(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 353 091**

(21) Número de solicitud: 200900651

(51) Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **09.03.2009**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2011**

Fecha de la concesión: **02.01.2012**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **13.01.2012**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **13.01.2012**

(73) Titular/es:
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)
SERRANO, 117
28006 MADRID, ES y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

(72) Inventor/es:
MOLINA PRIVADO, IRENE;
CAMPANERO GARCIA, MIGUEL R. y
RODRIGUEZ MARTINEZ, MARIA

(74) Agente: **Pons Ariño, Ángel**

(54) Título: **MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE EL LINFOMA DE BURKITT Y EL LINFOMA DIFUSO DE CELULAS B GRANDES.**

(57) Resumen:
Método de diagnóstico diferencial entre el Linfoma de Burkitt y el linfoma difuso de células B grandes.
La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la medicina. Específicamente, se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre el Linfoma de Burkitt (LB) y el Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG) mediante el análisis de las formas truncadas de la proteína I2PP2A, a un método de diagnóstico diferencial entre ambos tipos de linfomas y a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

ES 2 353 091 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Método de diagnóstico diferencial entre el Linfoma de Burkitt y el Linfoma Difuso de Células B Grandes.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la medicina. Específicamente, se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre el Linfoma de Burkitt (LB) y el Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG), a un método de diagnóstico diferencial entre ambos tipos de linfomas y a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

Estado de la técnica anterior

El linfoma de Burkitt (LB) es un tipo de linfoma no-Hodgkin muy agresivo que se da normalmente en niños y jóvenes y ocasionalmente en adultos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la existencia de tres variantes clínicas: endémica (típica de África ecuatorial y Nueva Guinea), esporádica y asociada a inmunodeficiencias (Wright. Blood 1999;93:758). Su incidencia es especialmente elevada en África ecuatorial y el Noreste de Brasil (Magrath. Am J Pediatr Hematol Oncol 1991;13:222-46; Sandlund *et al*. Leukemia 1997; 11:743) y da cuenta del 40-50% de los linfomas de tipo no-Hodgkin en los países más industrializados (Murphy *et al*. J Clin Oncol 1989;7:186-93; Wilson *et al*. Cancer 1984;53:1695-704). El LB es uno de los tumores pediátricos de más rápido crecimiento (Bouffet *et al*. Eur J Cancer 1991;27:504-9), de modo que el tumor duplica su tamaño cada 24 horas (Kearns *et al*. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 1986;12:73-84; Ziegler. N Engl J Med 1977;297:75-80). Debido a estas características, este linfoma sigue un curso clínico muy rápido en ausencia de tratamiento y el óbito sobreviene en pocos meses. El LB requiere, por lo tanto, un diagnóstico muy rápido antes de comenzar el tratamiento específico.

La terapia del LB se basa en un tratamiento muy agresivo e intensivo de quimioterapia que incluye distintas combinaciones de ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina, metotrexato, ifosfamida, etopósido y citarabina, así como la administración intratecal de quimioterapia o la administración sistémica de agentes quimioterápicos capaces de atravesar la barrera hematoencefálica (Divine *et al*. Ann Oncol 2005;16:1928-35; Magrath *et al*. J Clin Oncol 1996;14:925-34; Mead *et al*. Ann Oncol 2002;13:1264-74; Pees *et al*. Ann Hematol 1992;65:201-5; Thomas *et al*. J Clin Oncol 1999;17:2461-70) debido al elevado riesgo de afectación del sistema nervioso central (Bishop *et al*. Cancer Invest 2000;18:574-83). Desafortunadamente, la toxicidad de esta terapia tan agresiva es enorme debido a los efectos secundarios que conlleva, e incluye neurotoxicidad, toxicidad hematológica, mucositis severa, enfermedad cardíaca e infertilidad (Patte *et al*. Blood 2007;109:2773-80).

El Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG) es el tipo de linfoma no-Hodgkin más común en adultos de todo el mundo y supone el 30-40% de los neoplasmas linfoides (Blood 1997;89:3909-18). Aunque también se trata de un linfoma de células B maduras muy agresivo (Kuppers *et al*. Nat Rev Cancer 2005;5:251-62), el tratamiento requerido para su curación es mucho menos agresivo que el empleado para el LB y consiste normalmente en ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisona (CHOP), junto con Rituximab (Bishop *et al*. Cancer Invest 2000;18:574-83). Este tratamiento es insuficiente para evitar la progresión del LB mientras que la terapia indicada para el LB implicaría un sobre-tratamiento innecesario del LDCBG, que podría causar graves efectos tóxicos (Bishop *et al*. Cancer Invest 2000;18:574-83). Por lo tanto, es fundamental poder llevar a cabo un diagnóstico inequívoco del LB y del LDCBG.

El diagnóstico del LB se basa en criterios morfológicos, citogenético-moleculares, inmunohistoquímicos y de inmunofenotipado (Diebold *et al*. Lyon: IARC Press; 2001. p. 181-4). La presencia de una translocación del locus de *C-MYC* a uno de los loci de las inmunoglobulinas es un requisito casi indispensable para el diagnóstico del LB (Diebold *et al*. Lyon: IARC Press; 2001. p. 181-4), pero no suficiente porque esta translocación también se da en otros tipos de linfomas (Cogliatti, *et al*. Br J Haematol 2006; 134:294-301). Además, se han descrito casos de LB en los que no se detecta esta translocación (Braziel *et al*. Blood 2001;97:3713-20; Macpherson *et al*. J Clin Oncol 1999;17:1558-67; McClure *et al*. Am J Surg Pathol 2005;29:1652-60). A pesar de todas estas aproximaciones complementarias para su diagnóstico, a menudo resulta difícil distinguir entre el LB y otros tipos de linfoma B. Por ejemplo, el LDCBG puede presentar rasgos morfológicos, inmunohistoquímicos e inmunofenotípicos relativamente similares a los de la variante esporádica del LB (LB esporádico o LBes) e incluso presentar la translocación del locus de *C-MYC* (Cogliatti, *et al*. Br J Haematol 2006; 134:294-301).

Recientemente se han determinado los perfiles de expresión génica característicos de LBes y de LDCBG (Dave *et al*. N Engl J Med 2006;354:2431-42; Hummel *et al*. N Engl J Med 2006;354:2419-30). Estos estudios han demostrado que los criterios mofológicos, inmunofenotípicos y genéticos empleados actualmente para diferenciar un LBes de un LDCBG son frecuentemente inadecuados y poco fiables. De hecho, el 17% (Dave *et al*. N Engl J Med 2006;354:2431-42) o el 34% (Hummel *et al*. N Engl J Med 2006;354:2419-30) de los casos identificados en estos estudios con un perfil de expresión génica correspondiente a LBes habían sido previamente diagnosticados como LDCBG o simplemente no clasificados. Aunque estos abordajes genómicos podrían teóricamente emplearse para el diagnóstico inequívoco del LBes y del LDCBG, la hibridación de microarrays para el diagnóstico de estos linfomas está lejos de poder aplicarse en la rutina clínica de la mayor parte de los hospitales del mundo.

En resumen, en la práctica clínica actual la distinción entre LBes y otros tipos de linfoma depende, en muchas ocasiones, de criterios únicamente morfológicos (Troxell *et al*. Cancer 2005;105:310-8), que no resultan totalmente fiables y que pueden llevar a un diagnóstico erróneo. Desafortunadamente, no se han desarrollado métodos de fácil aplicación clínica que permitan una clara delimitación entre todos los casos de LBes y LDCBG (Cogliatti *et al*. Br J

Haematol 2006;134:294-301) y no existe en la actualidad ningún marcador molecular específico para ninguno de estos linfomas. Esto provoca que los patólogos se encuentren ante la disyuntiva de como diagnosticar un linfoma blástico periférico altamente proliferativo de células B y, lo que es peor, ante la duda de qué aproximación terapéutica emplear. Un diagnóstico preciso es necesario, por lo tanto, para prevenir el tratamiento de un LBes "falso negativo" con dosis relativamente bajas de quimioterapia, que no resultarían eficaces, o el tratamiento de un LBes "falso positivo" con régimen intensivo de quimioterapia, que sería innecesario y tóxico. Por lo tanto, en la práctica clínica diaria existe la necesidad de algún método fácil de aplicar en cualquier hospital que permita la identificación inequívoca del LBes y su distinción clara del LDCBG.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre el Linfoma de Burkitt (LB) y el Linfoma Difuso de Células B Grandes (LDCBG), a un método de diagnóstico diferencial entre ambos tipos de linfomas y a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

En la presente invención se muestra como el análisis de la expresión de la proteína I2PP2A mediante *inmunoblot* permite distinguir entre muestras tumorales de pacientes de LB y muestras tumorales de pacientes de LDCBG. Mientras que las formas completas de la proteína I2PP2A pueden detectarse tanto en las muestras de pacientes de LDCBG como en las muestras de pacientes de LB, las formas truncadas de la proteína I2PP2A únicamente se detectan en las muestras de pacientes con LB. La presente invención provee, por tanto, de un método rápido y sencillo de realizar en la práctica clínica diaria de cualquier hospital que soluciona el problema de la dificultad de distinguir un LB de un LDCBG permitiendo la toma de decisiones con respecto a la aproximación terapéutica a emplear.

Un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre un LB y un LDCBG que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada de un sujeto, y

b) analizar la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A en la muestra obtenida en (a).

Preferiblemente, el método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre un LB y un LDCBG comprende además un paso:

c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico diferencial entre un LB y un LDCBG que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anterioremente que además comprende un paso (d) donde una cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia de un LB.

Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c). Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante estos métodos.

La Organización Mundial de la Salud, ha reconocido la existencia de tres variantes clínicas del LB: endémica, esporádica y asociada a inmunodeficiencias (Harris *et al*. Annals of Oncology 1999; 10: 1419-1432; Wright. Blood 1999;93:758). Un aspecto preferido de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre un LB de la variante esporápida (LBes) y un LDCBG. Otro aspecto preferido de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico diferencial entre un LBes y un LDCBG.

El término "diagnóstico", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes de LB y muestras procedentes de LDCBG, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A y en la comparación de dicha cantidad detectada con respecto a una cantidad de referencia. Esta detección tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

La proteína I2PP2A, también conocida como "Inhibidor 2 de la proteína fostafasa 2A" u "oncogen nuclear SET" se encuentra codificada en *Homo sapiens* por el gen *SET*, con número de acceso en *Gene Bank* NW_924573.1; SEQ ID

NO: 1). Se conocen dos isoformas de la proteína I2PP2A que se generan a partir de este gen mediante procesamiento alternativo de su ARNm y que se distinguen por presentar un extremo amino-terminal diferente (Nagata *et al*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:4279-4283). La isoforma 1, también denominada TAF-I alpha (NP_001116293.1; SEQ ID NO: 2) es traducida a partir del ARNm con número de acceso en *Gene Bank* NM_001122821.1; SEQ ID NO: 3). La isoforma 2, también denominada TAF-I beta (NP_003002.2; SEQ ID NO: 4) es traducida a partir del ARNm con número de acceso en *Gene Bank* NM_003011.3; SEQ ID NO: 5). El tamaño molecular calculado para las isoformas 1 y 2 es de 33.489 y 32.103 dalton (Da), respectivamente, aunque su movilidad aparente en geles de poliacrilamida con SDS es aproximadamente 40 kDa (Nagata *et al*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:4279-4283), lo que sugiere la existencia de modificaciones post-traduccionales.

Se ha descrito la existencia de unas formas truncadas de la proteína I2PP2A, a las que le faltan varios aminoácidos del extremo amino y la mayor parte de la región rica en glutámico y aspártico del extremo carboxilo. El tamaño molecular relativo de estas formas truncadas es de aproximadamente 20 kDa (Li *et al*. Biochemistry 1995;34:1988-96; Li *et al*. J Biol Chem 1996;271:11059-62).

La expresión "proteína I2PP2A", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a cualquiera de las proteínas resultantes de la expresión del gen *SET* humano. Por tanto, se refiere tanto a la isoforma 1 o TAF-I alpha, y a la isoforma 2 o TAF-I beta, así como a cualquiera de sus variantes, o fragmentos derivados de las mismas.

En el sentido utilizado en esta descripción, el término "variante" se refiere a una proteína sustancialmente homóloga a la proteína I2PP2A. En general, una variante incluye adiciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos. El término "variante" incluye también a las proteínas resultantes de modificaciones postranslacionales como, por ejemplo, pero sin limitarse, glicosilación, fosforilación o metilación.

Tal como aquí se utiliza, una proteína es "sustancialmente homóloga" a la proteína I2PP2A cuando su secuencia de aminoácidos presenta un buen alineamiento con la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las isoformas de la proteína I2PP2A, es decir, cuando su secuencia de aminoácidos tiene un grado de identidad respecto a la secuencia de aminoácidos de alguna de las isoformas de la proteína I2PP2A, de, al menos, un 50%, típicamente de, al menos, un 80%, ventajosamente de, al menos, un 85%, preferentemente de, al menos un 90%, más preferentemente de, al menos, un 95%, y, aún más preferentemente de, al menos, un 99%. Las secuencias homólogas a la proteína I2PP2A pueden ser identificadas fácilmente por un experto en la materia, por ejemplo, con la ayuda de un programa informático apropiado para comparar secuencias.

El término "fragmento", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a una porción de la proteína I2PP2A o de sus variantes.

La expresión "formas truncadas de la proteína I2PP2A", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a aquellas variantes o fragmentos de la proteína I2PP2A, a las que le faltan algunos aminoácidos del extremo amino y la mayoría de la región rica en glutámico y aspártico del extremo carboxilo (Li *et al*. Biochemistry 1995;34:1988-96; Li *et al*. J Biol Chem 1996;271:11059-62). Preferiblemente, la expresión "formas truncadas de la proteína I2PP2A" se refiere a aquellas variantes o fragmentos de la proteína I2PP2A, que tienen una movilidad electroforética menor de 30 kDa. Más preferiblemente, la expresión "formas truncadas de la proteína I2PP2A" se refiere a aquellas variantes o fragmentos de la proteína I2PP2A, que tienen una movilidad electroforética menor de 30 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 5,8. El tamaño molecular y el pI de las formas truncadas de la proteína I2PP2A puede ser determinado mediante técnicas cromatográficas y electroforéticas conocidas en el estado de la técnica. Algunas de las técnicas electroforéticas que se pueden emplear para determinar dichas características se describen en otra parte de la presente descripción.

La expresión "formas completas de la proteína I2PP2A", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere tanto a la isoforma 1 o TAF-I alpha, y a la isoforma 2 o TAF-I beta, así como a cualquiera de sus variantes, que tienen una movilidad electroforética mayor de 30 kDa.

La expresión "detección de la cantidad" de una proteína, entendiendo por proteína bien la proteína I2PP2A, bien las formas truncadas de la proteína I2PP2A o bien las formas completas de la proteína I2PP2A, en la muestra obtenida, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de la proteína, basada en una señal que se obtiene directamente de la proteína, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de la proteína, presente en la muestra. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de la proteína. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, "etiquetas" o productos de reacción enzimática).

El término "cantidad", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de la proteína, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con las mismas o que pueda derivarse de éstas. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de la proteína obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad

de espectroscopia de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término "comparación", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A de una muestra de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La comparación descrita en el apartado (c) de los métodos de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término "cantidad de referencia", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad de la cantidad absoluta o relativa de las formas truncadas de la proteína I2PP2A que permite discriminar un linfoma de Burkit de otros linfomas. Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema.

En una realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia proveniente de un LDCBG. La muestra de referencia puede ser, por ejemplo, un extracto de proteínas obtenido a partir de una línea celular derivada de un LDCBG, o una mezcla de extractos de proteínas obtenidos a partir de varias líneas celulares derivadas de un LDCBG. Algunos ejemplos de líneas celulares de LDCBG son por ejemplo, pero sin limitarse, Docyl-19, DB, Toledo, Karpas-422 o SUDHL-6. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras tumorales obtenidas de una población pacientes de LDCBG. Dicha cantidad puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como por ejemplo, el cálculo de la media de la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A encontrada en una población de sujetos con LDCBG. La cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A es menor en muestras de LDCBG que en muestras de LB. Dependiendo de la sensibilidad del método de detección empleado, la cantidad de las formas truncadas en muestras LDCBG puede ser considerada como indetectable, lo que puede interpretarse como ausencia de formas truncadas; en contraposición, la presencia de formas truncadas en una muestra biológica problema, es indicativa de la presencia de un LB.

En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia proveniente de un LB. La muestra de referencia puede ser, por ejemplo, un extracto de proteínas obtenido a partir de una línea celular derivada de un LB, o una mezcla de extractos de proteínas obtenidos a partir de varias líneas celulares derivadas de un LB. Algunos ejemplos de líneas celulares de LB son por ejemplo, pero sin limitarse, BL2, Akata, Raji, Ramos, DG75 o Mutu-1. La cantidad de referencia puede obtenerse también, por ejemplo, de los límites de distribución normal de una cantidad encontrada en muestras tumorales obtenidas de una población de pacientes de LB. Mediante técnicas estadísticas bien conocidas puede calcularse la cantidad de referencia de las formas truncadas de la proteína I2PP2A indicativa de la presencia de un LB.

En otra realización preferida de este aspecto de la presente invención, la cantidad de referencia se obtiene de la cantidad de las formas completas de la proteína I2PP2A en la misma muestra biológica problema. Una cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A superior a, típicamente, el 5%, preferiblemente, el 10%, más preferiblemente, el 20%, aún más preferiblemente, el 25%, y aún más preferiblemente, del 30% de la cantidad detectada de las formas completas de la proteína I2PP2A es indicativa de la presencia de un LB.

En otra realización preferida, la cantidad de referencia se obtiene de la cantidad total de la proteína I2PP2A en la misma muestra biológica problema. Una cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A superior a, típicamente, el 5%, preferiblemente, el 10%, más preferiblemente, el 20%, aún más preferiblemente, el 25%, y aún más preferiblemente, del 30% de la cantidad detectada de la proteína I2PP2A es indicativa de la presencia de un LB.

En una realización preferida, la detección de la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A se realiza mediante la incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo. El término "inmunoensayo", tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de una anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *inmunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica o *chips* de proteína.

El término "anticuerpo" tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la proteína I2PP2A o de sus formas truncadas. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')2 que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epitopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de la proteína I2PP2A o de sus formas truncadas y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El

anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un "anticuerpo o polipéptido recombinante" (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga. Anticuerpos que reconocen a la proteína I2PP2A o a sus formas truncadas son conocidos en el estado de la técnica, como los que se describen, pero sin limitarse, en los ejemplos de la presente descripción.

Los anticuerpos empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales capaces de reconocer a la proteína I2PP2A o pueden ser anticuerpos monoclonales que reconozcan únicamente las formas truncadas de la proteína I2PP2A. Los anticuerpos que reconocen a la proteína I2PP2A pueden ser empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención mediante, por ejemplo, pero sin limitarse, *inmunoblot*. Los anticuerpos que reconocen únicamente a las formas truncadas de la proteína I2PP2A pueden ser empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante *inmunoblot*, ELISA o inmunhistoquímica.

En una realización preferida, el inmunoensayo es un *inmunoblot* o *Western blot*. Para llevar a cabo un *inmunoblot*, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas mediante electroforesis. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen a la proteína I2PP2A o a sus formas truncadas.

La electroforesis es una técnica analítica de separación de fundamento cinético basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula viene dado por su movilidad electroforética y ésta por la carga, tamaño y forma de la misma. Cuanto mayor es la relación carga/tamaño más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico. Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación. Algunas variaciones de esta técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse, electroforesis capilar, electroforesis en papel, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), isoelectroenfoque o electroforesis bidimensional. La electroforesis PAGE puede llevarse a cabo en condiciones desnaturalizantes o no desnaturalizantes. Preferiblemente, para llevar a cabo la detección de la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A mediante *inmunoblot*, las proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto se separan mediante electroforesis monodimensional PAGE en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

Alternativamente, las proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto se pueden separar mediante electroforesis bidimensional o 2D-PAGE. Esta técnica se basa en la separación de las proteínas en función a dos características: en primer lugar, se separan las proteínas según su punto isoeléctrico (pI) mediante isoelectroenfoque (IEF) y, en segundo lugar, la separación se realiza según su masa molecular, mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). La técnica DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*) se basa en el mareaje de las proteínas de las muestras de estudio con uno de los tres fluorocromos (Cy2, Cy3 o Cy5) antes de la separación. A continuación se mezclan las muestras y se separan en un único gel bidimensional, minimizando la variabilidad experimental. Debido al mareaje específico de cada muestra pueden observarse de manera individualizada y realizar un análisis comparativo de la expresión diferencial de proteínas, permitiendo la cuantificación precisa.

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, y antes de la detección, las proteínas se transfieren a un soporte o a una membrana, por ejemplo, pero sin limitarse, PDVF, nitrocelulosa o acetato de celulosa. Esta membrana se híbrida con un anticuerpo específico (también llamado anticuerpo primario) que reconoce a la proteína I2PP2A o a sus formas truncadas. A continuación, la membrana se híbrida con un anticuerpo (también llamado anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a la proteína I2PP2A o a sus formas truncadas el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Una vez detectada la proteína, se puede determinar su tamaño molecular relativo, comparando su migración con la migración de una proteína control que se detecte de forma simultánea, preferiblemente en el mismo soporte, que tiene un tamaño conocido.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunoreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador.

Existen diferentes tipos de ELISA. En el ELISA directo o ensayo ELISA simple de dos capas, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo que reconoce a las formas truncadas de la proteína I2PP2A, conjugado o unido a un compuesto marcador. En el ELISA indirecto, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo primario, que reconoce a las formas truncadas de la proteína I2PP2A y, a continuación, un anticuerpo secundario, que reconoce al anticuerpo primario, conjugado o unido a un compuesto marcador. En el ELISA *sandwich* o ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos, se recubre el pocillo con un primer anticuerpo que reconoce las formas truncadas de la proteína I2PP2A, se aplica la muestra biológica problema, de manera que las formas truncadas de la proteína I2PP2A serán retenidas en el pocillo al ser

reconocido por el primer anticuerpo, y después se le aplica un segundo anticuerpo que reconoce a las formas truncadas de la proteína I2PP2A, conjugado o unido a un compuesto marcador.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es una inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estos cortes membrana se hibridan con un anticuerpo específico o anticuerpo primario que reconoce a las formas truncadas de la proteína I2PP2A. A continuación, la membrana se híbrida con un anticuerpo secundario capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a las formas truncadas de las proteínas I2PP2 el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario.

El término "compuesto marcador", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad la proteína I2PP2A o de sus formas truncadas. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como 33P o 35S, fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Tanto en el LB como en el LDCBG lo primero que se detecta es una masa tumoral que crece rápidamente y que puede aparecer en distintas regiones del cuerpo. Para el diagnóstico se extrae una biopsia de esa masa y muestras de sangre y médula ósea para ver si también están afectadas.

El LB suele presentarse como una masa de rápido crecimiento que puede aparecer en distintas regiones del cuerpo según la variante del linfoma. En la mayoría de los casos esporádicos se trata de una masa abdominal, principalmente en la región ileocecal, pero también puede encontrarse en los ovarios, ríñones, mama y región retroperitoneal, así como en nódulos linfáticos en el caso de adultos (Jaffe *et al*. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001). En la variante endémica del LB la masa también puede aparecer en huesos faciales, tracto digestivo, ovarios, riñones y mama. El sistema nervioso central también puede verse afectado en todas las variantes (Bishop *et al*. Cancer Invest 2000;18:574-83). Los pacientes de LDCBG suelen presentar una masa que crece rápidamente ya sea en un órgano linfoide o fuera de éstos. Cuando se presenta fuera de éstos suele encontrarse en la región gastrointestinal, aunque también puede aparecer en la piel, hueso, testículos, tejidos blandos, glándulas salivares, tracto genital femenino, pulmones, hígado, bazo o sistema nervioso central (Jaffe *et al*. Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Press; 2001).

Por tanto, el término "muestra biológica aislada", tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferiblemente la muestra biológica aislada comprende células tumorales, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia tumoral. El término "tumorales", tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a células transformadas que presentan un crecimiento incontrolado. Más preferiblemente, la muestra biológica se selecciona de la lista que comprende: peritoneo, esófago, estómago, intestino, hígado, bazo, páncreas, piel, próstata, testículo, mama, ovario, útero, cérvix, vagina, vulva, riñón, glándula suprarrenal, vejiga, tracto urinario, tejido óseo, músculo, tejido adiposo, tejido fibroso, vasos sanguíneos glándulas salivares, hígado, bazo, timo, pulmón, tiroides, paratiroides, glándula pituitaria, encéfalo, cerebelo, nervios periféricos, médula ósea, ganglios linfáticos, linfa o sangre. El término "sujeto", tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos.

Otro aspecto de la presente invención es un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo los métodos de la presente invención.

Preferiblemente, el kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para:

a) analizar la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A en la muestra obtenida en (a) y

b) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para analizar la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como, por ejemplo, pero sin limitarse, anticuerpos específicos de la proteína I2PP2A o de sus formas truncadas, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

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. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra un análisis mediante 2D-DIGE. (A) Diseño experimental de la estrategia empleada para los geles 2D-DIGE y esquema del mareaje con los distintos fluoróforos. (B) Gel 2D-DIGE representativo de los geles obtenidos para las fracciones citosólicas de las líneas celulares DOCYL-19 (DLBCL) y DG75 (BL).

Figura 2. Muestra la detección de un polipéptido más abundante en extractos citosólicos de LBes que en los de LDCBG. (A) Se muestra un fragmento de un gel 2D-DIGE en el que se destaca la mancha o *spot* 2520 (flecha). En este gel se compararon la fracciones citosólicas de las líneas celulares de LBes BL2 y de LDCBG Toledo. (B) Abundancia del *spot* 2520 en las muestras analizadas relativa a la muestra de las células DB.

Figura 3. Muestra la secuencia de los péptidos trípticos identificados procedentes del *spot* 2520. (A) Se indican los péptidos específicos de la isoforma 1 y los comunes a ambas isoformas. (B) Secuencia de las isoformas 1 y 2 en la que se destacan en negrita los aminoácidos presentes en los péptidos mostrados en (A). La región acídica de ambas isoformas se muestra subrayada.

Figura 4. Muestra la detección de formas truncadas de I2PP2A en extractos citosólicos de líneas celulares de LB, pero no en los de LDCBG. La detección de la proteína I2PP2A y Tubulina (empleada como un control de carga) en extractos citosólicos de las distintas líneas celulares indicadas en los paneles (A) y (B) se llevó a cabo empleando el anticuerpo de cabra anti-I2PP2A sc-5665 (SantaCruz Biotechnology) con el anticuerpo secundario A9452 (Sigma-Aldrich) y el anticuerpo de ratón anti-Tubulina T9026 (Sigma-Aldrich) con el anticuerpo secundario A2304 (Sigma-Aldrich). La visualización de las señales se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia.

Figura 5. Muestra que las bandas detectadas con el anticuerpo anti-I2PP2A son específicas. La detección de la proteína I2PP2A en extractos citosólicos de las distintas líneas celulares indicadas se llevó a cabo empleando el anticuerpo de cabra anti-I2PP2A sc-5665 (SantaCruz Biotechnology) con el anticuerpo secundario A9452 (Sigma-Aldrich). Previamente, 1 μg del anticuerpo sc-5655 fue preincubado (+) o no (-) con 5 μg del péptido competidor SC-5655P (SantaCruz Biotechnology) antes de emplearlo para la tinción de las membranas mostradas. La visualización de las señales se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia.

Figura 6. Muestra que I2PP2A se encuentra mayoritariamente en la fracción citosólica de las líneas celulares de LB (DG75) y LDCBG (Toledo). Las proteínas presentes en las fracciones subcelulares indicadas de las líneas celulares DG75 y Toledo fueron analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-I2PP2A sc-5655 y el anticuerpo secundario A9452 (Sigma-Aldrich). La visualización de las señales se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia.

Figura 7. Muestra la detección de las formas truncadas de I2PP2A en la línea de LB DG75, pero no en la de LDCBG Toledo, por un segundo anticuerpo anti-I2PP2A que reconoce un epítopo distinto al anterior. Las proteínas presentes en la fracción citosólica de las líneas celulares DG75 y Toledo fueron analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-I2PP2A sc-27269 y el anticuerpo secundario A9452 (Sigma-Aldrich). La visualización de las señales se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia.

Figura 8. Muestra la detección de formas truncadas de I2PP2A en extractos citosólicos de líneas celulares de LB, pero no en los de LDCBG con un anticuerpo monoclonal. Las proteínas presentes en la fracción citosólica de las líneas celulares indicadas fueron analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-I2PP2A sc-133138 (SantaCruz Biotechnology) y el anticuerpo secundario A2304 (Sigma-Aldrich). La visualización de las señales se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia.

Figura 9. Muestra la detección de las formas truncadas de I2PP2A en biopsias de pacientes de LBes, pero no en las de pacientes de LDCBG. Las proteínas presentes en extractos celulares procedentes de biopsias de pacientes de LBes (LBes1 a LBes3) o LDCBG (LDCBG1 a LDCBG3) congeladas en OCT fueron analizadas mediante inmunoblot con el anticuerpo anti-I2PP2A sc-5655 y el anticuerpo secundario A9452 (Sigma-Aldrich). La visualización de las señales se llevó a cabo mediante quimioluminiscencia.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

Análisis del perfil de expresión de proteínas en líneas celulares humanas de LB y LDCBG

Con el fin de encontrar un criterio que permita discernir entre LDCBG y LB en aquellos casos cuyo diagnóstico resulte confuso con las técnicas convencionales empleadas en clínica, comparamos los perfiles de expresión de proteínas en distintas fracciones subcelulares entre líneas celulares de LBes y de LDCBG de origen humano empleando un abordaje proteómico. Para ello se obtuvieron las fracciones citosólica, nuclear y de membranas y organelas de 3 líneas celulares de LBes (BL2, Ramos y DG75) y de LDCBG (Toledo, DB y DOCYL-19). La extracción diferencial de proteínas en función de su localización subcelular se realizó a partir de $12{,}5x10^6$ células empleando el kit ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction (Calbiochem). La mitad de las proteínas de cada fracción celular fue precipitada con metanol/cloroformo según previamente descrito (Wessel y Flugge. Anall Biochem 1984; 138:141-143). A continuación, las proteínas se resuspendieron en 25 μl de tampón de lisis para DIGE [30 mM de Tris-HCl (pH 8,5), 7M de urea, 2M de tiourea, 4% de CHAPS y 50 mM de DTT] y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se determinó la concentración de proteína con el kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad). Cada una de estas fracciones fue comparada entre los dos tipos de linfomas en geles bidimensionales 2D-DIGE según descrito previamente (Richard *et al*. J Proteome Res 2006; 5:1602-1610) Las fracciones citosólica, nuclear y de membranas se analizaron independientemente. Se realizaron 3 geles bidimensionales (2D) distintos para el estudio de cada fracción. En cada gel se compararon una línea de LBes y una línea de LDCBG respecto a un estándar interno obtenido a partir de una mezcla de proteínas de las 6 líneas celulares estudiadas. Para cada análisis, se marcaron 50 μg de proteína de cada muestra con 400 pmol de fluoróforos Cy3 o Cy5 y 50 μg de proteína del estándar interno con 400 pmol de fluoróforo Cy2, según las instrucciones descritas en el manual Ettan DIGE User (GE Healthcare). El estándar interno estaba constituido por 8,33 μg de proteína de la muestra correspondiente a cada una de las 6 líneas celulares incluidas en este ejemplo. El diseño experimental de 2D-DIGE se muestra en la Figura 1A. Se añadió el mismo volumen de tampón de carga 2x [6 M de urea, 2M de tiourea, 2% de CHAPS, 1% de anfolitos pH 3-11NL (GE Healthcare), 10 mM de DTT y una cantidad mínima de azul de bromofenol] a las muestras y se incubaron 10 min a temperatura ambiente.

Las tiras IPG (18 cm; pH 3-11NL) (GE Healthcare) se rehidrataron previamente con 340 μl/ml de tampón de rehidratación (6M de urea, 2M de tiourea, 2% de CHAPS, 0.5% de anfolitos pH 3-11NL, 12 μl/ml DeStreak y una cantidad mínima de azul de bromofenol). En cada tira IPG se cargaron dos muestras diferentes (marcadas con Cy3 y Cy5) y el estándar interno (la misma cantidad de proteínas de cada muestra, marcada con Cy2), ver Figura 1A.

La primera dimensión (enfoque isoeléctrico, IEF) se llevó a cabo en un IPGphor (GE Healthcare) aplicando los siguientes incrementos de voltaje: 300 V/h 3 h, gradiente 1.000 V 6 h, gradiente 8.000 V 3 h, 8.000 V/h 3 h o hasta que se alcanzan 43.000 V totales. Tras el isoelectroenfoque, las tiras fueron equilibradas con solución de equilibrado [50 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 6M de urea, 30% de glycerol, 2% de SDS y una mínima cantidad de azul de bromofenol]. Las tiras se equilibraron primero con solución de equilibrado reductora (con un 2% de DTT) y luego con solución de equilibrado alquilante (con 4% de iodoacetamida). La segunda dimensión (SDS-PAGE) se realizó en geles de 12.5% de acrilamida (1 mm de grosor, 26 x 21 cm) en cristales de baja fluorescencia, durante 30 min a 2 vatios/gel y 4 h a 20 vatios/gel, a 20ºC.

Las imágenes Cy2-, Cy3- y Cy5- se obtuvieron en un escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) a los valores óptimos de excitación/emisión de cada fluoróforo y se analizaron con el programa ImageQuant. Posteriormente los geles se tiñeron con plata.

La detección de manchas o *spots*, cuantificación y comparación en cada gel se realizó utilizando el programa Differential In-gel Analysis (DIA) and Biological Variation Analysis (BVA), módulos de la versión 6.5 del software DeCyder (GE Healthcare). Brevemente, en DIA, cada *spot* es detectado automáticamente en las imágenes Cy2, Cy3, y Cy5, calculándose su abundancia normalizada. Los mapas de *spots* son exportados al BVA, apareándose cada uno entre los geles. Los criterios de selección que se emplearon para detectar los *spots* con expresión diferencial fueron una variación del ratio del volumen del *spot* de 1,5 veces y un valor *t* test inferior a 0,05, ambos en al menos 6 de las 9 imágenes obtenidas.

Las diferencias principales fueron observadas al comparar las fracciones citosólicas, donde se detectaron diversos *spots* más abundantes en un tipo de linfoma o en el otro (Figura 1B). De entre todos estos *spots*, el número 2520 correspondía a un polipéptido cuya abundancia en la fracción citosólica de las líneas de BL era aproximadamente 28-86 veces superior que en la misma fracción de la línea LDCBG DB (Figuras 2A y 2B).

Las proteínas con expresión diferencial seleccionadas se localizaron en un gel teñido con Sypro Ruby (Sigma). Los *spots* de interés se cortaron mediante un Spot Picker (GE Healthcare) y se transfirieron de forma automática a una placa de 96 pocillos para posteriormente ser digeridos en un digestor Brukker y ser identificados por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. Para la identificación de las proteínas a partir de los espectros peptídicos obtenidos se empleó la base de datos NCBI usando el programa Mascot 2.1.

Un total de 10 péptidos trípticos diferentes obtenidos a partir de la digestión de la proteína correspondiente al *spot* 2520 fueron identificados inequívocamente mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF (Figura 3A). La mayoría de estos péptidos (péptidos 4-10) eran comunes a las isoformas 1 y 2 de la proteína I2PP2A humana mientras

que los tres primeros péptidos, que solapaban entre sí, eran específicos de la isoforma 1 de esta misma proteína. La figura 3B muestra la secuencia de las isoformas 1 y 2 de I2PP2A destacándose en negrita los aminoácidos presentes en los péptidos identificados.

Cabe destacar que el peso molecular teórico de las dos isoformas es de aproximadamente 32 y 33 kDa y que sus puntos isoeléctricos (pI) calculados son de aproximadamente 4,1 y 4,2. Sin embargo, en los geles 2D-DIGE realizados el *spot* 2520 migra como una proteína de peso molecular aparente de aproximadamente 20 kDa y un punto isoeléctrico aproximado de 5,8. Estas diferencias en el tamaño y pI observado sugerían que la forma o formas de I2PP2A detectadas en los geles bidimensionales podrían ser formas truncadas de la proteína en la que tendrían que haberse perdido un gran número de aminoácidos cargados negativamente. Dado que el extremo carboxilo de la proteína es muy rico en residuos de glutámico y aspártico (subrayados en las figura 3), parece muy probable que esta región pudiera haberse eliminado de la proteína. Apoyando esta hipótesis, la primera identificación publicada de la proteína I2PP2A correspondió a una forma truncada de la isoforma 2 procedente de riñón bovino a la que le faltaban los primeros 16 aminoácidos y la región acídica presente en el extremo carboxilo terminal (Li *et al*. Biochemistry 1995;34:1988-96; Li *et al*. J Biol Chem 1996;271:11059-62).

Ejemplo 2

Detección de la proteína I2PP2a en líneas celulares humanas de LB y LDCBG

El método de la presente invención se basa en la detección de la proteína I2PP2A en extractos de proteínas preparados a partir de biopsias de los pacientes. Existen dos isoformas de esta proteína: la isoforma 1, también denominada TAF-I alpha (Identifier Q01105-1) y la isoforma 2, también denominada TAF-I beta (Identifier Q01105-2). La movilidad aparente en geles de poliacrilamida con SDS de las formas completas de la proteína I2PP2A está en torno a 40 kDa, mientras que la de las formas truncadas es de aproximadamente 20 kDa (Li *et al*. Biochemistry 1995;34:1988-96; Li *et al*. J Biol Chem 1996;271:11059-62).

Para llevar a cabo la detección de la proteína I2PP2A se obtuvieron las fracciones citosólica, nuclear, de membranas y organelas y de citoesqueleto de 6 líneas celulares de LB de origen humano (BL2, Akata, Raji, Ramos, DG75 y Mutu-1) y 5 líneas celulares de LDCBG de origen humano (Docyl-19, DB, Toledo, Karpas-422 y SUDHL-6). El fraccionamiento de cada línea celular se llevó a cabo a partir de 12 millones de células empleando el kit "ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit" (Referencia 539791 de la compañía Calbiochem). Las proteínas presentes en cada fracción fueron precipitadas añadiendo ácido tricloracético a una concentración final del 10%. A continuación, las proteínas se resuspendieron en 50 μl de tampón de carga (30 mM Tris-HCl pH 6.5, 7M urea, 2M tiourea, 4%CHAPS y 50 Mm DTT) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se determinó la concentración de proteína con el kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad).

Al utilizar el anticuerpo policlonal sc-5655 de SantaCruz Biotechnology en un ensayo de *inmunoblot* empleando las fracciones citosólicas de las 6 líneas celulares de LB y las 2 líneas celulares de LDCBG se detectó la presencia de las formas completas de I2PP2A (en torno a 40 kDa) en todas las líneas celulares. En cambio, la presencia de las formas truncadas de esta proteína (tamaño aparente inferior a 30 kDa) solo fue detectada en las líneas celulares de LB (Figura 4A). Cuando este mismo ensayo se realizó comparando los extractos citosólicos de 5 líneas celulares de LDCBG y 3 líneas celulares de LB, se obtuvieron resultados similares (Figura 4B).

Las bandas reconocidas por este anticuerpo son específicas puesto que la pre-incubación del anticuerpo sc-5655 con un exceso del péptido al que reconoce específicamente inhibió la detección de todas las bandas en los ensayos de *inmunoblot* (Figura 5).

Se comparó la expresión de I2PP2A en las distintas fracciones obtenidas empleando una línea celular de LBes (DG75) y otra de LDCBG (Toledo) mediante *inmunoblot* con el anticuerpo sc-5655. Los resultados obtenidos indicaron que la mayoría de esta proteína se encuentra en la fracción citosólica, que la gran mayoría de las formas truncada se encuentra sólo en esta fracción y que estas formas truncadas no se detectan en ninguna fracción de la línea de LDCBG (Figura 6).

Para confirmar los datos obtenidos, se realizó un *inmunoblot* con un segundo anticuerpo policlonal dirigido frente a otro epítopo de la proteína I2PP2A. La incubación con el anticuerpo sc-27269 de SantaCruz Biotechnology también permitió detectar formas completas y truncadas de I2PP2A en un extracto citosólico de líneas celulares de LB, mientras que sólo detectaba formas completas en un extracto citosólico de líneas celulares de LDCBG (Figura 7). Estos datos obtenidos con un anticuerpo diferente que reconoce un epítopo distinto en I2PP2A confirma, junto con los datos de inhibición de la detección de las bandas por el péptido específico, que tanto las bandas que migran con un tamaño aproximado de 40 kDa como las bandas que lo hacen con un tamaño menor de 30 kDa corresponden a I2PP2A.

Finalmente, se llevó a cabo la detección de la proteína I2PP2A utilizando el anticuerpo monoclonal sc-133138 de Santacruz Biotechnology (Figura 8). La proporción de formas largas frente a la de formas cortas en las células de Linfoma de Burkitt puede variar entre distintas preparaciones de extracto citosólico. Sin embargo, en las células de Linfoma Difuso nunca se detecta la presencia de formas cortas, por lo que la presencia de formas cortas es indicativa de un Linfoma de Burkitt.

Ejemplo 3

Detección de la proteína I2PP2A en muestras de tumores de pacientes de LBes y LDCBG

Para aplicar este método al diagnóstico clínico se emplearon muestras congeladas en OCT de tumor procedentes de 3 pacientes de LBes y de 3 pacientes de LDCBG. Las muestras fueron cortadas en rodajas de 15 micras con un microtomo y se emplearon 20 rodajas para el ensayo. Estas rodajas se guardaron en un tubo *eppendorf* de 1,5 ml y se mantuvieron en un congelador a -70ºC hasta su utilización. Para llevar a cabo la extracción de proteínas y el análisis posterior de la expresión de I2PP2A se pusieron los tubos que contenían las muestras en hielo, se añadieron 500 microlitros de Solución de Extracción Tisular (8,5 mM Na_2HPO_4; 1,5 mM NaH_2PO_4; 3 mM KCl; 137 mM NaCl; pH 7,4) con un *cocktail* de inhibidores de proteasas y de fosfatases (1 mM de Fluoruro Sódico, 1 mM de Ortovanadato sódico, 1 mM de PMSF, 1 μg/ml de Pespstatina A, 1 μg/ml de Leupeptina, 1 μM de Bestatina y 2 μg/ml de Aprotinina) y se pipeteó la muestra 10 veces con una micropipeta de 100-1000 μl de capacidad. Cada muestra se agitó durante 20 segundos con un *vortex* y se centrifugó a 800xg durante 3 minutos a 4ºC. El sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo y las proteínas presentes en este extracto fueron precipitadas con una concentración final de ácido tricloracético del 10%. Las proteínas se resuspendieron en 50 μl de tampón de carga (30 mM Tris-HCl pH 6.5, 7M urea, 2M tiourea, 4%CHAPS y 50 Mm DTT) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Se determinó la concentración de proteínas con el kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad) y éstas fueron analizadas posteriormente mediante *inmunoblot* con el anticuerpo sc-5655 de SantaCruz Biotechnology. Los resultados obtenidos indicaron que tanto las formas completas como las forma truncadas de I2PP2A se detectaban en las muestras de pacientes de LBes mientras que sólo las formas completas eran detectadas en las muestras de pacientes de LDCBG (Figura 9).

En definitiva, los datos presentados demuestran que la detección de formas truncadas de I2PP2A permitiría distinguir el LB del LDCBG mediante un ensayo muy fácil de llevar a cabo en cualquier hospital del mundo.

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre un LB y un LDCBG que comprende:

a) obtener una muestra biológica aislada de un sujeto, y

b) analizar la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A en la muestra obtenida en (a).

2. Método de obtención de datos útiles según la reivindicación 1, que además comprende un paso:

c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

3. Método de diagnóstico diferencial entre un LB y un LDCBG que comprende los pasos (a)-(c) según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia de un LB.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el análisis de la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A en la muestra obtenida en (a) se lleva a cabo mediante un inmunoensayo.

5. Método según la reivindicación 4 donde el inmunoensayo es un *inmunoblot*.

6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 donde la muestra biológica aislada en el paso a) se selecciona de la lista que comprende: peritoneo, esófago, estómago, intestino, hígado, bazo, páncreas, piel, próstata, testículo, mama, ovario, útero, cérvix, vagina, vulva, riñón, glándula suprarrenal, vejiga, tracto urinario, tejido óseo, músculo, tejido adiposo, tejido fibroso, vasos sanguíneos, glándulas salivares, hígado, bazo, timo, pulmón, tiroides, paratiroides, glándula pituitaria, encéfalo, cerebelo, nervios periféricos, médula ósea, ganglios linfáticos, linfa o sangre.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde el LB es de la variante esporádica (LBes).

8. Kit que comprende un anticuerpo específico contra la región amino terminal o la región central de la proteína I2PP2A para llevar a cabo los métodos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Uso del kit según la reivindicación 8 para analizar la cantidad de las formas truncadas de la proteína I2PP2A y diagnosticar diferencialmente el linfoma de Burkitt del linfoma difuso de células B grandes.

FIG.1

A

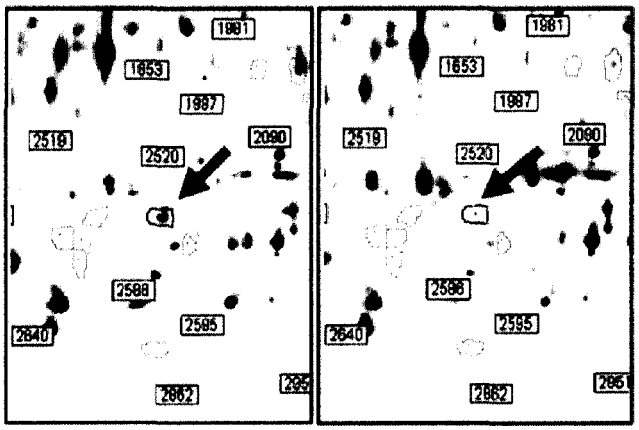
GEL	Cy2 STANDARD	Cy3	Cy5
1	50µg (8.33µg/muestra)	50µg DLBCL 3 (DOCYL19)	50µg Burkitt 1 (DG75)
2	50µg (8.33µg/muestra)	50µg Burkitt 2 (Ramos)	50µg DLBCL 1 (DB)
3	50µg (8.33µg/muestra)	50µg DLBCL 2 (Toledo)	50µg Burkitt 3 (BL2)

B

DOCYL19 / DG75

FIG.2

A



LBes LDCBG

B

	LÍNEA CELULAR	ABUNDANCIA RELATIVA SPOT 2520
LBes	DG75	71,93
	Ramos	86,19
	BL2	28,42
LDCBG	DOCYL-19	6,82
	DB	1,0
	Toledo	1,37

FIG.3

A

```
1    KKKPRPPPALGPEETSASAGLPKK
2    KKPRPPPALGPEETSASAGLPKK          Isoforma 1
3    KKPRPPPALGPEETSASAGLPKKG

4    KEQQEAIEHIDEVQNEIDRL
5    KEQQEAIEHIDEVQNEIDRLNEQASEEILKV
6    RLNEQASEEILKVEQKY
7    KLRQPFFQKR                       Comunes
8    RVEVTEFEDIKS
9    KSGYRIDFYFDENPYFENKV
10   RIDFYFDENPYFENKV
```

B

Isoform 1 (TAF-I alpha) 290aa pI 4,23 33,489 dalton Identifier: Q01105-1

```
  1 MAPKRQSPLP PQKKKPRPPP ALGPEETSAS AGLPKKGEKE QQEAIEHIDE
 51 VQNEIDRLNE QASEEILKVE QKYNKLRQPF FQKRSELIAK IPNFWVTTFV
101 NHPQVSALLG EEDEEALHYL TRVEVTEFED IKSGYRIDFY FDENPYFENK
151 VLSKEFHLNE SGDPSSKSTE IKWKSGKDLT KRSSQTQNKA SRKRQHEEPE
201 SFFTWFTDHS DAGADELGEV IKDDIWPNPL QYYLVPDMDD EEGEGEEDDD
251 DDEEEEGLED IDEEGDEDEG EEDEDDDEGE EGEEDEGEDD
```

Isoform 2 (TAF-I beta) 277aa pI 4,12 32,103 dalton Identifier: Q01105-2

```
  1 MSAPAAKVSK KELNSNHDGA DETSEKEQQE AIEHIDEVQN EIDRLNEQAS EEILKVEQKY
 61 NKLRQPFFQK RSELIAKIPN FWVTTFVNHP QVSALLGEED EEALHYLTRV EVTEFEDIKS
121 GYRIDFYFDE NPYFENKVLS KEFHLNESGD PSSKSTEIKW KSGKDLTKRS SQTQNKASRK
181 RQHEEPESFF TWFTDHSDAG ADELGEVIKD DIWPNPLQYY LVPDMDDEEG EGEEDDDDDE
241 EEEGLEDIDE EGDEDEGEED EDDDEGEEGE EDEGEDD
```

FIG.4

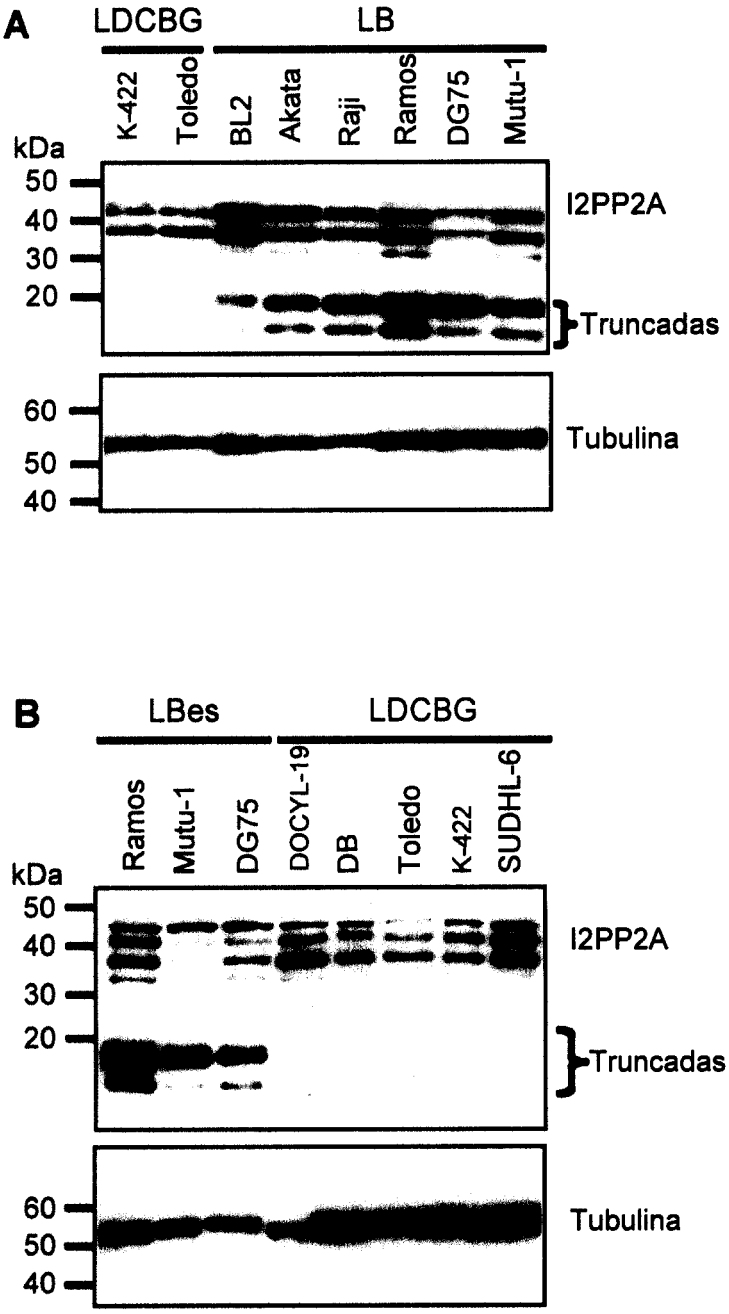

A
LDCBG
LB
K-422
Toledo
BL2
Akata
Raji
Ramos
DG75
Mutu-1
kDa
50
40
30
20
I2PP2A
Truncadas
60
50
40
Tubulina
B
LBes
LDCBG
Ramos
Mutu-1
DG75
DOCYL-19
DB
Toledo
K-422
SUDHL-6
kDa
50
40
30
20
I2PP2A
Truncadas
60
50
40
Tubulina

FIG.5

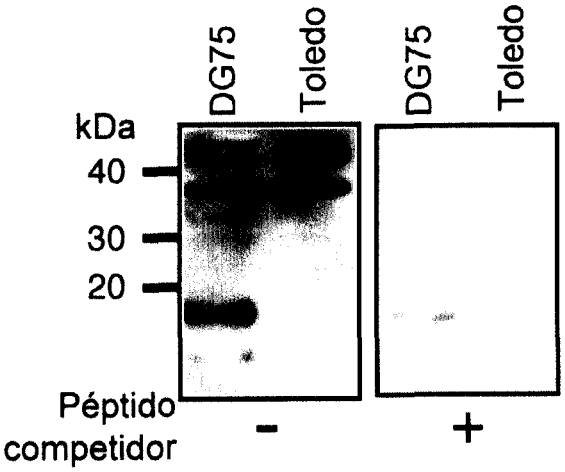


FIG.6

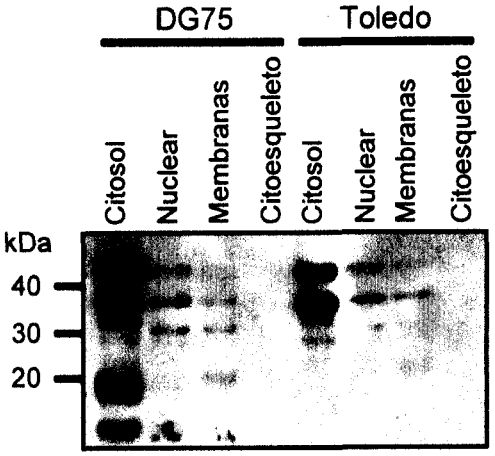


FIG.7

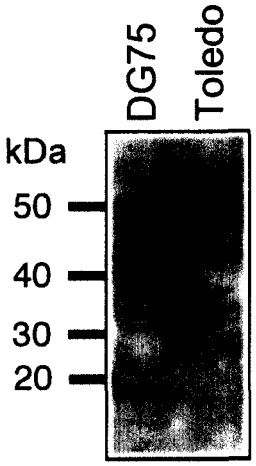


FIG.8

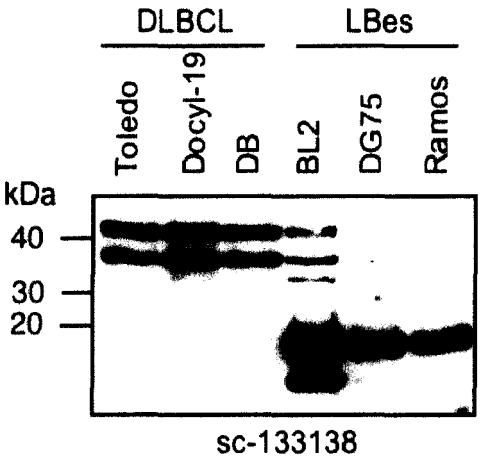
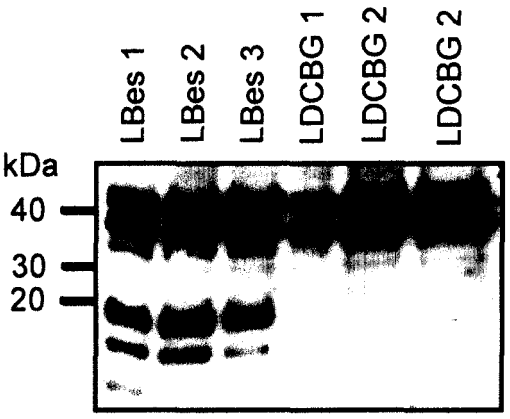

DLBCL
LBes
Toledo
Docyl-19
DB
BL2
DG75
Ramos
kDa
40
30
20
sc-133138

FIG.9


LBes 1
LBes 2
LBes 3
LDCBG 1
LDCBG 2
LDCBG 2
kDa
40
30
20

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
Universidad Autónoma de Madrid

<120> Método de diagnóstico diferencial entre el Linfoma de Burkitt y el Linfoma Difuso de Células B Grandes.

<130> 1641.399

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 6808
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

catgtcggcg ccggcggcca aagtcagtaa aaaggagctc aactccaacc acgacggggc
60

cgacgagacc tcaggtgaga gcagcgagcc cgggggccgg cccgcgccgc catcttcgcc
120

gcccgccccg gcccgcaggc cgccggcggg gcccggggcg cgcgcggggg gcgccgggcg
180

ggggggcgcg gcgcggccgg gcgggggccc gcggactcgg cgccctttt tgtgcgcggc
240

tgggctgggg gcctgggtgg cccgcgccgc ggcggccgcg ctgcgaggcg ggggcgctgc
300

ggcctgctcg gcgcgggcgg aggagacccc cccttcctct ccccccctccc tcgctctcct
360

ccccctccct ccctcccgag aagcctctct ttattgtgct ccgccatgat gcctcgctcc
420

catcagccgc cgccgccgcc acatggtgcg gccggacgcg gccccgcgcc cgacctcccg
480

cgcggttccg cttcgcgccc ggcccgcggc ggcgcccccg gcacccccgc ccagaggctg
540

gccccggcgg ggcttctgcc tggagctcgg gtggggtggg ggcgcgggga acacgcgggc
600

ggccgcgcgc tgggccttgg ccggccggga ggatgctctg gccagcccgg gcgcactccc
660

cacgtggggc ggccgccccg tcgcgccagc gtgcggagaa acctggcgcc gcgaccagtg
720

tatcgggggt cttggaaatg gctaagaaag ctggcctctg cctaggaggc tctcggcagg
780

ggggctgcca atccgggatg gttaccggaa atgaaccgcg cgatctggcc ctttcacacc
840

cacttagctt tgtagggggt ttgtagtctt tacaggacaa aagggcacct attccagagc
900

acacccccttttcttcctctcccttctgtgcctcactgctttccgatctcatagttgctc
960

ccagtaagtgctccaaagtcgtgtggggccgcatctgaggtctgcccgcctgaattgggt
1020

tggaggggttcatgttctgagaaggcgaaggccagggtgtaggatggtgcccgtgactt
1080

tccagtcttgtaggcgtgcctggtatcttcatcgtaatagcagagtcgtcaactttcta
1140

tgaaaggtggttttaccttgataggtggtagtggtggcctaatttgtatcattgtcatgg
1200

gtttagtttccatattctagttagcagctgctactgttcttcttgcaagtgtataatgtga
1260

aataataaacgtgaagacttctgaataaggttattctgtgtctttcatagtagaaacctt
1320

aatgatcggtctgttgtagtgaaactcttaaaaaggcgctatagaaaaccaatttctga
1380

gtaaaccagcagacagcatgacttgtaaatggtcttttaatttaaaaagaaattagt
1440

cagctacaagcatgaacatgtggaacgcttacctttgtactaggcgtttttgtttttgtt
1500

ttaatggcttttggaatattatagtattaacatctggaaaactaggtaaatttatcttag
1560

aattaagtttttgctccttttttgcagaaaaagaacagcaagaagcgattgaacacatt
1620

gatgaagtacaaaatgaaatagacaggtaacatttttcttaatatacttcggagaaattt
1680

tctgagatgtgtctaatagccggtaattatcgaagctatggtcaaatctatccactgtc
1740

aaaggggaaatgattctaacttggttggaatacttatgtagattcagtgtttttggtg
1800

aagtgattgtacagaagtttttgaaagtgcattgacctacaaggtttggtttgctttc
1860

aaagactgaaaattgtctgaattgcagtgtaggtcttctgatggtttagcagtgtggcat
1920

cagtggttgctctaacttgccttacaacttgttatggattagccacttttatttagaaat
1980

cgcgcttgaggggaaacaattgaaattggactggaaatggagtgggcgaagtaaatacaca
2040

cgttaccagagtgttgagtttgggcactctaacagtcattattactcagtgtttattga
2100

taaatcagacaaaattgccatcttagtttgagtgtctaaattaggtgataatggttatt
2160

ataatttggttattttgcatgactcaagctagtaagtaatacactctgtaatctcaacc
2220

aatttttaa tttgttaaat actatcattg tcaacatctt ttttcatttg cttcagactt 2280

aatgaacaag ccagtgagga gattttgaaa gtagaacaga aatataacaa actccgccaa 2340

ccatttttc agaagaggtc agaattgatc gccaaaatcc caaatttttg ggtaacaaca 2400

tttgtcaacc atccacaagg tatgttttgg acagggcatt gttaaaggat aaacagtgtt 2460

tgttagaatg gaggaagctt ggtgaagact tagtccagca tgctgggttg cgtgcaacaa 2520

agacaggctg ggtgcggtgg cgcacctgta atcccagcac tttgggaggc cgaggtgggt 2580

ggatcacttg aggtcagggg ttcgaaacca gcttggccaa caggttgaaa ccccgtctct 2640

actaaaaata caaaaaaaat tagctgggcg tggtggcgcg cgcttgtaat cccagctact 2700

cgctacttgg gaggctgagg caggagaatc gcttgaaccc aggaggggga ggttgcagtg 2760

agccgagatt gtgcgctttt gcattccagc ctgggcgaca agagtgagac tgtctcaaaa 2820

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aacctcaaag acgggaaaag atatacagct actgctttct 2880

attctgttta ggagaagcta tattctaatt gcttgatgaa agatagtgac agtctgatat 2940

tgagcaattg cctttagtca ataatgggtt tataaaacca aagatgctca ctaagttcgg 3000

aaaaatttta aagggatcac ttaaattgtt gttagtgtgt gcctgttgaa aattcagctg 3060

acctgtaatt ttctggccta gtgtctgcac tgcttgggga ggaagatgaa gaggcactgc 3120

attatttgac cagagttgaa gtgacagaat ttgaagatat taaatcaggt tacagaatag 3180

attttgtaag tatctctaac ttaatcttgt ttgccactgt ggaaattaat gtgagctttg 3240

gttggaagac ctgttcatat ttctaatctt tcaattattt attacagtat tttgatgaaa 3300

atccttactt tgaaaataaa gttctctcca aagaatttca tctgaatgag agtggtgatc 3360

catcttcgaa gtccaccgaa atcaaatgga aatctggaaa ggtatgtttt gaggaattat 3420

ttgacaaaaa tagcattttg cctatttcag tttagtttta accacttaca agtgcttgat 3480

actttggtca tgtggctaaa tacaaaacct taaaatataa aacgttccag tgtgctgaag 3540

ccaagtatta cagtagttta gggttctcat tagatactac agatgtaggc aggaagatct
3600

cttgagccta ggagtttacc ctgggcaaca tagaccctta ccttccaaaa aacaaaaaaa
3660

aagagaaaaa tctagcccaa gtttaagaat tgagaactgg actaaatttt ttgttgctgt
3720

tgttttctgc agtggtgact gagctcttca aatggcttgc catttctcaa aatcatttac
3780

atccgtattt aggtagtaag acatagttta gatatttata ctgtgttgtg ctagtggctg
3840

ttaacagtgg aactaatttt atggaaaacc aaatgtagtt gatactacct ctacctgctg
3900

tacagtttta taattgctct taggtaataa tggtagcgta gatagtatac tgatatttgt
3960

tttgcttagc ttttggggaa aatcttattt tttaaattat agggagtttg ggtgttatgg
4020

agagattgta tcaaaagctc ttctggtatt catttaggat ttgacgaaac gttcgagtca
4080

aacgcagaat aaagccagca ggaagaggca gcatgaggaa ccagagagct tctttacctg
4140

gtttactgac cattctgatg caggtgctga tgagttagga gaggtcatca aagatgatat
4200

ttggccaaac ccattacagt actacttggt gagttctaat actcatttat tcaaggttgg
4260

acttgtctcg gttgtttaaa aatgagtcct tatattgtgc tttttttttt ttaaggttcc
4320

cgatatggat gatgaagaag gagaaggaga agaagatgat gatgatgatg aagaggagga
4380

aggattagaa gatattgacg aagaagggga tgaggatgaa ggtgaagaag atgaagatga
4440

tgatgaaggg gaggaaggag aggtaaaaga aaatttggct aaacccacaa agataacttt
4500

taaagaattc atgttatttt ggggtgtata tatatatata tagtgtggta gaactgacca
4560

gaactgattg tggaaaaaaa gtaagccatt ttgttgttca agaattaagg aaatgtttga
4620

taagcacatg gtactaatgt ttaactaggt tttttttggt tttttttttgg gtttttttgg
4680

ttagacttat caccacccaa gcttgttttt ccctagccag tacttaggca atataggcag
4740

tgtagctggt caaattctga catctctgaa ataacaaagt ttcatgtatt ttcgacaaac
4800

tgcacaattt ctgaatagtc aaattaggat aggttggttt tatttcggat tatttgatcc
4860

gaaatatacc tgatttggtt agaactgaag ttactaatta atctgaagca acatcatcac
4920

gggtgtttcc ttcgatgcag ctgacttaca ggtttagaaa ctggagtgcc cccaggggca
4980

ctcgtggggt ccattgtggt ccatatgaaa gcaagtctca gcattaatcc tgaagattaa
5040

ctgcccactt tttctttcag gaggatgaag gagaagatga ctaaatagaa cactgatgga
5100

ttccaacctt cctttttta aattttctcc agtccctggg agcaagttgc agtctttttt
5160

tttttttttt tttttttcc ctcttgtgct cagtcgccct gttcttgagg tctcttttct
5220

ctactccatg gttctcaatt tatttggggg gaaatacctt gagcagaata caatgggaaa
5280

agagtctcta cccctttctg ttcgaagttc atttttatcc cttcctgtct gaacaaaaac
5340

tgtatggaat caacaccacc gagctctgtg ggaaaaaaga aaaacctgct cccttcgctc
5400

tgctggaagc tggagggtgc taggcccctg tgtagtagtg catagaattc tagctttttt
5460

cctcctttct ctgtatattg ggctcagaga gtacactgtg tctctatgtg aatatggaca
5520

gttagcattt accaacatgt atctgtctac tttctcttgt ttaaaaaaag aaaaaaaaac
5580

ttaaaaaaat ggggttatag aaggtcagca aagggtgggt ttgagatgtt tgggtgggtt
5640

aagtgggcat tttgacaaca tggcttctcc tttggcatgt ttaattgtga tatttgacag
5700

acatccttgc agtttaagat gacactttta aaataaattc tctcctaatg atgacttgag
5760

ccctgccact caatgggaga atcagcagaa cctgtaggat cttatttgga attgacattc
5820

tctattgtaa ttttgttcct gtttattttt aaattttctt tttgtttcac tggaaaggaa
5880

agatgatgct cagttttaaa cgttaaaagt gtacaagttg ctttgttaca ataaaactaa
5940

atgtgtacac aaaggatttg atgcttttct ctcagcatag gtatgcttac tatgaccttc
6000

caagtttgac ttgtataaca tcactgtcaa actttgtcac cctaacttcg tatttttga
6060

tacgcacttt gcaggatgac ctcagggcta tgtggattga gtaatgggat ttgaatcaat
6120

gtattaatat ctccatagct gggaaacgtg ggttcaattt gccattggtt tctgaaagta
6180

ttcacatcat ttgggatacc agatagctca atactctctg agtacattgt gcccttgatt
6240

tttatctcca agtggcagtt tttaaaattg gccttttacc tggatataaa ttaattgtgc
6300

ctgccaccac catccaacag acctggtgct ctaatgccaa gttatacacg ggacagttgc
6360

tggcatgtct tcattggcta tataaaatgt ggccaagaag ataggctctc agtaagaagt
6420

ctgatggtga gcagtaactg tccctgcttt ctggtataaa gctctcaaat gtgaccatgt
6480

gaatctgggt gggataatgg actcagctct gtctgctcaa tgccattgtg cagagaagca
6540

ccctaatgca taagcttttt aatgctgtaa aatatagtcg ctgaaattaa atgccacttt
6600

ttcagaggtg aattaatgga cagtctggtg aacttcaaaa gctttttgat gtataaaact
6660

tgataaatgg aactattcca tcaataggca aaagtgtaac aacctatcta gatggatagt
6720

atgtaatttc tgcacaggtc tctgtttagt aaatacatca ctgtataccg atcaggaatc
6780

ttgctccaat aaaggaacat aaagattt
6808

<210> 2
<211> 290
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Ala Pro Lys Arg Gln Ser Pro Leu Pro Pro Gln Lys Lys Lys Pro
1 5 10 15

Arg Pro Pro Pro Ala Leu Gly Pro Glu Glu Thr Ser Ala Ser Ala Gly
20 25 30

Leu Pro Lys Lys Gly Glu Lys Glu Gln Gln Glu Ala Ile Glu His Ile
35 40 45

Asp Glu Val Gln Asn Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Gln Ala Ser Glu
50 55 60

Glu Ile Leu Lys Val Glu Gln Lys Tyr Asn Lys Leu Arg Gln Pro Phe
65 70 75 80

Phe Gln Lys Arg Ser Glu Leu Ile Ala Lys Ile Pro Asn Phe Trp Val
85 90 95

Thr Thr Phe Val Asn His Pro Gln Val Ser Ala Leu Leu Gly Glu Glu

100 105 110

Asp Glu Glu Ala Leu His Tyr Leu Thr Arg Val Glu Val Thr Glu Phe
115 120 125

Glu Asp Ile Lys Ser Gly Tyr Arg Ile Asp Phe Tyr Phe Asp Glu Asn
130 135 140

Pro Tyr Phe Glu Asn Lys Val Leu Ser Lys Glu Phe His Leu Asn Glu
145 150 155 160

Ser Gly Asp Pro Ser Ser Lys Ser Thr Glu Ile Lys Trp Lys Ser Gly
165 170 175

Lys Asp Leu Thr Lys Arg Ser Ser Gln Thr Gln Asn Lys Ala Ser Arg
180 185 190

Lys Arg Gln His Glu Glu Pro Glu Ser Phe Phe Thr Trp Phe Thr Asp
195 200 205

His Ser Asp Ala Gly Ala Asp Glu Leu Gly Glu Val Ile Lys Asp Asp
210 215 220

Ile Trp Pro Asn Pro Leu Gln Tyr Tyr Leu Val Pro Asp Met Asp Asp
225 230 235 240

Glu Glu Gly Glu Gly Glu Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu Glu Glu Glu
245 250 255

Gly Leu Glu Asp Ile Asp Glu Glu Gly Asp Glu Asp Glu Gly Glu Glu
260 265 270

Asp Glu Asp Asp Asp Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu Asp Glu Gly Glu
275 280 285

Asp Asp
290

<210> 3
<211> 2863
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 3

gtgcccctgc agagcgaggc agagagcaac taaaagaaat ttctcctgat tggagggtgg
60

gtgggatgag gctgggggag ggggccgggg tgtgtgtccc actgtcatgt aaatatccct
120

tccaggcagg gcggctccag tgcagattta agccgctggc acctggggca gtctcagtgt
180

tcagcctgct tccggacggg cgaggagact cgtggtctgg ttctgggact tccctaacag
240

catggcccct aaacgccagt ctccactccc gcctcaaaag aagaaaccaa gaccacctcc
300

tgctctggga ccggaggaga catcggcctc tgcaggcttg ccgaagaagg gagaaaaaga
360

acagcaagaa gcgattgaac acattgatga agtacaaaat gaaatagaca gacttaatga
420

acaagccagt gaggagattt tgaaagtaga acagaaatat aacaaactcc gccaaccatt
480

ttttcagaag aggtcagaat tgatcgccaa aatcccaaat ttttgggtaa caacatttgt
540

caaccatcca caagtgtctg cactgcttgg ggaggaagat gaagaggcac tgcattattt
600

gaccagagtt gaagtgacag aatttgaaga tattaaatca ggttacagaa tagattttta
660

ttttgatgaa aatccttact ttgaaaataa agttctctcc aaagaatttc atctgaatga
720

gagtggtgat ccatcttcga agtccaccga aatcaaatgg aaatctggaa aggatttgac
780

gaaacgttcg agtcaaacgc agaataaagc cagcaggaag aggcagcatg aggaaccaga
840

gagcttcttt acctggttta ctgaccattc tgatgcaggt gctgatgagt taggagaggt
900

catcaaagat gatatttggc caaacccatt acagtactac ttggttcccg atatggatga
960

tgaagaagga gaaggagaag aagatgatga tgatgatgaa gaggaggaag gattagaaga
1020

tattgacgaa gaaggggatg aggatgaagg tgaagaagat gaagatgatg atgaagggga
1080

ggaaggagag gaggatgaag gagaagatga ctaaatagaa cactgatgga ttccaacctt
1140

cctttttta aattttctcc agtccctggg agcaagttgc agtctttttt tttttttttt
1200

tttttttcc ctcttgtgct cagtcgccct gttcttgagg tctcttttct ctactccatg
1260

gttctcaatt tatttggggg gaaatacctt gagcagaata caatgggaaa agagtctcta
1320

cccctttctg ttcgaagttc atttttatcc cttcctgtct gaacaaaaac tgtatggaat
1380

caacaccacc gagctctgtg ggaaaaaaga aaaacctgct cccttcgctc tgctggaagc
1440

tggagggtgc taggcccctg tgtagtagtg catagaattc tagctttttt cctcctttct
1500

ctgtatattg ggctcagaga gtacactgtg tctctatgtg aatatggaca gttagcattt
1560

accaacatgt atctgtctac tttctcttgt ttaaaaaaag aaaaaaaaac ttaaaaaaat
1620

ggggttatag aaggtcagca aagggtgggt ttgagatgtt tgggtgggtt aagtgggcat
1680

tttgacaaca tggcttctcc tttggcatgt ttaattgtga tatttgacag acatccttgc
1740

agtttaagat gacactttta aaataaattc tctcctaatg atgacttgag ccctgccact
1800

caatgggaga atcagcagaa cctgtaggat cttatttgga attgacattc tctattgtaa
1860

ttttgttcct gtttattttt aaattttctt tttgtttcac tggaaaggaa agatgatgct
1920

cagttttaaa cgttaaaagt gtacaagttg ctttgttaca ataaaactaa atgtgtacac
1980

aaaggatttg atgcttttct ctcagcatag gtatgcttac tatgaccttc caagtttgac
2040

ttgtataaca tcactgtcaa actttgtcac cctaacttcg tatttttga tacgcacttt
2100

gcaggatgac ctcagggcta tgtggattga gtaatgggat ttgaatcaat gtattaatat
2160

ctccatagct gggaaacgtg ggttcaattt gccattggtt tctgaaagta ttcacatcat
2220

ttgggatacc agatagctca atactctctg agtacattgt gcccttgatt tttatctcca
2280

agtggcagtt tttaaaattg gccttttacc tggatataaa ttaattgtgc ctgccaccac
2340

catccaacag acctggtgct ctaatgccaa gttatacacg ggacagttgc tggcatgtct
2400

tcattggcta tataaaatgt ggccaagaag ataggctctc agtaagaagt ctgatggtga
2460

gcagtaactg tccctgcttt ctggtataaa gctctcaaat gtgaccatgt gaatctgggt
2520

gggataatgg actcagctct gtctgctcaa tgccattgtg cagagaagca ccctaatgca
2580

taagcttttt aatgctgtaa aatatagtcg ctgaaattaa atgccacttt ttcagaggtg
2640

aattaatgga cagtctggtg aacttcaaaa gctttttgat gtataaaact tgataaatgg
2700

aactattcca tcaataggca aaagtgtaac aacctatcta gatggatagt atgtaatttc
2760

tgcacaggtc tctgtttagt aaatacatca ctgtataccg atcaggaatc ttgctccaat
2820

aaaggaacat aaagattttt tttggaaaaa aaaaaaaaaa aaa
2863

<210> 4
<211> 277
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met Ser Ala Pro Ala Ala Lys Val Ser Lys Lys Glu Leu Asn Ser Asn
1 5 10 15

His Asp Gly Ala Asp Glu Thr Ser Glu Lys Glu Gln Gln Glu Ala Ile
20 25 30

Glu His Ile Asp Glu Val Gln Asn Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Gln
35 40 45

Ala Ser Glu Glu Ile Leu Lys Val Glu Gln Lys Tyr Asn Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Pro Phe Phe Gln Lys Arg Ser Glu Leu Ile Ala Lys Ile Pro Asn
65 70 75 80

Phe Trp Val Thr Thr Phe Val Asn His Pro Gln Val Ser Ala Leu Leu
85 90 95

Gly Glu Glu Asp Glu Glu Ala Leu His Tyr Leu Thr Arg Val Glu Val
100 105 110

Thr Glu Phe Glu Asp Ile Lys Ser Gly Tyr Arg Ile Asp Phe Tyr Phe
115 120 125

Asp Glu Asn Pro Tyr Phe Glu Asn Lys Val Leu Ser Lys Glu Phe His
130 135 140

Leu Asn Glu Ser Gly Asp Pro Ser Ser Lys Ser Thr Glu Ile Lys Trp
145 150 155 160

Lys Ser Gly Lys Asp Leu Thr Lys Arg Ser Ser Gln Thr Gln Asn Lys
165 170 175

Ala Ser Arg Lys Arg Gln His Glu Glu Pro Glu Ser Phe Phe Thr Trp
180 185 190

Phe Thr Asp His Ser Asp Ala Gly Ala Asp Glu Leu Gly Glu Val Ile
195 200 205

Lys Asp Asp Ile Trp Pro Asn Pro Leu Gln Tyr Tyr Leu Val Pro Asp
210 215 220

Met Asp Asp Glu Glu Gly Glu Gly Glu Glu Asp Asp Asp Asp Asp Glu
225 230 235 240

Glu Glu Glu Gly Leu Glu Asp Ile Asp Glu Glu Gly Asp Glu Asp Glu
245 250 255

Gly Glu Glu Asp Glu Asp Asp Asp Glu Gly Glu Glu Gly Glu Glu Asp
260 265 270

Glu Gly Glu Asp Asp
275

<210> 5
<211> 2936
<212> DNA
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

gtaggaggag gtggaggagg aggcggctcg ggagagcgag cagcgagctg gctggatcgc
60

cgagcgcgag tgagggagcc gagccgcccg ccgccgccgc ctccgcctcc cctccgcgaa
120

caggagcccg ggccggggcc cggcacgccg ccccagcccg tccctcggcg tcaggccgcg
180

agggtagcgc gcgcgagcga gcgaggggga gggagagcga gcgagcgccg ggaggaggcg
240

gccggaccga gcgggcgccc gcgcgtgtgg cgtgagggga agccgcttgc ccgccccctt
300

cgccttccct tctctccccc tccccgctcc ccccccgacc gcggagcagc accatgtcgg
360

cgccggcggc caaagtcagt aaaaaggagc tcaactccaa ccacgacggg gccgacgaga
420

cctcagaaaa agaacagcaa gaagcgattg aacacattga tgaagtacaa aatgaaatag
480

acagacttaa tgaacaagcc agtgaggaga ttttgaaagt agaacagaaa tataacaaac
540

tccgccaacc atttttcag aagaggtcag aattgatcgc caaaatccca aatttttggg
600

taacaacatt tgtcaaccat ccacaagtgt ctgcactgct tggggaggaa gatgaagagg
660

cactgcatta tttgaccaga gttgaagtga cagaatttga agatattaaa tcaggttaca
720

gaatagattt ttattttgat gaaaatcctt actttgaaaa taaagttctc tccaaagaat
780

ttcatctgaa tgagagtggt gatccatctt cgaagtccac cgaaatcaaa tggaaatctg
840

gaaaggattt gacgaaacgt tcgagtcaaa cgcagaataa agccagcagg aagaggcagc

900

atgaggaacc agagagcttc tttacctggt ttactgacca ttctgatgca ggtgctgatg
960

agttaggaga ggtcatcaaa gatgatattt ggccaaaccc attacagtac tacttggttc
1020

ccgatatgga tgatgaagaa ggagaaggag aagaagatga tgatgatgat gaagaggagg
1080

aaggattaga agatattgac gaagaagggg atgaggatga aggtgaagaa gatgaagatg
1140

atgatgaagg ggaggaagga gaggaggatg aaggagaaga tgactaaata gaacactgat
1200

ggattccaac cttccttttt ttaaattttc tccagtccct gggagcaagt tgcagtcttt
1260

tttttttttt tttttttttt tccctcttgt gctcagtcgc cctgttcttg aggtctcttt
1320

tctctactcc atggttctca atttatttgg ggggaaatac cttgagcaga atacaatggg
1380

aaaagagtct ctacccctttt ctgttcgaag ttcattttta tcccttcctg tctgaacaaa
1440

aactgtatgg aatcaacacc accgagctct gtgggaaaaa agaaaaacct gctcccttcg
1500

ctctgctgga agctggaggg tgctaggccc ctgtgtagta gtgcatagaa ttctagcttt
1560

tttcctcctt tctctgtata ttgggctcag agagtacact gtgtctctat gtgaatatgg
1620

acagttagca tttaccaaca tgtatctgtc tactttctct tgtttaaaaa aagaaaaaaa
1680

aacttaaaaa aatggggtta tagaaggtca gcaaagggtg ggtttgagat gtttgggtgg
1740

gttaagtggg cattttgaca acatggcttc tcctttggca tgtttaattg tgatatttga
1800

cagacatcct tgcagtttaa gatgacactt ttaaaataaa ttctctccta atgatgactt
1860

gagccctgcc actcaatggg agaatcagca gaacctgtag gatcttattt ggaattgaca
1920

ttctctattg taattttgtt cctgtttatt tttaaatttt ctttttgttt cactggaaag
1980

gaaagatgat gctcagtttt aaacgttaaa agtgtacaag ttgctttgtt acaataaaac
2040

taaatgtgta cacaaaggat ttgatgcttt tctctcagca taggtatgct tactatgacc
2100

ttccaagttt gacttgtata acatcactgt caaactttgt caccctaact tcgtattttt
2160

tgatacgcac tttgcaggat gacctcaggg ctatgtggat tgagtaatgg gatttgaatc

2220

aatgtattaa tatctccata gctgggaaac gtgggttcaa tttgccattg gtttctgaaa
2280

gtattcacat catttgggat accagatagc tcaatactct ctgagtacat tgtgcccttg
2340

atttttatct ccaagtggca gtttttaaaa ttggcctttt acctggatat aaattaattg
2400

tgcctgccac caccatccaa cagacctggt gctctaatgc caagttatac acgggacagt
2460

tgctggcatg tcttcattgg ctatataaaa tgtggccaag aagataggct ctcagtaaga
2520

agtctgatgg tgagcagtaa ctgtccctgc tttctggtat aaagctctca aatgtgacca
2580

tgtgaatctg ggtgggataa tggactcagc tctgtctgct caatgccatt gtgcagagaa
2640

gcaccctaat gcataagctt tttaatgctg taaaatatag tcgctgaaat taaatgccac
2700

tttttcagag gtgaattaat ggacagtctg gtgaacttca aaagcttttt gatgtataaa
2760

acttgataaa tggaactatt ccatcaatag gcaaaagtgt aacaacctat ctagatggat
2820

agtatgtaat ttctgcacag gtctctgttt agtaaataca tcactgtata ccgatcagga
2880

atcttgctcc aataaaggaa cataaagatt ttttttggaa aaaaaaaaaa aaaaaa
2936

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 200900651

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 09.03.2009

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N33/574*** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	OUELLET, V, LING, T. H., NORMANDIN, K. et al. Immunohistochemical profiling of benign, low malignant potential and low grade serous epithelial ovarian tumors. BMC Cancer. Noviembre 2008, Vol. 8, páginas 386-393. ISSN 1471-2407. <DOI: 10.1186/1471-2407/8/346>.	8
A		4-6,9
X	CARLSON, S. G., ENG, E., KIM, E.-G. et al. Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. Journal of the American Society of Nephrology. Octubre 1998, Vol. 9, Nº 10, páginas 1873-1880. ISSN 1046-6673.	8
A		4-6,9
A	US 20070105136 A1 (BEA S. M. & OTROS) 10.05.2007, párrafos [0114-0124]; ejemplos 18,19.	1,2,6,7,9
A	SIRMA, S. EKMEKCI, C. G., GROSVELD, G., OZBEK, U. SET (TAF-IB) gene is highly expressed in acute leukemia patients without associated with methylation status. Blood. Noviembre 2004, Vol. 104, Nº 11, parte 2, página 162B, (resumen) Base de datos BIOSIS. [recuperado el 27.11.2011] Recuperado de EPOQUE; Nº de acceso PREV200510266959.	4-6,8,9

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	Examinador	Página
26.01.2011	E. Relaño Reyes	1/5

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

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, TXTE, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, NPL, COMPENDX, INSPEC, XPESP, XPOAC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.01.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-7, 9	**SI**
	Reivindicaciones	8	**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-7, 9	**SI**
	Reivindicaciones	8	**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	OUELLET, V. et al. BMC Cancer. Noviembre 2008, Vol. 8, páginas 386-393.	26.11.2008
D02	CARLSON, S. G. et al. Journal of the American Society of Nephrology. Octubre 1998, Vol. 9, Nº 10, páginas 1873-1880.	10.1998
D03	US 20070105136 A1	10.05.2007
D04	SIRMA, S. et al. Blood. Noviembre 2004, Vol. 104, Nº 11, parte 2, página 162B.	16.11.2004

D01 divulga un análisis inmunohistoquímico de diferentes tipos de tumores de ovario, con el fin de encontrar marcadores que los distingan. Entre los genes estudiados se encuentra *set*, que codifica para la proteína I2PP2A.

En D02 se investiga la expresión de SET (I2PP2A) tanto a nivel de ARNm como de proteína, en células renales en desarrollo y adultas, y en distintas líneas tumorales de riñón. Para medir la expresión proteica, se obtuvieron anticuerpos policlonales. De este modo, se concluyó que la expresión de SET se encuentra aumentada en el riñón en desarrollo y en el tumor de Wilms.

D03 optimiza un método de diagnóstico diferencial entre distintos tipos de linfomas, así como de pronóstico de los mismos, mediante un "microarray" de expresión. En este análisis se incluye el estudio del linfoma de Burkitt (LB) y del linfoma difuso de células B grandes (LDCBG). El poder distinguir el LB del LDCBG es de vital importancia para la elección de la terapia adecuada. Aunque el LB se caracteriza por el incremento de la expresión de *c-myc*, y la disminución de NF-κB, algunos LDCBG también presentan estas características, por lo que es necesario buscar otros marcadores. Sin embargo, entre los genes seleccionados para dicho fin, no se encuentra *set*.

En D04 se investiga la expresión de SET en pacientes con leucemia linfoblástica aguda o con leucemia mieloide aguda. En ambos casos se encontró un aumento en la expresión de la proteína.

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, tiene por objeto un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial del linfoma de Burkitt esporádico (LBes) y el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), mediante el análisis de las formas truncadas de la proteína I2PP2A. En este método, el incremento en la cantidad de formas truncadas con respecto al valor de referencia, es indicativo de la presencia del LB (reivindicaciones de la 1 a la 3, 6 y 7). La medición de las formas truncadas de I2PP2A se puede realizar mediante "inmunoblot" (reivindicaciones 4 y 5). Así mismo, también se incluye en esta solicitud, un kit que comprenda un anticuerpo específico frente a la región amino terminal o la región central de I2PP2A (reivindicación 8) y el uso de dicho kit en el diagnóstico diferencial entre el LB y el LDCBG (reivindicación 9).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)

1.1 REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 7 Y 9

Las reivindicaciones de la 1 a la 7 y 9 cumplen el requisito de novedad.

1.2. REIVINDICACIÓN 8

El objeto de la reivindicación 8, es un kit que comprende un anticuerpo específico frente a la región amino terminal o la región central de I2PP2A.

D01 divulga la existencia del anticuerpo comercial sc-5655, específico de región amino terminal de I2PP2A, y su uso en el análisis de la expresión de dicha proteína.

Por lo tanto, el objeto de la invención recogido en la reivindicación 8, deriva directamente y sin ningún equívoco de D01, y la reivindicación 8 no es nueva.

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1 REIVINDICACIONES DE LA 1 A LA 7 Y 9

Objeto de la presente solicitud, de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 7, es un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico diferencial entre el linfoma de Burkitt (LB) y el linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), que comprende el análisis de la cantidad de las formas truncadas de I2PP2A, siendo el incremento de las mismas, indicativo de la presencia del LB. Así mismo, la reivindicación 9 tiene por objeto el uso de un kit que comprenda un anticuerpo específico frente a las regiones amino terminal o central de I2PP2A, en dicho procedimiento.

En ninguno de los documentos citados, se ha encontrado ninguna relación entre la presencia de las formas truncadas de I2PP2A y el linfoma de Burkitt.

En consecuencia, las reivindicaciones de la 1 a la 7, referentes al método indicado, así como el uso del kit (reivindicación 9) presentan actividad inventiva.

2.2. REIVINDICACIÓN 8

El objeto de la reivindicación 8, es un kit que comprende un anticuerpo específico frente a las regiones amino terminal o central de I2PP2A.

En D02, se investiga la expresión de la proteína SET (I2PP2A). Con tal fin, se produjeron anticuerpos policlonales frente a las regiones o del residuo 3 al 16, o del aminoácido 44 al 56 de I2PP2A.

Se considera que un experto en la materia, intentaría el desarrollo de un kit con los anticuerpos obtenidos en D02, con una expectativa razonable de éxito.

En consecuencia, dados los presentes argumentos, y los motivos expuestos en el punto 1.2, la reivindicación 8 no tiene actividad inventiva.