estimula el crecimiento de fibroblastos y de algunas células de hepatoma. Autores anteriores han descrito la sobreexpresión de HDGFRP3 en MCL, y que su inactivación inhibe la proliferación. Sin embargo, los inventores han observado que sorprendentemente las células extraídas de un MCL que tiene un curso clínico indolente, no tienen expresión para este gen.

CNN3 (calponina 3, número de referencia de Genbank NP_001830.1) codifica una proteína con un extremo C-terminal marcadamente ácido que se asocia con el citoesqueleto pero que no está implicado en la contracción.

Originalmente, se aisló FARP1 (FERM, RhoGEF (ARHGEF) y proteína 1 de dominio pleckstrina (derivada de condrocito), número de referencia de Genbank NM_001001715) por medio de hibridación sustractiva debido a su expresión aumentada en condrocitos diferenciados versus condrocitos desdiferenciados. La proteína resultante contiene un dominio predicho del tipo ezrina, un dominio de homología Dbl, y un dominio de homología de pleckstrina. Se cree que es un miembro de la superfamilia de la banda 4.1 cuyos miembros unen el citoesqueleto a la membrana de célula. Para este gen se han encontrado dos variantes transcripcionales producidas por corte y empalme alternativo que codifican isoformas distintas.

PON2 (paraoxonasa 2, número de referencia de Genbank NM_000305) codifica un miembro de la familia del gen del paraoxonasa, que incluye tres miembros conocidos situados adyacentes entre ellos en el brazo largo del cromosoma 7. La proteína codificada se expresa ubicuamente en tejidos humanos, unida a la membrana, y puede actuar como un antioxidante celular, protegiendo a las células del estrés oxidativo. La actividad hidrolítica contra las lactonas

acilhomoserina, que son importantes mediadores bacterianos de quorum sensing, sugiere que la proteína codificada puede también tener un papel en las respuestas de defensa a las bacterias patogénicas. Se pueden asociar las mutaciones en este gen con una enfermedad vascular y con un número de fenotipos cuantitativos relacionados con la diabetes.

5 DBN1 (drebrina 1, número de referencia de Genbank NM_004395) codifica una proteína citoplásmica de unión a la actina que se cree que hace un papel en el proceso de crecimiento neuronal. Es un miembro de la familia de proteínas drebrina que están reguladas durante el desarrollo en el cerebro.

10 RNGTT (ARN guaniltransferasa y 5-fosfatasa, número de referencia de Genbank NM_003800) codifica una enzima que tiene actividades en la adición de la caperuza al ARNm y en la defosforilación de aminoácidos de las proteínas.

15 CSNK1E (caseína quinasa 1 epsilon, número de referencia de Genbank NM_001894) codifica una serina/treonina proteína quinasa y un miembro de la familia de proteínas de caseína quinasa I, cuyos miembros se han relacionado con el control de procesos citoplasmáticos y nucleares, incluyendo la replicación y reparación del ADN.

Se ha descrito que SETMAR (gen de fusión del dominio SET y mariner transposasa, número de referencia de Genbank NM_006515) está implicado en la reparación y transposición del ADN.

20 HMGB3 (grupo de alta movilidad caja 3, número de referencia de Genbank NM_005342) pertenece a la superfamilia de proteína del grupo de alta movilidad (HMG). Como HMG1 (MIM 163905) y HMG2 (MIM 163906), HMGB3 contiene cajas dominio de unión al ADN y se clasifica dentro de la subfamilia "HMG box". Se cree que miembros de la subfamilia "HMG box" tienen un papel fundamental en la replicación del ADN, en el ensamblaje del nucleosoma y en la transcripción.

25 Parece ser que LGALS3BP (lectina, de unión a galactósido, soluble, 3 proteína de unión, número de referencia de Genbank NM_005567) está implicado en la respuesta inmune asociada con las células asesinas naturales (NK) y la citotoxicidad de las células asesinas activadas por linfoquinas (LAK).

30 CDK2API (proteína asociada a CDK2 1, número de referencia de Genbank NM_004642) codifica una proteína que regula negativamente la actividad de CDK2 secuestrando la forma monomérica de CDK2, y dirigiendo a CDK2 hacia la proteólisis. Se descubrió que esta proteína también interacciona con la ADN polimerasa alfa/primasa y actúa de mediadora en la fosforilación de la subunidad grande p180, que sugirió un papel regulatorio en la replicación de ADN durante la fase S del ciclo celular.

35 CNR1 (receptor de cannabinoide tipo 1, número de referencia de Genebank NM_016083) codifica una proteína que se encuentra en el cerebro y se activa por la droga psicoactiva cannabis y por un grupo de neurotransmisores endocannabinoides. Se sabe que la proteína está implicada en la lipogénesis, la actividad gastrointestinal, la actividad cardiovascular y el dolor.

40 En una realización del primer aspecto de la invención se selecciona al menos uno de los genes del grupo que consiste en: SOX11, FARP1, PON2, HDGFRP3, CNN3, DBN1, y HMGB3. Tal como se muestra en los ejemplos de abajo, estos genes están expresados más diferencialmente en células iMCL comparativamente con células cMCL. Entre los genes mencionados, los genes con mejor expresión diferencial son SOX11, HDGFRP3 y CNN3. Más preferiblemente, el método de la invención se lleva a cabo determinando el nivel de expresión de SOX11.

45 De acuerdo con la presente invención, el pronóstico del iMCL puede realizarse determinando la expresión de al menos uno de los genes mencionados anteriormente. De esta manera, el experto en la materia puede elegir determinar: (a) la expresión de solo uno de los genes anteriores, (b) la expresión de varios genes, o (c) la expresión de todos los genes mencionados anteriormente. Preferiblemente, se determinará la expresión de los genes detallados en las realizaciones preferidas. Por ejemplo, la persona experta en la materia puede elegir determinar la expresión de SOX11 y CNN3, solos o junto a uno o más genes de la lista de 13 genes mencionados anteriormente. También se podría llevar a cabo el método de la invención determinando la expresión de los genes SOX11, FARP1, PON2, CNN3, DBN1 y HMGB3. También será aparente para el experto en la materia que el método de la invención puede utilizarse junto con otros marcadores diagnósticos o pronósticos clínicos, patológicos o moleculares para complementar la información obtenida por los mencionados biomarcadores en el diagnóstico o pronóstico del MCL.

50 En el sentido de la presente invención, se pueden realizar determinaciones cualitativas, semi-cuantitativas o cuantitativas del nivel de expresión de los genes mencionados. El nivel de expresión de un gen se puede determinar a nivel genómico, detectando la cantidad de ARNm que ha sido transcrito del mencionado gen, o a un nivel proteómico, detectando la cantidad de proteína codificada por el mencionado gen que ha sido traducida en la célula.

55 Así, en otra realización del primer aspecto de la invención, la determinación del nivel de expresión de la etapa (b) se lleva a cabo determinando la cantidad de ARNm del (los) gen(es) mencionado(s). Los métodos para determinar la cantidad de ARNm de un gen particular en una muestra son bien conocidos en el estado de la técnica.

65 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, "polymerase chain reaction") es el método más extensamente utilizado para la amplificación enzimática *in vitro* de los ácidos nucleicos, pero no es el único. Se puede utilizar la reacción

en cadena de la ligasa (LCR, “ligase chain reaction”) por ejemplo, para la detección sensible de una secuencia de ADN con una especificidad mayor en comparación con la PCR (se puede utilizar la LCR para la discriminación entre alelos). Durante la LCR, para cada una de las dos cadenas de ADN, se unen dos sondas parciales para formar la real; así, la LCR utiliza dos enzimas: una ADN polimerasa y una ADN ligasa. Cada ciclo resulta en la duplicación de la molécula de ácidos nucleico diana.

Un método cuantitativo para la determinación de ácidos nucleicos es la PCR a tiempo real. Se utiliza la PCR a tiempo real, también llamada PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR), para amplificar y cuantificar simultáneamente una molécula diana de ADN. El procedimiento sigue el principio general de la reacción en cadena de polimerasa; su característica clave es que se cuantifica el ADN amplificado tal como se acumula en la reacción a tiempo real después de cada ciclo de amplificación. Dos métodos comunes de cuantificación son la utilización de marcadores fluorescentes que se intercalan en el ADN de doble cadena, y de sondas oligonucleotídicas de ADN modificadas que emiten fluorescencia cuando hibridan con un ADN complementario.

Se han desarrollado más estrategias basadas en la PCR original para la amplificación de ARN, como la transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR). En esta técnica, se transcribe primero de forma reversa la cadena de ARN en su ADN complemento o ADN complementario, seguido de la amplificación del ADN resultante utilizando la reacción en cadena de la polimerasa. Otro método que se utiliza en biología molecular para amplificar las secuencias de ARN es la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA, “nucleic acid sequence based amplification”). Explicado brevemente, NASBA trabaja de la siguiente manera: (a) se suministra el molde de ARN a la mezcla de reacción y el primer cebador se une a su lugar complementario en el extremo 3’ del molde; (b) la transcriptasa reversa sintetiza la opuesta, la cadena de ADN complementario; (c) la ARNasa H destruye el molde de ARN (la ARNasa H solamente destruye el ARN en híbridos ARN-ADN, pero no el ARN de cadena sencilla); (d) el segundo cebador se une al extremo 5’ de la cadena de ADN y la 5-T7 ARN polimerasa produce una cadena complementaria de ARN que se puede utilizar otra vez en la etapa (a). Se ha introducido el NASBA en diagnósticos médicos, donde ha mostrado dar resultados más rápidos que la PCR, y también puede ser más sensible. La transcripción reversa seguida de PCR y NASBA son técnicas adecuadas para la determinación de la expresión del gen.

Preferiblemente, el nivel de expresión de los genes se determina por RT-PCR. Más preferiblemente, el método para determinar el nivel de expresión de los genes es la transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa.

Otras técnicas apropiadas para la determinación de la expresión de los genes es el cribado mediante microarray, el cribado mediante microarray y el cribado mediante nanoarray.

En otra realización del primer aspecto de la invención, el nivel de expresión del/los gen(es) seleccionado(s) se determina por la cantidad de proteína(s) codificadas por el/los mencionado(s) gen(es).

Se conocen varios métodos en el estado de la técnica para determinar la cantidad de una proteína determinada en una muestra. Generalmente, estos métodos utilizarán grupos de unión.

Por “grupo de unión” se entiende una molécula o segmento de molécula capaz de unirse específicamente a una proteína diana (en el presente caso la proteína diana es la proteína codificada por el gen del cual se determina su expresión). Preferiblemente el grupo de unión puede ser una molécula polipeptídica (como un anticuerpo o fragmento del mismo) o un aptámero de ácido nucleico, entre otros.

Los grupos de unión polipeptídicos se pueden identificar por medio de un método de cribado. Un método de cribado apropiado para identificar péptidos u otras moléculas que se unen selectivamente a una proteína diana puede comprender el contacto de la proteína diana con un péptido u otra molécula de prueba bajo condiciones en las cuales puede tener lugar la unión, y entonces determinar si la molécula o el péptido de prueba se ha unido a la proteína o péptido diana. En el campo de la bioquímica se conocen bien los métodos de detección de la unión entre dos grupos. Las moléculas de unión polipeptídicas utilizadas más frecuentemente son anticuerpos.

“Anticuerpo” se refiere a un anticuerpo completo, incluyendo sin limitación un anticuerpo quimérico, recombinante, transgénico, humanizado, injertado y de una única cadena, y similares, así como cualquier proteína de fusión, sus conjugados, sus fragmentos, o sus derivados que contengan uno o más dominios que se unen selectivamente a la proteína diana o péptido. Un fragmento de anticuerpo significa un Fv, un Fv unido por enlace disulfuro, scFc, Fab, Fab’, o fragmento F(ab’)2, que se conocen bien en el campo, o cualquier parte del anticuerpo con tamaño y conformación adecuados para unirse a la proteína diana o péptido. Hay varias ventajas derivadas de utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. Por ejemplo, el tamaño más pequeño de los fragmentos puede llevar a una mejor penetración en el lugar diana, y se eliminan funciones efectoras de anticuerpos completos como la fijación del complemento. Los Fab, Fv, ScFv y fragmentos de anticuerpo dAb pueden expresarse y excretarse en *E. coli*, permitiendo así una producción fácil de grandes cantidades de estos fragmentos. Cuando se utilizan anticuerpos completos para la presente invención, se prefieren anticuerpos monoclonales.

Como se indica antes, los aptámeros también son grupos de unión preferidos. Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico que están diseñados de tal manera que pueden unirse a la molécula diana deseada (en el presente caso la molécula diana es la proteína codificada por el gen del cual se determina su expresión) y mostrar resistencia a nucleasa. Los aptámeros pueden sintetizarse a través de rondas repetidas *in vitro* de partición, selección y amplificación, una

metodología conocida en el estado de la técnica como “SELEX”. Alternativamente, pueden sintetizarse por ejemplo por fase sólida “stepwise”.

Los grupos de unión como los anticuerpos se utilizan frecuentemente para la determinación de la expresión de una proteína determinada dentro de una célula por medio de técnicas inmunohistoquímicas o inmunofluorescentes. Preferiblemente, la técnica a utilizar en la presente invención es la inmunohistoquímica (IHC). La IHC es una técnica bien conocida que se utiliza ampliamente para comprender la distribución y localización de biomarcadores y proteínas expresadas diferencialmente en diferentes partes de un tejido biológico.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un kit para llevar a cabo el método de acuerdo al primer aspecto de la invención, que comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: RNGTT, HDGFRP3, FARP1, HMGB3, LGALS3BP, PON2, CDK2AP1, DBN1, CNR1, CNN3, SOX11, SEMAR, y CSNK1E. Preferiblemente el kit comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: SOX11, HDGFRP3, CNN3, FARP1, PON2, DBN1 y HMGB3. Más preferiblemente, el kit comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: SOX11, HDGRP3 y CNN3. Todavía más preferiblemente, el kit comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de SOX11.

El kit puede incluir medios específicos para la determinación del ARNm del/los gen(es) por una transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa. El kit puede contener entonces todos los reactivos necesarios y controles para realizar la transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa, incluyendo oligonucleótidos apropiados como cebadores para la amplificación de los genes seleccionados.

En otra realización del segundo aspecto de la invención, el kit contiene medios adecuados para determinar la cantidad de proteína codificada por al menos uno de los genes mencionados anteriormente.

El kit de la invención puede contener grupos de unión que se unen específicamente a las proteínas codificadas por los genes mencionados y también medios adicionales para realizar la determinación de las mencionadas proteínas. Por ejemplo, si la técnica seleccionada es el western blot, el kit puede contener también soluciones tampón y reactivos para electroforesis y transferencia, así como reactivos de desarrollo y muestras de control, como marcadores de peso molecular de proteína. Si la técnica a utilizar es IHC el kit puede adicionalmente contener reactivos y controles para realizar la IHC.

Se puede utilizar el kit proporcionado por la invención presente en la práctica clínica rutinaria para identificar pacientes que padecen un MCL con un curso clínico indolente, diferenciando así estos pacientes de otros pacientes que padecen un tipo de enfermedad más convencional y agresiva. Con el kit de la invención los médicos podrán aplicar estrategias de tratamiento más individualizadas y adaptadas al riesgo de los pacientes que padezcan MCL.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere al uso de SOX11 como marcador para el pronóstico de un linfoma de células del manto con un curso clínico indolente.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención. Además, la presente invención cubre todas las posibles combinaciones de realizaciones particulares y preferidas aquí indicadas.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1: Estimación de Kaplan-Meier de la supervivencia total en 112 pacientes con MCL en las series de validación en relación con la expresión SOX11 tal como está determinada por inmunohistoquímica de tejidos tumorales fijados en formalina e incluidos en parafina. Cada línea representa un subgrupo de pacientes MCL tal como están definidos por la expresión SOX11: A) pacientes con expresión negativa de SOX11 (n=15, fallecidos: 4); y B) pacientes con expresión positiva de SOX11 (n=97, fallecidos: 68).

Ejemplos

A) Población en estudio

Se seleccionaron para el estudio doce pacientes diagnosticados con MCL (desde mayo de 1994 a agosto de 2005) que mostraban un curso clínico indolente durante más de dos años (media 6.4 años; rango de 2.5 a 10.4) sin quimioterapia. Estos casos fueron llamados MCL indolente (iMCL) y se compararon con 15 convencionales MCL (cMCL) que requerían quimioterapia y tenían disponibles células tumorales en sangre periférica. Todos los casos tenían la t(11; 14) y expresaban ciclina D1. Diez de los 12 iMCL habían sido diagnosticados inicialmente como linfomas esplenicos de la zona marginal (SMZL) (4 casos), leucemia linfocítica crónica (CLL) (4 casos), o neoplasia leucémica linfoide, no especificada de otra manera (2 casos) y reclasificados como MCL durante la evolución de la enfermedad cuando se identificó una translocación t(11; 14) y una sobreexpresión de ciclina D1. Se diagnosticó a los dos pacientes

adicionales con un MCL incidental “*in situ*” en una biopsia de ganglio linfático en la cual las células positivas de ciclina D1 estaban restringidas a la zona del manto de folículos de otra manera reactivos. A pesar del diagnóstico de MCL, no se consideró a ninguno de los 12 pacientes para quimioterapia a causa de la evidencia de una enfermedad estable indolente desde el momento del diagnóstico inicial hasta la reclasificación como MCL, o a causa de la limitada enfermedad. Las características principales de los 12 iMCL y los 15 cMCL se resumen en la Tabla 1.

TABLA 1

Características clínicas y patológicas de los 12 iMCL y los 15 cMCL

	iMCL (n=12)	cMCL (n=15)	Valor P
Datos clínicos y patológicos†			
Media de edad (rango)	58 (41-75)	67 (30-83)	NS
Sexo (Hombre / Mujer)	9 / 3	11 / 4	NS
B síntomas (%)	0	33	0.03
ECOG \geq 2 (%)	0	70	0.01
Presentación ganglionar (ganglios linfáticos >1 cm) (%)*	17	93	<0.001
Esplenomegalia palpable (%)	50	60	NS
Afectación GI (%)†	100	50	NS
Afectación médula ósea (%)†	92	91	NS
Recuento WBC >10x10 ⁹ /L (%)†	33	82	NS
Recuento de linfocitos >5x10 ⁹ /L (%)†	44	82	NS
Linfocitos atípicos (%)	92	91	NS
Suero alto LDH* (%)†	0	46	0.03
Suero alto β_2 microglobulina (%)†	20	80	NS
MIPI de riesgo intermedio o alto (%)†	0	46	0.016
Morfología			
Célula pequeña (%)	67	13	0.007
Clásica	33	74	
Blastoide	-	13	
CD5+ (%)†	64	93	NS
Hipermutaciones del gen <i>IGHV</i> (>5%)†	70	20	< 0.04
Perfil genómico†			
0-1 alteraciones	100	13	<0.001
\geq 2 alteraciones	0	87	

Datos evolutivos

Esplenectomía (%)	42	20	
Quimioterapia en cualquier momento (%)	17	100	
Seguimiento medio en años (rango)‡	6.4 (2.5-10.4)	3.3 (1.5-5.1)	NS
Pacientes fallecidos (%)	0	47	<0.001
Supervivencia global de 5 años (%)	100	49	0.03

iMCL: linfoma indolente de células del manto; cMCL: linfoma convencional de células del manto; NS: no significativo; MIPI: índice internacional de pronóstico de linfoma de células del manto.

* Los dos pacientes iMCL con relación nodular tenían un nódulo linfático aislado en la región cervical.

† La afectación gastrointestinal (GI) fue valorada en 8 pacientes cMCL y 4 pacientes iMCL; el índice internacional de pronóstico de linfoma de células del manto (MIPI) (cfr. Hoster E., *et al*, "A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma", *Blood* 2008, vol. 111, p. 558-65) fue determinado en 13 cMCL y 8 iMCL; las mutaciones *IGVH* y el SNP-array fueron estudiados en 10 y 7 iMCL, respectivamente y en todos los cMCL; los recuentos de sangre periférica, LDH, β_2 microglobulin, la relación médula de hueso, y la expresión de CD5 se pudo valorar en 23, 21, 18, 20 y 25 casos, respectivamente.

‡ Seguimiento de los pacientes supervivientes.

Los pacientes con iMCL tenían enfermedad leucémica (11 pacientes) y ninguna evidencia (10 pacientes) o solamente una linfadenopatía aislada (>1 cm) (2 pacientes). Se relacionan las principales características de los pacientes en la Tabla 1 de arriba. Se realizó una esplenectomía a 5 pacientes y ninguno recibió quimioterapia al diagnóstico. Después de un seguimiento medio de 6.4 años, dos pacientes mostraron una progresión de la enfermedad a 5 y 7 años después del diagnóstico. Un paciente recibió clorambucil y finalmente fue esplenectomizado. El otro desarrolló una linfadenopatía periférica y una afectación gastrointestinal y fue tratado con rituximab-clorambucil, obteniendo una respuesta completa.

B) Análisis de la expresión génica

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de 7 iMCL y 15 cMCL por medio de centrifugación en gradiente, se congelaron en dimetil sulfóxido (DMSO) y se guardaron en nitrógeno líquido hasta su análisis. Se purificaron las células tumorales (>98% como determinadas por citometría de flujo) utilizando microbolas magnéticas anti-CD19 (Miltenyi Biotech®, Bergisch Gladbach, Alemania). Se purificaron también células tumorales periféricas de 17 CLL, 7 linfoma folicular (FL), 4 SMZL, 3 "hairy cell" leucemias (HCL), y 2 HCL-variantes (HCLv) diagnosticadas en relación con la clasificación WHO (cfr. Swerdlow S.H. *et al.*, (Eds) "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues", 2008, Fourth Edition. Lyon: IARC press).

Se extrajo el ARN total de las células tumorales purificadas con el reactivo TRIzol® siguiendo las recomendaciones del fabricante (Invitrogen Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). Se examinó la integridad del ARN con el Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies®, Palo Alto, CA, USA) y solamente se hibridizaron muestras de ARN de alta calidad con arrays Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 plus 2.0 (Affymetrix®), según los protocolos standard de Affymetrix. El análisis de las imágenes escaneadas y la determinación del valor de señal para cada juego de sondas del array se obtuvieron con el GeneChip® Operating Software (GCOS, Affymetrix®). Se realizó la normalización de datos por medio del método global de escala con una intensidad diana establecida en 150. Se realizó el análisis

de datos con el DNA-Chip analyzer software 2006 (dChip, Boston, MA, USA) y BRB-Array Tools, v.3.6.0 software® (cfr. Simón R.M. *et al.*, “Design and Analysis of ADN Microarray Investigations” 2004, New York: Springer-Verlag). Para realizar un análisis no supervisado de todos los casos B-NHL, los genes se filtraron según la desviación estándar (SD) a través de las muestras ($1 < SD < 1000$) y el nivel de expresión (\log_2 señal ≥ 7 en $\geq 10\%$ de muestras). En total se retuvieron 3644 juegos de sondas después de aplicar los criterios de filtrado descritos arriba, y se utilizaron para el análisis de agrupamiento usando una correlación centrada como distancia métrica y conexión de promedio. Se evaluó la solidez del grupo utilizando la medida R (reproducibilidad) descrita por McShane *et al.* (cfr. “Methods for assessing reproducibility of clustering patterns observed in analysis of microarray data”, *Bioinformatics* 2002, vol. 18, p. 1462-9) e implementada en BRB-Array Tools. Un R de 1 significa una perfecta reproducibilidad de ese grupo, y un R de 0 significa no reproducibilidad del grupo. Para el análisis supervisado de muestras MCL, se determinaron las llamadas de detección de gen con el software dChip y solamente se consideraron para un análisis posterior los juegos de sondas que estaban presentes en por lo menos 75% de casos de MCL indolentes y convencionales. Además, se asignó un valor arbitrario de 10 antes de la transformación \log_2 a los juegos de sondas con una expresión por debajo de 10 antes de la transformación \log_2 . En total, se utilizaron 22732 juegos de sondas para el análisis diferencial de expresión génica utilizando el método de análisis significativo de datos de microarrays (SAM) implementado en BRB-Array Tools (cfr. Simón R.M. *et al.*, *supra*). Se utilizaron dos niveles de significación para detectar los genes expresados diferencialmente, considerando una Proporción de Descubrimiento Falso media (FDR) < 0.1 y un percentil nonagésimo FDR < 0.1 .

Se calculó el valor de la firma de proliferación molecular de los tumores tal como la describe Rosenwald *et al.* (cfr. “The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma”, *Cancer Cell* 2003, vol. 3, p. 185-97) utilizando 18 genes de los 20 de la firma de proliferación que estaban presentes en el Affymetrix GeneChip® Human Genome U133 plus 2.0. Cuando más de un juego de sondas estaba presente para un gen específico los inventores utilizaron el promedio como el valor de expresión génica para ese gen. Se estandarizaron a través de las muestras los valores de expresión génica y se informó del promedio de los dieciocho genes como un valor de la firma de proliferación para cada muestra.

Para determinar la relación molecular de iMCL con cMCL y otras neoplasias leucémicas linfoides los inventores compararon el perfil de expresión génica de 7 iMCL, 15 cMCL, 17 CLL, 7 FL, 4 SMZL, 3 HCL y 2 HCLv. El análisis no supervisado jerárquico de grupo reveló que todas las muestras estaban agrupadas según su diagnóstico en cuatro grupos principales correspondiendo a SMZL/HCL/HCLv, CLL, MCL, y FL (datos no mostrados). Se agruparon juntos los iMCL y cMCL en un grupo robusto (R-index=0.997). Este resultado apoya la idea que el iMCL y el cMCL comparten un perfil de expresión génica común que es diferente de las otras neoplasias leucémicas linfoides.

El grupo MCL mostró una distribución asimétrica de cMCL y de iMCL en dos subgrupos. Los inventores realizaron un análisis supervisado para identificar los genes expresados diferencialmente entre los dos subtipos utilizando el algoritmo de análisis significativo de datos de microarrays (SAM). Cuando los inventores consideraron una Proporción de Descubrimiento Falso media (FDR) < 0.1 , se seleccionaron 569 juegos de sondas como diferencialmente expresadas (datos no mostrados). Un análisis más riguroso (percentil nonagésimo FDR < 0.1) identificó 23 juegos de sondas correspondiendo a trece genes anotados: RNGTT, HDGFRP3, FARP1, CSNK1E, SETMAR, HMGB3, LGALS3BP, PON2, CDK2AP1, DBN1, CNR1, CNN3, y SOX11 (Tabla 2). Estos genes estaban expresados fuertemente en 13 de los 15 cMCL y poco expresados en todos los iMCL.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 2

Lista de genes expresados diferencialmente entre los casos iMCL y cMCL cases

Gen	Juego de sondas	GMI* iMCL	GMI* cMCL	GMI* ratio	Valor P
RNGTT	211849_s_at	138.15	814.45	0.17	6.20 x10 ⁻⁶
HDGFRP3	209524_at	10.66	265.27	0.04	1.23 x10 ⁻⁵
FARP1	239246_at	16.53	160.82	0.10	1.51 x10 ⁻⁵
HMGB3	225601_at	20.86	130.16	0.16	1.57 x10 ⁻⁵
LGALS3BP	200923_at	58.71	385.44	0.15	4.69 x10 ⁻⁵
PON2	210830_s_at	16.13	183.59	0.09	4.93 x10 ⁻⁵
CDK2AP1	201938_at	239.26	1008.01	0.24	5.16 x10 ⁻⁵
DBN1	202806_at	13.78	110.52	0.12	8.40 x10 ⁻⁵
CNR1	1560225_at	88.01	911.88	0.10	0.00014
CNN3	201445_at	15.98	139.98	0.11	0.00026
SETMAR	206554_x_at	52.50	150.67	0.35	0.00027
SOX11	204913_s_at	33.52	691.44	0.05	0.00027
CSNK1E	202332_at	158.63	342.79	0.46	0.00030

* GMI: Media geométrica de intensidades

Tres de estos genes, SOX11, HDGFRP3, y CNN3, se expresaron mucho en 13 de los 15 cMCL y fueron virtualmente negativos en todos los iMCL (P<0.001). No se detectaron diferencias significativas en los niveles de ciclina D1 o en la firma de proliferación basada en microarrays entre iMCL y cMCL (datos no mostrados). Se analizaron las diferencias de expresión entre iMCL y cMCL con un T-test y utilizando el SPSS software package versión 14.0 (SPSS® Inc).

Para validar los resultados de los datos de expresión de los microarrays los inventores re-examinaron los niveles de ARNm de SOX11, HDGFRP3, y CNN3 por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa. Un µg del ARN total de los 7 casos de iMCL y los 15 cMCL se trató con Turbo ADNasa (Ambion® Inc, Austin, TX, USA). Se sintetizó entonces ADN complementario (cADN) utilizando el sistema Superscript III™ (Invitrogen®) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinaron los niveles de expresión génica con los siguientes ensayos predesarrollados (Applied Biosystems®): SOX11 Hs00846583_s1; HDGFRP3 Hs01016437_m1; y CNN3 Hs00156565_m1. Se calcularon los niveles de expresión con el método 2^{-ΔΔCt} utilizando human β-glucuronidasa (GUS) como control endógeno y la línea celular Jurkat como calibrador matemático (cfr. Livak K.J. *et al.*, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method", *Methods* 2001, vol. 25, p. 402-8). Se analizó la correlación entre las medidas de microarrays y de la transcripción reversa seguida de PCR con el test de correlación de Pearson. Se encontró que los niveles de microarray versus los niveles de qRT-PCR era R²=0.89, 0.93 y 0.97, para SOX11, HDGFRP3, y CNN3, respectivamente. Estos datos confirman la correlación entre los resultados obtenidos para los niveles de expresión de ARNm por microarrays y transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa.

C) Expresión de la proteína SOX11 por inmunohistoquímica

Los inventores buscaron anticuerpos fidedignos para calcular la expresión de proteína de los genes expresados diferencialmente entre iMCL y cMCL en biopsias procesadas rutinariamente y encontraron solamente un anticuerpo comercial contra SOX11. De esta manera, se pudieron investigar por inmunohistoquímica las secciones de tejido que se utilizaron para el diagnóstico de MCL en 12 cMCL y 11 iMCL.

Se realizó inmunohistoquímica en tejidos fijados con formalina, incluidos en parafina con el método EnVision+System Peroxidase (DAB) (DAKO®, Carpintería, CA). Se hizo el desenmascaramiento del antígeno calentando muestras en solución de ácido etilenediaminetetraacético (EDTA) en un horno microondas. Se utilizó un anticuerpo primario contra SOX11 (HPA000536, Atlas Antibodies®, Stockholm, Sweden) a una dilución de 1/100. La expresión inmunohistoquímica de SOX11 solamente se detectó en secciones de tejido fijadas con formalina. Las biopsias de médula de hueso y los tejidos fijados con B-5 no se pudieron evaluar. Según la descripción original, la expresión de proteína SOX11 se identificó como una tinción nuclear fuerte de las células linfoides.

Concordantemente con los datos de los microarrays, se detectó la expresión nuclear fuerte de SOX11 en 11 de los 12 cMCL, mientras que era negativa en los 6 iMCL examinados previamente por microarrays. El cMCL negativo también era negativo por ARNm. Los 5 iMCL adicionales que no pudieron estudiarse por microarrays también eran negativos para la proteína SOX11. Así, el ARNm de SOX11 y/o la expresión de proteína fueron negativos o significativamente pocos expresados en todos los iMCL mientras que estaba altamente expresado en 13 de los 15 cMCL.

D) Expresión de proteína SOX11 en una serie independiente de MCL

Para confirmar si el SOX11 podía ser un biomarcador para reconocer dos subtipos de MCL con características clinicopatológicas y evolución de la enfermedad diferentes, los inventores investigaron por inmunohistoquímica la expresión de proteína en una serie independiente de 112 pacientes diagnosticados y tratados como MCL estándar sin tener en cuenta el status de SOX11. Se diagnosticó a los 112 pacientes con MCL de 1986 a 2007 en el Hospital Clínico de Barcelona, el Centro Nacional de Investigación Oncológica, Madrid, España, y el Instituto de Patología, Würzburg, Alemania. Estos casos tenían información clínica disponible y secciones de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina, que se habían utilizado para el diagnóstico de MCL. Se realizó la inmunohistoquímica en estos tejidos. Se aprobó el estudio por el Comité Ético Institucional de las respectivas instituciones.

Se detectó una expresión nuclear de SOX11 en 97 (87%) tejidos tumorales y estuvo ausente en 15 (13%). Las principales características clínicas y biológicas de los pacientes en relación con la expresión de SOX11 se resumen en la Tabla 3. Los pacientes negativos para SOX11 tenían más frecuentemente esplenomegalia, recuentos de glóbulos blancos y linfocitos más elevados que los positivos para SOX11. En relación a la presentación clínica, ocho pacientes mostraban una presentación clínica sin ganglios linfáticos, 7 de ellos (87%) fueron negativos para SOX11 y solamente 1 fue SOX11-positivo ($P < 0.001$).

TABLA 3

Principales características clínicas y patológicas de 112 pacientes con MCL en relación con la expresión de SOX11 en la serie de validación

	SOX11 negativo (n=15)	SOX11 positivo (n=97)	Valor P
Datos clínicos y patológicos			
Media de edad (rango)	57 (42-77)	63 (31-83)	NS
Sexo (M/F)	11 / 4	71 / 26	NS
B síntomas (%)	22	48	NS
ECOG \geq 2 (%)	20	28	NS
Presentación ganglionar (ganglios linfáticos >1cm) (%)	53	99	<0.001
Esplenomegalia palpable (%)	92	48	0.005
Implicación de médula ósea* (%)	83	87	NS
Estadio de Ann Arbor IV (%)	92	74	NS
Recuento WBC $>10 \times 10^9/L^*$ (%)	57	18	0.04
Recuento de Linfocitos $>5 \times 10^9/L^*$ (%)	83	24	<0.001
Suero alto LDH* (%)	22	29	NS
β_2 microglobulina elevada* (%)	75	55	NS
IPI de riesgo intermedio/alto o alto* (%)	37	48	NS
MIPi de riesgo alto* (%)	33	46	NS
Ki67 alto (>50%) (%)	20	28	NS

Datos evolutivos

	Seguimiento medio en años (rango) †	8.3 (1.3-12.2)	3.8 (1-11.6)	NS
5	Poliquimioterapia conteniendo adriamicina en primera línea (%)	67	72	NS
	Respuesta completa (%)	40	54	NS
10	5-años al fracaso del tratamiento (%)‡	75	23	0.04
	5-años supervivencia global (%)	78	36	0.001

NS: no significativo; IPI: Índice internacional de pronóstico para linfomas agresivos; MIPI: Índice internacional de pronóstico de linfoma de células del Manto;

* El número de casos a valorar para medula ósea, IPI, MIPI, recuentos de sangre periférica, LDH, y β_2 microglobulina fueron 82, 62, 71, 104, 61, y 50, respectivamente.

† Pacientes que sobrevivieron.

‡ En 78 pacientes con esta información disponible.

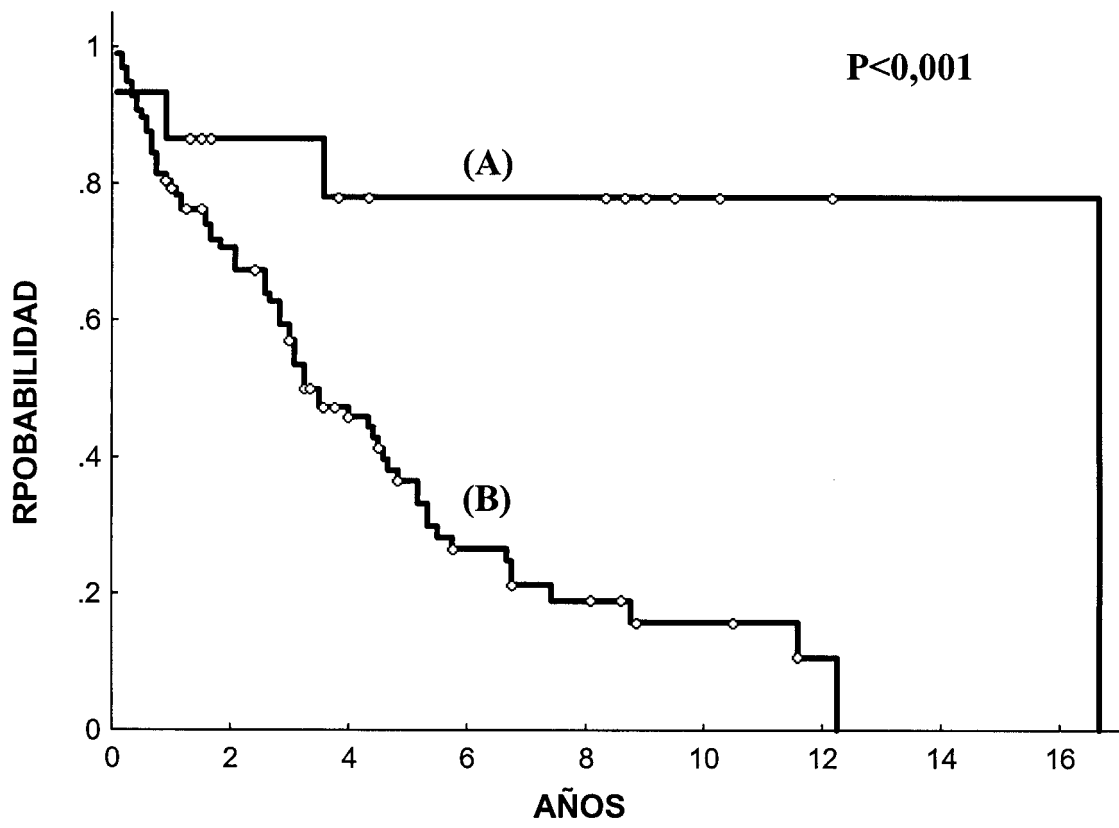
La mediana de la supervivencia total (OS) de la serie fue de 4 años. Los pacientes negativos para SOX11 tuvieron una OS más larga que los positivos para SOX11 (5-años OS: 78% (95% intervalo de confianza [CI]: 56-100) vs. 36% (95% CI: 25-47), respectivamente; P=0.001) (Fig. 1). Dado que se ha descrito que el MCL con una presentación no ganglionar puede ser una posible variante indolente de este tumor (cfr. Orchard J. *et al.*, *supra*), los inventores examinaron si la variable más importante para OS era la presentación ganglionar/no ganglionar o la expresión de SOX11 por medio de un análisis de Cox. Solamente SOX11 retuvo un valor predictivo en este modelo (p<0.001; riesgo relativo [RR]: 5.8). Finalmente, cuando el índice de proliferación Ki67 se incorporó al modelo Cox, SOX11 (P=0.006; RR: 3.8) y Ki67 >50% (P=0.02; RR: 1.9) resultaron ser las variables más importantes para OS.

Los inventores encontraron que una comparación supervisada de los perfiles de expresión de los genes iMCL y cMCL revelaba 13 genes con diferencias altamente significativas, todos ellos sobreexpresados en cMCL y poco expresados en iMCL. Estos hallazgos indican que la expresión de esta firma puede ser muy específica de cMCL ya que estos genes no se expresaron en iMCL u otras neoplasias leucémicas linfoides. Además, la falta de expresión de SOX11 identificó un subgrupo de pacientes con presentación no ganglionar, recuentos más altos de linfocitos, y una supervivencia más larga similar a la de los iMCL inicial. Por el contrario, el MCL con SOX11-positivo tenía una presentación convencional nodular y una supervivencia peor. Además, los inventores también encontraron que la expresión SOX11 podía distinguir los casos de evolución favorable de MCL mejor que la presentación nodular o el índice Ki67.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el pronóstico de un linfoma de células del manto con un curso clínico indolente, que comprende los pasos de:
- a) proporcionar una muestra de un paciente que padezca linfoma de células del manto;
 - b) determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: RNGTT, HDGFRP3, FARP1, HMGB3, LGALS3BP, PON2, CDK2AP1, DBN1, CNR1, CNN3, SOX11, SEMAR y CSNK1E en la muestra; y
 - c) comparar el nivel de expresión de cada uno de los genes medidos con respecto al nivel de expresión de los mismos genes en una muestra control;
- 15 donde la ausencia de expresión o la poca expresión de los genes con respecto a los mismos genes en la muestra control es indicativa del curso clínico indolente del linfoma de células del manto.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, donde el nivel de expresión se determina para al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: SOX11, HDGFRP3, CNN3, FARP1, PON2, DBN1 y HMGB3.
3. Método según la reivindicación 2, donde el nivel de expresión se determina para al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: SOX11, HDGFRP3 y CNN3.
- 25 4. Método según la reivindicación 3, donde se determina el nivel de expresión de SOX11.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la determinación del nivel de expresión del paso (b) se lleva a cabo determinando la cantidad de ARNm del gen o genes seleccionados.
- 30 6. Método según la reivindicación 5, donde la determinación se lleva a cabo por transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la determinación del nivel de expresión del paso (b) se lleva a cabo determinado la cantidad de proteína codificada por el gen o genes seleccionados.
- 35 8. Método según la reivindicación 7, donde la determinación se lleva a cabo por inmunohistoquímica.
9. Kit para llevar a cabo el método tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: RNGTT, HDGFRP3, FARP1, HMGB3, LGALS3BP, PON2, CDK2AP1, DBN1, CNR1, CNN3, SOX11, SEMAR y CSNK1E.
- 40 10. Kit según la reivindicación 9, que comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en: SOX11, HDGFRP3, CNN3, FARP1, PON2, DBN1 y HMGB3.
- 45 11. Kit según la reivindicación 10, que comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de al menos un gen seleccionado del grupo que consistente en: SOX11, HDGFRP3 y CNN3.
- 50 12. Kit según la reivindicación 11, que comprende medios adecuados para determinar el nivel de expresión de SOX11.
13. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que comprende medios adecuados para determinar la cantidad de proteína codificada por el gen o genes seleccionados.
- 55 14. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 9-12, que comprende medios adecuados para determinar la cantidad de ARNm del gen o genes seleccionados.
- 60 15. Kit según la reivindicación 14, que comprende sustancias requeridas para llevar a cabo una transcripción reversa seguida de PCR cuantitativa.
- 65 16. Uso de SOX11 como un marcador para el pronóstico de un linfoma de células del manto con un curso clínico indolente.

FIG. 1





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200901738

②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.07.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)
G01N33/53 (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO2008139169 A1 (IMMUNOVIA AB) 20.11.2008	4,12,16
A	WO2009063111 A1 (UNIV. BARCELONA) 22.05.2009	1-16
A	WO200617239 A1 (SBARRO HEALTH RES ORGANIZATION) 16.02.2006	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.12.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 10.12.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-3, 5-11,13-15	SI
	Reivindicaciones 4,12,16	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-3, 5-11, 13-15	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO2008139169 A1 (IMMUNOVIA AB)	20.11.2008
D02	WO2009063111 A1 (UNIV. BARCELONA)	22.05.2009
D03	WO200617239 A1 (SBARRO HEALTH RES ORGANIZATION)	16.02.2006

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

La presente solicitud divulga una serie de perfiles de marcadores para la elaboración de métodos para el pronóstico del linfoma de células de manto (MCL).

Las reivindicaciones 4, 12, 16 que se refieren a un método diagnóstico/ pronóstico de un linfoma de células del manto donde se determina el nivel de expresión de SOX 11 en una muestra de un paciente mediante la comparación del nivel de expresión de este gen con respecto al nivel de expresión del mismo en una muestra control, un Kit adecuado para llevarlo a cabo y el uso de SOX 11 como marcador genético. Estas reivindicaciones no serían nuevas, según lo mencionado en el art. 6 de la ley de Patentes, puesto que D1 divulga exactamente un método de diagnóstico/pronóstico de linfoma de células de manto donde se determina, en una muestra procedente del paciente, la cantidad de SOX 11 presente (reivindicación 30).

Las restantes reivindicaciones, en la medida que estén relacionadas con los métodos siguientes:

- 1) Método que comprende el perfil de 13 marcadores anotados en la tabla 2 (página 18, líneas 7-11, de la solicitud original).
- 2) Método que comprende el perfil de los 3 genes: SOX 11, HDGFRP3 y CNN3 (página 18, líneas 18-20)
- 3) Método que comprende el perfil de los 3 genes: SOX 11, HDGFRP3 Y DBN1 (página 23 de la presente solicitud)
- 4) Método que comprende la determinación del nivel de expresión de SOX 11.

cumplirían con el requisito de novedad y actividad inventiva, tal y como se definen en los art 6 y 8 de la LP, puesto que ninguno de los documentos del estado de la técnica divulga idénticos métodos a los reivindicados, ni para el experto en la materia es evidente la elaboración de tales métodos habiendo tenido en cuenta el estado de la técnica anterior a la fecha de presentación de la presente solicitud.