



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 379 236**

② Número de solicitud: 201031438

⑤ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **28.09.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **24.04.2012**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
24.04.2012

⑦ Solicitante/s: **Hospital Sant Joan de Déu
P^e Sant Joan de Déu, 2
08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, ES**

⑦ Inventor/es: **Lavarino, Cinzia Emilia;
Ríos Guillermo, José Pedro y
Mora Graupera, Jaume**

⑦ Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

⑤ Título: **Método de predicción de pronóstico y/o respuesta farmacológica en neuroblastoma.**

⑤ Resumen:

Método de predicción de pronóstico y/o respuesta farmacológica en neuroblastoma.

La presente invención se refiere al empleo de los niveles de expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* como marcador de pronóstico y/o respuesta farmacológica en pacientes con neuroblastoma. Asimismo, se refiere al método de pronóstico y/o respuesta farmacológica de un paciente con NB basado en la cuantificación de la expresión de dichos genes, así como el kit para llevarlo a cabo.

ES 2 379 236 A1

DESCRIPCIÓN

Método de predicción de pronóstico y/o respuesta farmacológica en neuroblastoma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención tiene su campo de aplicación dentro del sector sanitario, principalmente en los sectores de la “Oncología Pediátrica” y “Biología Molecular”, en concreto de los “Marcadores de predicción de pronóstico y respuesta farmacológica en cáncer”.

10

Antecedentes de la invención

Los tumores neuroblásticos (TN) son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes de la infancia y, durante los primeros 4 años de vida, representan aproximadamente el 40% de todos los tumores sólidos (*Kaatsch P. Epidemiology of childhood cancer. Cancer Treatment Reviews 2010; 36(4): 277-285*). El neuroblastoma (NB) metastásico, la forma clínicamente más agresiva, es la causa del 15% de las muertes por cáncer en niños con edad inferior a 15 años (*Maris JM et al. Neuroblastoma. The Lancet 2007; 369: 2106-2120*). El NB representa un espectro muy heterogéneo de enfermedades donde tumores con características clinicopatológicas similares evolucionan de forma radicalmente distinta, mostrando en ocasiones una proliferación agresiva y resistente al tratamiento, y en otras, una regresión o maduración espontánea.

La variedad de comportamiento clínico del NB determina un enfoque terapéutico que puede variar entre una actitud expectante o un abordaje terapéutico multimodal intensivo que incluyen quimioterapia, cirugía, radioterapia e inmunoterapia (*Heller G and Cheung NK. Dose-intensity analysis and randomized trials. Journal of Clinical Oncology 1991, 9(9): 1715-1716; Kushner BH, Cheing NK, LaQuaglia MP, et al. Survival from locally invasive or widespread neuroblastoma without cytotoxic therapy. Journal of Clinical Oncology 1996, 14(2): 373-381; Kushner BH and Cohn S. Treatment of neuroblastoma. Neuroblastoma, In NK Cheung and S Cohn (ed.), Springer-Verlag, Berlin, 2005; pp 124-138; Matthay KK. Stage 4S neuroblastoma: what makes it special? Journal of Clinical Oncology 1998, 16(6): 2003-2006; Mora J, Gerald W, Qin J and Cheung NKV. Molecular genetics of neuroblastoma and the implications for clinical management. A review of the MSKCC experience. The Oncologist 2001, 6(3): 263-268*). Por consiguiente, una taxonomía precisa de los diferentes subtipos de NB contribuiría a evitar los efectos secundarios de la quimio- y radio-terapia en aquellos pacientes que puedan evolucionar favorablemente con una actitud expectante o un abordaje exclusivamente quirúrgico.

35

Histológicamente, se reconocen tres categorías de TN respecto a su grado de maduración: el NB indiferenciado (formado por neuroblastos inmaduros), el GNB (Ganglioneuroblastoma) (nivel intermedio de diferenciación) y el GN (Ganglioneuroma) (forma diferenciada) (*Mejía C, Navarro S, Pellín A et al. Prognostic significance of cell proliferation in human neuroblastoma: comparison with other prognostic factors. Oncology Reports 2003, 10(1): 243-247; Yamanaka Y, Hamazaki Y, Sato Y, et al. Mutational sequence of neuroblastoma revealed by molecular analysis on cDNA microarrays. International Journal of Oncology 2002, 21(4): 803-807*). Habitualmente, en estos casos, el tumor se encuentra en una única localización anatómica (tumores loco-regionales), aunque puede afectar a los ganglios linfáticos adyacentes.

La capacidad de maduración espontánea es una característica propia del comportamiento clínico favorable a algunos de los NB (*Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM et al. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. British Journal of Cancer 2009, 100(9): 1471-1482*). Así por ejemplo, en ausencia de marcadores biológicos desfavorables, los pacientes con enfermedad loco-regional exclusiva tienen pronóstico excelente, independientemente de si reciben o no tratamiento citotóxico (radioterapia o quimioterapia). Por ello, en estos pacientes el objetivo debe ser reducir al máximo el riesgo de efectos secundarios a corto y largo plazo, manteniendo altos índices de supervivencia (*Kushner BH, Cheing NK, LaQuaglia MP, et al. Survival from locally invasive or widespread neuroblastoma without cytotoxic therapy. Journal of Clinical Oncology 1996, 14(2): 373-381*).

Alrededor del 60% de los NB clínicamente detectables se presentan como tumores metastásicos (estadio 4) que inicialmente responden a la radio- y quimioterapia, pero que frecuentemente recidivan y se tornan resistentes al tratamiento. Es un subgrupo de NB claramente diferenciado de los anteriores y es poco común que los NB loco-regionales o los estadios 4S progresen hacia un estadio 4. Parece que existe una relación causal entre la agresividad tumoral y alteraciones genéticas específicas, como son la amplificación del gen NMYC; el tipo y tamaño de las deleciones en las regiones cromosómicas 1p36, 11q23, 14q32 o 19q13.3; la ganancia del cromosoma 17q; y el contenido cuasi-diploide/tetraploide de ADN. Esto sugiere que las distintas clases de TN presentan alteraciones genéticas específicas y que éstas probablemente contribuyen al comportamiento clínico diverso (*Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, et al. Amplification of NMYC in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stages. Science 1984, 224(4653): 1121-1124; Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, et al. Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma. Journal of Clinical Oncology 1991, 9(4): 581-591; Mora J, Cheung NKV and Gerald WL. Evolving significance of prognostic markers associated with new treatment strategies in neuroblastoma. Cancer Letters 2002, 197(1-2): 119-124; Sohara Y, Shimada H and DeClerck YA. Mechanisms of bone invasion and metastasis in human neuroblastoma. Cancer Letters 2005, 228(1-2): 203-209*).

65

Los NB estadio 4 son los que precisan todas las estrategias terapéuticas disponibles (cirugía, quimioterapia, radioterapia e inmunoterapia). Un 56% de ellos desarrollan metástasis óseas (Ross RA, Biedler JL and Spengler BA. *A role for distinct cell types in determining malignancy in human neuroblastoma cell lines and tumors. Cancer Letters* 2003, 197(1-2): 35-39) lo que supone un reto especialmente difícil para el tratamiento y determina un deterioro significativo de la calidad de vida de los pacientes.

Por el contrario, los NB estadio 4s (s por especial) constituyen un subgrupo de neuroblastoma con enfermedad diseminada que se presenta en los primeros meses de vida (<12 meses), con un patrón metastático característico pero con una alta probabilidad de regresión espontánea (D'Angio GJ, Evans AE and Koop CE. *Special pattern of widespread neuroblastomas with favorable prognosis. The Lancet* 1971, 1(7708): 1046-1049). Para los NB estadio 4s con características biológicas favorables, la cirugía debería ser la única arma terapéutica. La dificultad inherente a la diferenciación únicamente clínica del estadio 4s del estadio 4, (NB metastático clínicamente muy agresivo) junto con las complicaciones que pueden presentar durante el periodo inicial de crecimiento de las masas, hacen que más de un 50% de los casos reciban tratamiento citotóxico, aún a pesar de que pudiera ser innecesario (Matthay KK. *Stage 4S neuroblastoma: what makes it special? Journal of Clinical Oncology* 1998, 16(6): 2003-2006).

Actualmente se utilizan principalmente cuatro grandes sistemas (INPC, *International Neuroblastoma Pathology Classification*; INSS, *International Neuroblastoma Staging System*; COG, *Children's Oncology Group*; INRG, *International Neuroblastoma Risk Group*) de estratificación de riesgo, basados en combinaciones de parámetros clínico-patológicos y genéticos, como son la edad al diagnóstico, el estadio tumoral, el número de copias de NMYC, la clasificación histopatológica, la ploidía y el estado del cromosoma 1p, 17q y 11q (Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, et al. *International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. British Journal of Cancer* 2009, 100(9): 1471-1482). Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, et al. *Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment. Journal of Clinical Oncology* 1993, 11(8): 1466-1477; Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R and Cohn S. *Neuroblastoma. The Lancet* 2007, 369(9579): 2106-2120; Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, et al. *The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). Cancer* 1999, 86(2): 364-372). Sin embargo, la clasificación objetiva y precisa de tumores como el NB sigue representando un reto. Es evidente la necesidad de identificar marcadores de predicción de pronóstico y de respuesta a terapia más específicos y sensibles, que contribuyan a evitar los efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia en aquellos pacientes que puedan evolucionar favorablemente con un abordaje exclusivamente quirúrgico.

Por otra parte, en la actualidad, la evaluación de la respuesta al tratamiento en NB se realiza mediante la monitorización en orina de los niveles de catecolamina y de sus metabolitos (ácido vanilmandélico y ácido homovanílico), y a través de la medición de las lesiones tumorales, tanto del primario como de las metástasis, utilizando técnicas de imagen como son la tomografía computerizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN). La determinación por examen histológico del grado de diferenciación de la célula tumoral y la extensión de la necrosis tumoral también se utilizan para valorar la respuesta al tratamiento. Sin embargo, las limitaciones en cuanto a sensibilidad y especificidad de estos procedimientos, plantean en ocasiones problemas en la interpretación de los resultados. No obstante, tampoco existen marcadores biológicos para la determinación de la respuesta al tratamiento de los pacientes con NB. La existencia de biomarcadores para la evaluación de la respuesta al finalizar el tratamiento, y en particular, la primera etapa del tratamiento (terapia de inducción), permitiría efectuar cambios oportunos para establecer una terapia más apropiada en el caso de tumores resistentes.

En los últimos años, los análisis de expresión de alto rendimiento mediante microarrays han contribuido a refinar la clasificación de diversas neoplasias, identificar grupos de genes con importancia pronóstica y detectar grupos de pacientes con distinta capacidad de respuesta a la terapia (Bittner M, Meltzer P, Chen Y, et al. *Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. Nature* 2000, 406(6795): 536-540; Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. *Molecular classification of cancer: class Discovery and class prediction by gene expression monitoring. FEBS Letters* 1999, 235(1-2): 16-24; Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, et al. *Prediction of central nervous system embryonal tumor outcome based on gene expression. Nature* 2002, 415(6870): 436-442; Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. *The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. The New England Journal of Medicine* 2002, 346(25): 1937-1947). Por todo ello, parecen constituir una herramienta útil para investigar la existencia de perfiles de expresión que permitan distinguir al diagnóstico subgrupos de NB clínico y biológicamente relevantes.

Puesto que se considera que las diferencias en el pronóstico y la evolución clínica son un reflejo de las características genético-biológicas subyacentes del tumor que tienen su impacto en los perfiles de expresión génica, se han llevado a cabo varios estudios de microarrays con el fin de identificar perfiles de expresión útiles para predecir el pronóstico de los pacientes (Asgharzadeh S, Pique-Regi R, Sposto R, et al. *Prognostic significance of gene expression profiles of metastatic neuroblastomas lacking MYCN gene amplification. Journal of National Cancer Institute* 2006, 98(17): 1193-1203; Berwanger B, Hartmann O, Bergmann E, et al. *Loss of FYN-regulated differentiation and growth arrest pathway in advanced stage neuroblastoma. Cancer Cell* 2002, 2(5): 377-386; De Preter K, Vermuelen J, Bros B, et al. *Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature. Clinical Cancer Research* 2010, 16(5): 1532-1541; Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, et al. *Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. Pediatric Surgery International* 2004, 20(1): 33-38; Oberthuer A, Berthold F, Warnat P, et al. *Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. Journal of Clinical Oncology* 2006, 24(31): 5070-5078; Ohira M, Morohashi

A, Inuzuka H, et al. Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subset *Oncogene* 2003, 22(38): 5525-5536; Ohira M, Oba S, Nakamura Y, et al. Expression profiling using a tumor-specific cDNA microarray predicts the prognosis of intermediate risk neuroblastomas. *Clinical Cancer Research* 2005, 3(7): 1221-1228; Schramm A, Schulte JH, Klein-Hitpass L, et al. Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling. *Oncogene* 2005, 24(53): 7902-7912; Takita J, Ishii M, Tsutsumi S et al. Gene expression profiling and identification of novel prognostic marker genes in neuroblastoma. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2004, 40(2): 120-132; Wei JS, Greer BT, Westermann F, et al. Prediction of clinical outcome using gene expression profiling and artificial networks for patients with neuroblastoma. *Cancer Research* 2004, 64(19): 6883-6891; Yamanaka Y, Hamazaki Y, Sato Y, et al. Maturation sequence of neuroblastoma revealed by molecular analysis on cDNA microarrays. *International Journal of Oncology* 2002, 21(4): 803-807). Sin embargo, hasta la fecha las listas de genes que se han obtenido mediante microarrays en NB son demasiado largas para aplicar rutinariamente en laboratorio, tanto por el coste del proceso como por el trabajo y tiempo requeridos, ya que se trata de 305 genes (Ohira et al, 2005), 144 genes (Obert-huer et al. 2006) o 123 genes (Hiyama et al. 2004). Los estudios en los que se propone un menor número de genes para la clasificación de estos tumores, 59 genes (Vermeulen et al 2009), 42 genes (De Preter et al 2010), 39 genes (Schramm et al, 2005), 30 genes (Takita et al, 2004) siguen presentando un número elevado para el uso rutinario clínico.

Por tanto, la utilidad de los microarrays en la práctica clínica se ve limitada por el número elevado de genes que constituyen los perfiles de expresión, la necesidad de cantidades elevadas de tejido tumoral adecuado, la necesidad de métodos estadísticos y computacionales complejos, y la baja reproducibilidad de los datos obtenidos. Para traducir estos perfiles en pruebas aplicables en clínica, es imprescindible reducir el número de genes y generar perfiles que puedan ser analizados con una técnica convencional como es la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative real-time polymerase chain reaction*).

En respuesta a esta necesidad, los autores de la invención, tras un intenso trabajo de investigación, han conseguido reducir de forma radical estos perfiles de expresión a únicamente tres genes (*CHD5*, *PFAFH1B1* y *NME1*) con niveles de expresión génica asociados, de forma estadísticamente significativa, con las variables de valoración clínica supervivencia global (OS, del inglés overall survival) y supervivencia libre de evento (EFS, del inglés event free survival).

El gen humano *CHD5* (*Chromodomain helicase DNA-binding protein 5*) es un gen supresor de tumores localizado en la región cromosómica 1p36.31, región recurrentemente perdida en los NB de alto riesgo (Bagchi A and Mills AA. *The quest for the 1p36 tumor suppressor. Cancer Research* 2007, 68(8): 2551-2556; Fujita T, Igarashi J, Okawa ER, et al. *CHD5, a tumor suppressor gene deleted from 1p36.31 in neuroblastoma. Journal of the National Cancer Institute* 2008, 100(13): 940-949). La expresión génica de esta cromohelicasa dependiente de ATP, ha sido hallada recientemente en tejido nervioso normal y en NB de bajo riesgo pero ausente en líneas celulares y NB de alto riesgo (Okawa ER, Gotoh T, Manne J, et al. *Expression and sequence analysis of candidates for the 1p36.31 tumor suppressor gene deleted in neuroblastoma. Oncogene* 2008, 27(6): 803-810).

El segundo gen seleccionado, *PFAFH1B1* (*Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1B, alpha subunit*) (también denominado *LIS1*), localizado en el cromosoma 17p13.3, es un gen involucrado en la migración neuronal y desarrollo del córtex cerebral (Gambello MJ, Darling DL, Yingling J, et al. *Multiple dose-dependent effects of Lis1 on cerebral cortical development. The Journal of Neuroscience* 2003, 23(5): 1719-29). Se ha demostrado que este gen es necesario para que distintos procesos dependientes de dineína y/o microtúbulos tengan lugar. También se requiere durante el desarrollo cerebral para la proliferación de los precursores neuronales y para la migración de la neurona de nueva formación desde la zona ventricular/subventricular hacia la placa cortical (Coquelle FM, Caspi M, Cordeliers FP, et al. *LIS1, CLIP-170's key to the dynein/dynactin pathway. Molecular and Cell Biology* 2002, 22(9): 3089-3102; Lo Nigro C, Chong SS, Smith ACM, et al. *Point mutations and intragenic deletion in LIS1, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. Human Genetics* 1997, 6(2): 157-164; Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, et al. *Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. The Journal of Cell Biology* 2004, 165(5): 709-721). En NB, los autores de la invención han encontrado expresión de *PFAFH1B1* en tumores de bajo riesgo, mientras que los niveles de expresión se ven disminuidos en los tumores de alto riesgo.

El gen *NME1* (*Non-metastatic cells 1, expressed in*) (también denominado *NM23*, *NDPKA*) se localiza en la región cromosómica 17q21.3, región frecuentemente ganada en los NB clínicamente más agresivos (Bown N, Cotterill S, Lastowska M, et al. *Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. The New England Journal of Medicine* 1999, 340(25): 1954-1961; Brinkschmidt C, Christiansen H, Terpe HJ, et al. *Distal chromosome 17 gains in neuroblastoma detected by comparative genomic hybridization (CGH) are associated with a poor clinical outcome. Medical and Pediatric Oncology* 2001, 36(1): 11-13). Participa en procesos de proliferación celular, diferenciación y desarrollo, y además es necesario para el desarrollo neuronal, incluyendo la determinación del patrón neural y del destino celular (Chen Y, Gallois-Montbrun S, Schneider B, et al. *Nucleotide binding to nucleoside diphosphate kinases: X-ray structure of human NDPK-A in complex with ADP and comparison to protein kinases. Journal of Molecular Biology* 2003, 332(4): 915-926; Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, et al. *Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. Cell* 2003, 112(5): 659-672; Hailat N, Keim DR, Melhem RF, et al. *High levels of p19/nm23 protein in neuroblastoma are associated with advanced stage disease and with N-myc gene amplification. The Journal of Clinical Investigation* 1991, 88(1): 341-345).

El gen *NME1* es el único gen de los seleccionados con niveles de expresión elevados asociados a NB de pronóstico desfavorable. Contrariamente a lo que ocurre en otros tumores, una expresión elevada de *NME1* ha sido asociada a pronóstico desfavorable en NB (Almgren MA, Henriksson KC, Fujimoto J, et al. *Nucleoside diphosphate kinase A/nm23-H1 promotes metastasis of NB69-derived human neuroblastoma. Molecular Cancer Research* 2004, 2(7): 387-394; Valentijn LI, Koppen A, van Asperen R, et al. *Inhibition of a new differentiation pathway in neuroblastoma by copy number defects of N-Myc, cdc42 and nm23 genes. Cancer Research* 2005, 65(8): 3136-3145).

A partir de estos genes los autores de la invención han desarrollado un modelo de predicción de pronóstico basado en la cuantificación de los niveles de expresión mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative real-time polymerase chain reaction*), en mRNA extraído de biopsias de tejido tumoral, y la posterior obtención, mediante una fórmula matemática, de una variable (sintética) que permite una medición global del perfil de expresión de los 3 genes en cada tumor.

El valor de este modelo de predicción viene dado tanto por el número extremadamente reducido de genes que lo componen, como por la viabilidad a nivel técnico (qRT-PCR convencional), la aplicabilidad a biopsias de tejido tumoral pequeñas, la rapidez, fácil interpretación y reproducibilidad de los resultados, y por el bajo coste económico.

Asimismo, han demostrado que la cuantificación del patrón de expresión de la combinación de los genes *CHD5*, *PFAH1B1* y *NME1* representa un marcador útil para la evaluación de la respuesta farmacológica en pacientes con NB clínicamente agresivos, tratados con quimioterapia.

Actualmente, no existen marcadores biológicos para la determinación de la respuesta al tratamiento de los pacientes con NB, por lo que la existencia de biomarcadores para la evaluación de la respuesta farmacológica permitiría efectuar cambios oportunos para establecer una terapia más apropiada en el caso de tumores resistentes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. *Gráfico de sedimentación*. Representación gráfica de los valores propios (Eigenvalue) de los posibles componentes obtenidos por PCA para los 6 genes preseleccionados (*NME1*, *RERE*, *PTPRF*, *GNB1*, *PFAH1B1* y *CHD5*).

Figura 2. *Gráfico de sedimentación*. Representación gráfica de los valores propios (Eigenvalue) de los posibles componentes obtenidos por PCA para los 3 genes finalmente seleccionados (*NME1*, *PFAH1B1* y *CHD5*).

Figura 3. Representación gráfica del análisis de supervivencia mediante curvas Kaplan Meier para validación del modelo de pronóstico utilizando un grupo independiente de 60 casos de NB, para la variable clínica OS. LR= “bajo riesgo” (del inglés “low risk”), HR= “alto riesgo” (del inglés “high risk”).

Figura 4. Representación gráfica del análisis de supervivencia mediante curvas Kaplan Meier para validación del modelo de pronóstico utilizando un grupo independiente de 60 casos de NB, para la variable clínica EFS. LR= “bajo riesgo”, HR= “alto riesgo”

Figura 5. Validación del modelo de pronóstico en una cohorte independiente de 98 casos generados por análisis de microarray. Representación gráfica del análisis de supervivencia mediante curvas Kaplan Meier para la variable clínica OS. (LR)= “bajo riesgo”, (HR)= “alto riesgo”.

Figura 6. Validación del modelo de pronóstico en una cohorte independiente de 98 casos generados por análisis de microarray. Representación gráfica del análisis de supervivencia mediante curvas Kaplan Meier para la variable clínica EFS. (LR)= “bajo riesgo”, (HR)= “alto riesgo”.

Figura 7: 254 genes diferencialmente expresado entre subgrupos de NB con distinto contenido de DNA.

Objeto de la invención

Es objeto de la invención el empleo de los niveles de expresión de los genes *CHD5*, *PFAH1B1* y *NME1* de forma combinada como marcador de pronóstico y/o respuesta farmacológica en pacientes con neuroblastoma (NB).

Es asimismo objeto de la invención, un método de predicción de pronóstico y/o respuesta farmacológica de un paciente con NB basado en la cuantificación de la expresión de los genes *CHD5*, *PFAH1B1* y *NME1* de forma combinada en una muestra biológica aislada del paciente.

Finalmente, es también objeto de la invención un kit para llevar a cabo el método de la invención.

Descripción detallada de la invención

La presente invención tiene como principal objetivo identificar un marcador de predicción de pronóstico en neuroblastoma (NB) más específico y sensible que los sistemas de clasificación existentes, que contribuya a evitar los efectos secundarios de la quimioterapia y radioterapia en aquellos pacientes que puedan evolucionar favorablemente con un abordaje exclusivamente quirúrgico.

Como solución a este problema, los autores de la invención han identificado los niveles de expresión de 3 genes: *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1*, en combinación, como marcador de predicción de pronóstico eficaz en pacientes con NB. Asimismo, han demostrado que dicho marcador mejora, en sensibilidad y especificidad, a los sistemas de pronóstico actuales de esta enfermedad.

El empleo de este marcador es útil asimismo en la evaluación de la respuesta farmacológica al finalizar el tratamiento de un paciente con NB, de forma especialmente relevante al finalizar la primera etapa del tratamiento (terapia de inducción) de un paciente con NB, lo que permite efectuar cambios oportunos para establecer una terapia más apropiada en el caso de tumores resistentes.

El protocolo de quimioterapia en NB incluye 5 ciclos de tratamiento. Al final del tercer ciclo, es decir, al final de la primera etapa, llamada terapia de inducción, se realiza una biopsia control (*second-look*) para evaluar la respuesta del tumor al tratamiento. La existencia de biomarcadores para la evaluación de la respuesta en este punto, antes de finalizar los 5 ciclos, permitirá efectuar cambios oportunos para establecer una terapia más apropiada en el caso de tumores resistentes.

Así, en un aspecto principal de la invención se contempla el empleo conjunto de los niveles de expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* como marcador de pronóstico y/o respuesta farmacológica en pacientes con neuroblastoma.

Los autores de la invención han identificado una estrecha asociación del patrón de expresión de *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* con la supervivencia de pacientes con NB. Existe una asociación entre niveles de expresión muy bajos de *CHD5* y *PAFAH1B1* y altos de *NME1* y NB con comportamiento clínico agresivo, y por tanto con pacientes con mayor posibilidad de presentar o bien un evento (recaída de enfermedad) o bien muerte por enfermedad (pronóstico desfavorable). Al contrario, niveles de expresión altos de *CHD5* y *PAFAH1B1* y bajos de *NME1* se asocian a mejor pronóstico (pronóstico favorable) del paciente con NB.

En base a este hallazgo, los autores de la presente invención han desarrollado un método de predicción de pronóstico de un paciente con NB que comprende cuantificar la expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1*, de forma combinada, en una muestra biológica aislada del paciente. Los datos de expresión obtenidos se introducen en la siguiente fórmula matemática:

$$Y = (\alpha_1 NME1) + (\alpha_2 CHD5) + (\alpha_3 PAFAH1B1)$$

siendo α_n un coeficiente que representa la contribución de cada gen a la definición de la variable Y.

Aquellos pacientes con valores de la variable (Y) >0 se clasifican como NB de pronóstico favorable, y aquellos pacientes con valores (Y) <0 se clasifican como NB de pronóstico desfavorable.

El modelo pronóstico permite cuantificar niveles de expresión diferencial entre subgrupos de tumores con comportamiento clínico distintos (genes de pronóstico), lo que permite clasificar los tumores según su agresividad y personalizar el tratamiento de cada paciente.

Para la realización del método de pronóstico de la invención se parte de una muestra biológica aislada de un paciente y se procede con la extracción de mRNA, mediante protocolos convencionales, y la posterior cuantificación de los niveles de expresión de cada uno de los genes de interés. Los datos obtenidos se introducen en la fórmula matemática desarrollada por los autores de la invención, para obtener la variable sintética (Y) que permite una medición global del perfil de expresión de los 3 genes en cada tumor, para así establecer el pronóstico del paciente.

En una realización preferida del método de pronóstico de la invención, la muestra biológica empleada es tejido tumoral. En este caso, el método de pronóstico de neuroblastoma comprende obtener una muestra de tejido tumoral para la cuantificación del patrón de expresión de la combinación de los 3 genes.

La muestra tumoral del paciente representa una porción de la pieza de tumor obtenida mediante cirugía o a una biopsia del tejido tumoral. De forma preferida, la muestra tumoral utilizada para la realización del método tiene un contenido de célula tumoral viable superior al 60%, determinado por un anatómo-patólogo.

A los fines de la invención, la cuantificación de la expresión génica de los 3 genes se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas de Biología Molecular, como por ejemplo *microarrays* de expresión, PCR cuantitativa en tiempo real y Northern blot.

5 Concretamente, el empleo de *arrays* de expresión permite obtener resultados de expresión de un número elevado de genes en cada experimento. Sin embargo, el empleo de los *microarrays* en la práctica clínica se ve limitada por el número elevado de genes que constituyen los perfiles de expresión, la necesidad de cantidades elevadas de tejido tumoral adecuado y de mRNA de buena calidad (no degradado), la necesidad de métodos estadísticos y computacionales complejos, y la baja reproducibilidad de los datos obtenidos. Para traducir estos perfiles en pruebas aplicables
10 en clínica, es imprescindible reducir el número de genes y generar perfiles que puedan ser analizados con una técnica convencional como es la qRT-PCR.

También, es posible cuantificar la expresión utilizando la técnica de Northern Blot. Ésta es una técnica que ha sido
15 sustituida por la qRT-PCR porque es muy laboriosa (días de trabajo, mientras que la qRT-PCR es máximo 2-3 horas), poco reproducible (se utiliza RNA que se degrada con mucha facilidad, la qRT-PCR utiliza DNA complementario que es muy estable), necesita cantidades de RNA mucho más elevadas y de mejor calidad que la qRT-PCR y además para aumentar la sensibilidad del Northern blot hay que utilizar isotopos radioactivos (sólo se pueden utilizar en laboratorios con infraestructuras adecuadas), las sondas para qRT-PCR están marcadas con un fluorocromo que permiten
20 ser utilizadas sin ningún problema en cualquier laboratorio. La qRT-PCR, además, es el método más sensible para la detección y cuantificación de la expresión génica.

El valor de la qRT-PCR viene dado por la viabilidad a nivel técnico, la aplicabilidad a biopsias de tejido tumoral pequeñas, la rapidez, la fácil interpretación y reproducibilidad de los resultados, y por el bajo coste económico.

25 Así, en una realización preferida del método de pronóstico de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión de la combinación de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* se lleva a cabo mediante la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).

La PCR cuantitativa en tiempo real o cuantitativa (qRT-PCR) es una técnica que permite la cuantificación de
30 copias de DNA complementario (cDNA) con un alto rendimiento y precisión. La ventaja que ofrece la qRT-PCR es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación del fragmento de cDNA de interés. Para llevar a cabo esta detección, uno de los métodos más utilizados se basa en el uso de una sonda complementaria al fragmento de cDNA de interés. Esta sonda (20-30 bases de longitud) lleva adherida una molécula fluorescente en la base 5' y una molécula que apantalla la emisión de fluorescencia (quencher dye) en la base 3' de la sonda. De esta forma durante la reacción de amplificación la acción 5'-exonucleasa de la DNA polimerasa corta la sonda liberando la molécula fluorescente que
35 emite fluorescencia al ser excitada con un láser o por la luz de una lámpara halógena. A cada ciclo de amplificación la fluorescencia emitida aumenta proporcionalmente a la cantidad de sonda cortada. Esta técnica determina el punto en el tiempo durante la reacción de PCR en el que la amplificación del producto se detecta significativamente por primera vez, lo que se define como ciclo umbral o threshold cycle (CT). De manera que cuanto más elevado es el
40 número de copias del cDNA de interés en el producto inicial, antes se puede detectar un incremento significativo en la fluorescencia. (Ct=Ciclo umbral, ciclo en el cual se detecta un nivel de fluorescencia superior al ruido de fondo cuando la amplificación de la PCR está todavía en la fase exponencial).

45 La cuantificación de los niveles de expresión mediante qRT-PCR puede aplicarse a muestras de tejido en fresco o muestras congeladas y almacenadas a -80°C hasta su uso. Asimismo, puede aplicarse a muestras tisulares fijadas en formol e incluidas en parafina, por lo que pueden evaluarse muestras obtenidas en un laboratorio de anatomía-patológica estándar.

50 En realizaciones particulares de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión por qRT-PCR se puede llevar a cabo mediante el método comparativo de C_T ($\Delta\Delta C_T$) para la obtención de una cuantificación relativa de la expresión génica. El primer paso es el cálculo de la diferencia (ΔC_T) entre el valor de C_T del gen problema y el valor de C_T de un gen de referencia (*housekeeping gene*).

$$55 \quad \Delta C_T = C_T \text{ gen de interés} - C_T \text{ gen de referencia}$$

60 Posteriormente, se calcula la diferencia entre los ΔC_T de las muestras problema y la muestra calibradora obteniendo de esta forma el valor $\Delta\Delta C_T$, valor de expresión relativa. El último paso es la transformación de los valores $\Delta\Delta C_T$ en valores absolutos. Los niveles de expresión comparativos se calculan según la siguiente fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

65 Los datos de expresión génica obtenidos por qRT-PCR son tipificados (normalizados) a una distribución normal Z (Normal con media 0 y desviación estándar 1). Esta normalización tiene como objetivo la utilización de puntuaciones de desviaciones estándar, favoreciendo así la comparación de los datos de expresión obtenidos de los diferentes genes, medidos en unidades arbitrarias y con variabilidades intra-gen heterogéneas sin que esto presente relevancia biológico-clínica y, por tanto, no afecte a los resultados que se puedan obtener. La tipificación de los datos de expresión se realiza aplicando la siguiente fórmula:

ES 2 379 236 A1

$$z = \frac{\bar{X} - \mu}{\sigma}$$

5

\bar{X} = nivel de expresión, para un gen concreto

10

μ = media de los valores de expresión, para un gen concreto

σ = desviación estándar de los valores de expresión, para un gen concreto

15

Como se ha comentado anteriormente, la predicción del pronóstico se determina en función de una única variable (Y), siendo (Y) una variable compuesta por la combinación lineal de los niveles de expresión de los tres genes. Para la obtención de variable (Y) se introducen los datos de expresión z-transformados en la fórmula matemática desarrollada por los autores de la invención:

20

$$Y = (\alpha_1 \text{NME1}) + (\alpha_2 \text{CHD5}) + (\alpha_3 \text{PAFAH1B1})$$

25

Los NB con valores de la variable (Y) >0 se asocian a mayores tiempos de supervivencia y menor número de eventos (recaída) en comparación con los NB clasificados con valores (Y) <0.

30

La fórmula matemática ha sido desarrollada por los autores de la invención mediante el método estadístico multivariante no supervisado denominado Análisis de Componentes Principales (PCA del inglés *Principal Component Analysis*) sobre los niveles de expresión z-transformados. Tras los cálculos propios del método estadístico, que finalizan con la estimación de los α_n de la fórmula, es posible realizar la estimación de Y para cada uno de los pacientes.

35

El Análisis de Componentes Principales es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante una base de datos con muchas variables (listas de genes diferencialmente expresados), el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

40

Un aspecto clave en PCA es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada *a priori*, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (hay, pues, que estudiar tanto el signo como la magnitud de las correlaciones).

45

Un análisis de componentes principales tiene sentido si existen altas correlaciones entre las variables, ya que esto es indicativo de que existe información redundante y, por tanto, pocos factores explicarán gran parte de la variabilidad total.

La elección de los factores se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. Del total de factores se elegirán aquéllos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente. A éstos se les denominará componentes principales.

50

Una vez seleccionados los componentes principales (factores), se representan en forma de matriz. Cada elemento de ésta representa los coeficientes factoriales de las variables (las correlaciones entre las variables y los componentes principales). La matriz tendrá tantas columnas como componentes principales y tantas filas como variables.

Para que un factor sea fácilmente interpretable debe tener las siguientes características:

55

- Los coeficientes factoriales deben ser próximos a 1.
- Una variable debe tener coeficientes elevados sólo con un factor.
- No deben existir factores con coeficientes similares.

60

Son las puntuaciones que tienen los componentes principales para cada caso, lo que permite su representación gráfica.

65

Se calculan mediante la ecuación:

$$Y_{ij} = \alpha_{i1} \cdot Z_{ij} + \dots + \alpha_{ik} \cdot Z_{kj} = \Sigma = \alpha_{is} \cdot Z_{sk}$$

ES 2 379 236 A1

Los α son los coeficientes que calcula el método PCA y los Z son los valores de expresión estandarizados que tienen los genes en cada uno de los sujetos, en el caso de la presente invención, sería en cada uno de los pacientes.

Para la determinación de los coeficientes α el método PCA interpreta la variabilidad de expresión génica de las muestras. Al tratarse de un método estadístico no-supervisado el PCA no tiene en cuenta las variables clínicas.

El desarrollo de una fórmula matemática de predicción de pronóstico supone la ventaja de obtener un único valor objetivo (positivo o negativo) que prediga la evolución del paciente.

La variable (Y) es una variable independiente de predicción de riesgo que se mantiene estable y eficaz aún en presencia de las demás variables clínico-biológicas (edad, estadio INSS, estado de amplificación *NMYC* y estado del cromosoma 1p). Así, este método es útil en la identificación de aquellos pacientes que no requieren tratamiento citotóxico y aquellos que necesitan una terapia multimodal intensa.

Otro aspecto principal de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el método de pronóstico descrito que comprende un set de sondas adecuado para la cuantificación del patrón de expresión de la combinación de los genes *CHD5*, *PFAFH1B1* y *NME1*. Además dicho kit reúne todos los reactivos necesarios para la detección y cuantificación de la expresión los genes descritos.

En realizaciones particulares del método de pronóstico de la invención, las sondas de hibridación empleadas para la cuantificación de los niveles de expresión de los 3 genes que conforman el modelo de predicción de pronóstico, son sondas marcadas con un fluorocromo, específicas para los genes de interés (genes problema y genes de referencia) (Tabla 1).

TABLA 1

Genes problema y genes de referencia

Símbolo gen	Gen
<i>CHD5</i>	Chromodomain helicase DNA-binding protein
<i>PFAFH1B1</i>	Platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1B, alpha subunit
<i>NME1</i>	Non-metastatic cell 1
Gen de referencia	
<i>TBP</i>	TATA DNA binding protein
<i>HPRT1</i>	Hypoxantine phosphoribosyltransferase
<i>SDHA</i>	Succinate dehydrogenase complex subunit A

Así, en una realización preferida, el kit incluye: sondas fluorescentes de tipo específicas para *CHD5*, *PFAFH1B1* y *NME1*, sondas fluorescentes para los genes de referencia *TBP*, *HPRT1* y *SDHA*, y una MasterMix que contiene una Taq polimerasa termoestable, tampón y $MgCl_2$ a concentraciones óptimas, además de los dNTPs, optimizados para la reacción de qRT-PCR. El mismo kit también incluye las herramientas (un programa informático), para permitir, mediante la cuantificación de los niveles de expresión, la normalización de los datos mediante el método de la z-transformación, utilizando los valores de los parámetros adecuados, y su introducción en la ecuación del modelo de predicción para determinar, finalmente, el valor de la variable (Y).

En otro aspecto principal de la invención, y dada la utilidad del marcador de la invención en la evaluación de la respuesta al tratamiento de un paciente con NB, se contempla un método para evaluar la respuesta a un tratamiento farmacológico de un paciente con NB que comprende cuantificar los niveles de expresión de *CHD5*, *PFAFH1B1* y *NME1* en una muestra biológica aislada del paciente antes y después del tratamiento.

El aumento en los niveles de expresión de *CHD5* y *PFAFH1B1* y la disminución de los niveles de expresión de *NME1*, valorados mediante la ecuación descrita anteriormente, en las muestras del paciente obtenidas tras el tratamiento, en comparación con los niveles de expresión observados en las muestras analizadas antes del tratamiento, es indicativo de buena respuesta al tratamiento. Estos cambios son interpretables globalmente por medio del estudio de la variable (Y) resultante de los cálculos.

Por el contrario, si los niveles de expresión de *CHD5* y *PFAFH1B1* y *NME1* no varían y permanecen similares a los niveles de expresión observados en las muestras analizadas antes del tratamiento, es indicativo de una mala respuesta al tratamiento (resistencia al tratamiento). Estos cambios son interpretables globalmente por medio del estudio de la variable (Y) resultante de los cálculos.

ES 2 379 236 A1

Aquellos pacientes incluidos en la evaluación farmacológica presentan $Y < 0$ (mal pronóstico) al diagnóstico; si tras el análisis de la biopsia control se produce un cambio a $Y > 0$ se entenderá que ha habido respuesta farmacológica positiva. En el caso que la evaluación permanezca con valores de $Y < 0$ indicaría que el paciente ha sido refractario al tratamiento.

5

En realizaciones preferidas del método de evaluación de la respuesta farmacológica, la muestra biológica aislada empleada es tejido tumoral. De forma particular, el contenido de célula tumoral viable en la muestra de tejido tumoral es de al menos el 60%.

10 En realizaciones preferidas de este método, la cuantificación de los niveles de expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1*, en las muestras del paciente antes y después de ser sometido al tratamiento, se lleva a cabo mediante la técnica qRT-PCR.

15 Finalmente, en otra realización principal de la invención se contempla un kit para llevar a cabo el método de evaluación de respuesta farmacológica descrito, que comprende un set de sondas adecuado para la cuantificación del patrón de expresión de la combinación de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1*.

20 En una realización preferida, dicho set de sondas comprende sondas marcadas con un fluorocromo, específicas para los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1*, sondas fluorescentes específicas para los genes de referencia *TBP*, *HPRT1* y *SDHA* y una MasterMix que contiene a concentraciones óptimas para la reacción de qRT-PCR, una Taq polimerasa termoestable, tampón y $MgCl_2$, además de los dNTPs, optimizados para la cuantificación del patrón de expresión. Dicho kit también incluye las herramientas para permitir la cuantificación de los niveles de expresión, la normalización de los datos mediante el método de la z-transformación, utilizando los valores de los parámetros adecuados, y su introducción en la ecuación del modelo de predicción para determinar, finalmente, el valor de la variable (Y).

25

Ejemplos

30 Ejemplo 1

Identificación de perfiles de expresión génica capaces de discriminar subgrupos de NB con comportamiento clínico distinto

35 El estudio partió de la hipótesis de que existen diferencias de expresión génica entre subgrupos de neuroblastoma (NB) con claras diferencias de comportamiento clínico o biológicamente distintos y que estos perfiles de expresión son susceptibles de poder representar un marcador molecular de pronóstico en pacientes con NB.

40 *Perfiles de expresión génica*

45 En un primer lugar se realizó un análisis de expresión mediante microarrays de un total de 106 TN (10 gangliogliomas, 10 estadio 4s, 29 loco-regionales, y 57 estadio 4), 12 líneas celulares de NB y 9 tejidos no tumorales. Las muestras fueron revisadas por un anatómo-patólogo para determinar el contenido celular tumoral (>70% de la totalidad de las células). Se realizó una cuidadosa selección macroscópica de las áreas de cada fragmento tumoral a analizar, con el fin de minimizar la heterogeneidad del tejido. Todos los tumores fueron estadiados conforme al INSS (International Neuroblastoma Staging System).

50 Las muestras se almacenaron según el siguiente protocolo: se introdujeron los fragmentos tisulares en crioviales (Corning, EEUU), se congelaron en isopentano enfriado en nitrógeno líquido con el objetivo de preservar la morfología celular, y a continuación se almacenaron a $-80^{\circ}C$ hasta su uso. El transporte hasta el congelador se hizo en nitrógeno líquido.

55 El ARN fue extraído a partir de tejido congelado, por homogeneización en tampón de isotiocianato de guanidinium (Qiagen RNAeasy, QIAGEN, Alemania). La integridad del ARN se evaluó mediante gel de agarosa desnaturante. El ARN total se marcó por amplificación lineal con nucleótidos biotinizados y se detectó por avidina marcada con fluorescencia. Se evaluó el mapeo del ARN mediante hibridación con test II arrays (Affymetrix, EEUU).

60 Para el análisis de expresión, se utilizaron los microarrays de oligonucleótidos de Affymetrix GeneChip Human Genome U95 SetTM Arrays (con >60.000 genes y ESTs), en la presentación de 5 chips.

65 Los datos de expresión génica generados a partir del análisis de microarray y anotaciones clínicas de los pacientes analizados se depositaron en la base de datos caArray <http://caarraydb.nci.nih.gov/caarray/>.

Análisis de expresión génica diferencial

Los datos de expresión generados mediante microarray fueron analizados por el laboratorio de Biología de los Tumores del Desarrollo del HSJD conjuntamente con la Unidad de Soporte Estadístico y Metodológico perteneciente a la UASP, (Hospital Clínic de Barcelona), con el fin de perfilar los patrones de expresión génica de distintos subgrupos de NB. Se procedió mediante un análisis comparativo diferencial tanto entre subgrupos de NB clínicamente relevantes como entre subgrupos de NB biológicamente relevantes.

La identificación de genes con variaciones de expresión estadísticamente significativa entre distintos subgrupos de NB, se realizó mediante técnicas estadísticas que ajustan el ajuste por múltiples análisis del error tipo I (como el Step Down Permutation (SDP) (Westfall PS and Young SS. *Resampling-based Multiple Testing: Examples and Methods for p-value adjustment*. John Wiley & Sons Inc, New York, 1993) o el control del llamado False Discovery Rate (FDR) (Benjamini Y and Hochberg Y. *Controlling the False Discovery Rate: a Practical and powerful approach to Multiple Testing*. *Journal of the Royal Statistical Society B* 1995, 57: 289-300) así como análisis crudos, y sin ajuste del error de tipo I (como el método RAW). La selección de genes significativos se realizó fijando los mismos niveles α bilaterales (error de tipo I) para todos los métodos: <0,1; <0,05 y <0,01. Los genes seleccionados se sometieron a análisis de clusters jerárquico, realizado con datos normalizados y utilizando la aproximación de Ward y el cuadrado de la distancia euclidiana. Se utilizó la prueba exacta de Fisher para evaluar la proporción con que los cromosomas están representados en los conjuntos de genes seleccionados, en comparación con la representación del cromosoma el microarray (Affymetrix Human GeneChip U95Av2). Estos análisis estadísticos se efectuaron usando SAS 9.1 y JMP 5.1 (SAS Institute Inc) para Windows y CIA 2.1.1.

El análisis de expresión diferencial permitió identificar perfiles transcripcionales de grupos de genes (Figura 7) con capacidad de discriminar entre subgrupos con claras diferencias de comportamiento clínico y biológicamente distintos, como son los tumores cuasi-triploides (pronóstico favorable) y los tumores cuasi-diploides/tetraploides (pronóstico desfavorable). Una porción significativa de genes se localizan en cromosomas alterados de manera recurrente en NB, cromosomas 1 ($p=0.01$) y 17 ($p<0.0001$).

PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Con el fin de validar los niveles de expresión diferencial hallados mediante análisis con microarray, se analizaron, mediante qRT-PCR, 11 genes diferencialmente expresados localizados en los cromosomas 1 y 17 (*PAFAH1B1*, *RUTBC1*, *VAMPL*, *POLR2A*, *FLOT2*, *NME1*, *GNB*, *RERE*, *CHD5*, *ARHGEF11*, *PTPRF*). Se utilizaron dos grupos aislados de muestras de NB: 21 NB primarios (9 NB cuasi-triploides y 12 NB cuasi-diploides/tetraploides) derivados de la cohorte de tumores incluidos en el microarray y en una segunda de 25 NB primarios (14 NB cuasi-triploides y 11 NB cuasi-diploides/tetraploides) derivados de una cohorte independiente. Se extrajo el RNA de la muestras utilizando TRI Reagent (Sigma, EEUU) siguiendo las instrucciones del proveedor. La cuantificación del RNA se realizó por la lectura de la absorbancia a 260 nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro (UV-1603, Shimadzu; Nanodrop N-1000, Thermo Scientific, EEUU). La pureza del RNA se evaluó mediante la absorbancia 260 nm y el cociente de absorbancia a 260/280 nm, considerándose los valores óptimos entre 1,6-1,9 unidades de densidad óptica (D.O.). La integridad del RNA total se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

La síntesis de DNA complementario de cadena simple (cDNA) a partir de RNA mensajero (mRNA), se realizó utilizando 1 μ g de RNA total y la reacción de retrotranscripción se realizó utilizando la enzima retrotranscriptasa M-MLV (Moloney murine leukemia virus, Promega, EEUU) 10 U/ μ l, el inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin (RNase Recombinant Ribonuclease inhibitor, Promega, EEUU) 2 U/ μ l, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs, Promega, EEUU) 0,5 μ M y hexámeros de secuencias aleatorias (Random Hexamers, Promega, EEUU) 2,5 μ M, en un volumen final de 20 μ l.

El método comparativo del $\Delta\Delta$ CT (ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2: Relative Quantification of gene Expression P/N 4303859) se utilizó para la obtención de una cuantificación relativa de la expresión de cada gen en relación a un promedio de la expresión de las 3 muestras control.

Para la cuantificación de la expresión génica de los tumores neuroblásticos se utilizó como muestra calibradora el cDNA de muestras de tejido no neoplásico obtenido y tratado de la misma forma que las muestras de NB. En concreto se utilizó cerebro fetal normal o la media geométrica de los valores de expresión generados por el cDNA de muestras tisulares normales de glándula suprarrenal, ganglio linfático y médula ósea.

El primer paso fue el cálculo de la diferencia (Δ Ct) entre el valor de CT del gen problema y el valor de CT de un gen de referencia (housekeeping gene).

$$\Delta Ct = CT \text{ gen de interés} - CT \text{ gen de referencia}$$

Posteriormente, se calculó la diferencia entre los Δ CT de las muestras problema y la muestra calibradora obteniendo de esta forma el valor $\Delta\Delta$ CT, valor de expresión relativa. Finalmente se llevó a cabo la transformación de los valores $\Delta\Delta$ CT en valores absolutos. Los niveles de expresión comparativos se calcularon según la siguiente fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

ES 2 379 236 A1

Como genes control de referencia se utilizaron el gen TBP (TATA box binding proteína), el gen HPRT1 (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) y el gen SDHA (Succinate dehydrogenase complex, subunit A). La selección de los genes de referencia se basó en datos publicados recientemente, en los que se identifican los genes idóneos para la normalización en experimentos de qRT-PCR en neuroblastoma (Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology* 2002, 3(7): 0034.1-0034.11).

Los niveles de expresión génica obtenidos por qRT-PCR fueron comparados con la prueba de la U de Mann-Whitney. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS 15.0, para Windows (Chicago II, EEUU). En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de $P < 0,05$.

Los resultados de expresión génica obtenidos por qRT-PCR en ambos grupos de NB primarios utilizados para la validación, confirmaron los patrones de expresión diferencial hallados con el análisis con microarray. Estos resultados confirmaron la existencia de patrones de expresión diferencial entre los subgrupos de NB con comportamiento clínico radicalmente distinto, y consiguientemente con distinto pronóstico. Además demostraron una buena replicabilidad entre las dos técnicas, microarray y qRT-PCR.

Conclusión ejemplo 1

Existen perfiles transcripcionales específicos capaces de discriminar nítidamente entre subgrupos de NB con distinto pronóstico. Estos patrones de expresión génica asociados con la supervivencia, son susceptibles de poder representar un marcador molecular de predicción de pronóstico que contribuya a una taxonomía más precisa de los diferentes subtipos de NB.

Ejemplo 2

Elaboración de un modelo estadístico de predicción de pronóstico en neuroblastoma

A partir de este punto el objetivo final del estudio fue desarrollar un modelo estadístico de predicción de pronóstico en NB construido a partir de grupos de genes diferencialmente expresados, que cumpliera con los siguientes requisitos:

- 1) capacidad de discriminar de forma fiable NB de pronóstico favorable y de pronóstico desfavorable,
- 2) que fuera técnicamente viable para la aplicación clínica, por tanto que estuviera constituido por un número de genes reducido y que los niveles de expresión fueran cuantificables mediante una técnica sencilla y rápida como la qRT-PCR.

qRT-PCR

Selección de muestras para el análisis

Se analizaron un total de 96 NB primarios para el desarrollo de la fórmula: 36 casos como entrenamiento del método estadístico con el fin de comprobar la idoneidad del proceso numérico y construir la primera versión de la fórmula y 60 casos para la validación del modelo de predicción de pronóstico para pacientes afectados de NB. Los criterios de selección de las muestras fueron:

- i) Muestras obtenidas al diagnóstico, que no hubieran recibido tratamiento citotóxico;
- ii) Muestras diagnosticadas como NB, en cualquiera de sus estadios de diferenciación;
- iii) Muestras con un contenido de célula tumoral $>70\%$, evaluado por un anatómo-patólogo;
- iv) Muestras diagnosticadas como NB, en cualquiera de sus estadios de diferenciación;
- v) Muestras con un contenido de célula tumoral $>70\%$, evaluado por un anatómo-patólogo.

Determinación de genes candidatos para el modelo predictivo

Se utilizó un grupo inicial compuesto por 36 NB primarios para determinar los genes candidatos y sucesivamente para la elaboración de un modelo de predicción de pronóstico en NB.

La determinación de los genes candidatos para el modelo predictivo se realizó utilizando el grupo de 11 genes (PAFAH1B1, RUTBC1, VAMP2, POLR2A, FLOT2, NME1, GNB1, RERE, CHD5, ARHGEF11, PTPRF) hallados diferencialmente expresados mediante microarray y confirmados por qRT-PCR. Los niveles de expresión de estos genes fueron cuantificados en los 36 NB primarios utilizando qRT-PCR.

ES 2 379 236 A1

El protocolo de qRT-PCR a su vez pasó por un control de la estabilidad de la expresión de los genes de referencia seleccionados, *TBP*, *HPRT1* y *SDHA*. Se analizó en la serie de casos estudiados, el coeficiente de variación (CV) de estos tres genes a lo largo del trabajo de investigación realizado, ya que los análisis de qRT-PCR fueron realizados a distintos tiempos durante los últimos 4 años (Tabla 2). El CV se calculó para los niveles de expresión de los 3 genes de referencia tanto para el grupo de muestras tumorales como para los calibradores 1x. En todos los casos se cumplió que $CV < 5\%$.

TABLA 2

Coefficientes de variación de lo genes de referencia

	HPRT1	SDHA	TBP
CV % NB	4,00	4,92	3,56
CV % calibradores	2,20	4,50	2,97

Normalización de las muestras

Para poder realizar el análisis estadístico en primer lugar se tipificaron todos los datos de expresión génica (microarray y qRT-PCR) mediante una z-transformación. Esta normalización tuvo como objetivo la utilización de puntuaciones de desviaciones estándar, favoreciendo así la comparación de los datos de expresión obtenidos de los diferentes genes, medidos en unidades arbitrarias y con variabilidades intra-gen heterogéneas sin que esto presentara relevancia biológico-clínica y, por tanto, no afectara a los resultados que se pudieran obtener.

Regresión de Cox. Análisis de supervivencia (Modelos univariados)

La estimación pronóstica de los genes hallados a partir del análisis de su expresión diferencial en NB se evaluó en un contexto estadístico de análisis de la supervivencia. El objetivo fue evaluar una posible asociación entre los patrones de expresión de cada gen con las variables de valoración clínica supervivencia global (OS, del inglés Overall Survival) y la supervivencia libre de evento (EFS, del inglés Event Free Survival), considerando evento como recaída o progresión de la enfermedad. Además, con la idea de desarrollar un modelo que pudiera constituir una prueba fácilmente aplicable, y con una buena relación coste-efectividad en la práctica clínica para el pronóstico, se procedió utilizando únicamente los valores de expresión cuantificados mediante la técnica analítica qRT-PCR.

Para los análisis estadísticos se emplearon valores de expresión z-transformados como variables independientes. Se emplearon las variables de valoración clínica descritas como dependientes en los modelos estadísticos, considerando como tiempo de seguimiento el tiempo hasta la presencia de evento o muerte, según corresponda, y en caso de que el paciente no presentase ninguna de estas características de valoración clínica, el paciente se consideró censurado con tiempo de seguimiento hasta la última visita de valoración disponible. Finalmente se evaluó la magnitud de la estimación de riesgo (valorado como estimaciones de Hazard Ratio y los Intervalos de Confianza al 95%) que, de forma independiente, ofrecía como factor pronóstico cada uno de los genes. Este análisis se realizó en un primer grupo de 36 NB primarios consecutivos, no seleccionados. Se consideraron asociados de forma estadísticamente significativa a OS y EFS sólo aquellos genes con valores de $p < 0,05$. Tanto para OS como para EFS los genes asociados a pronóstico favorable se definieron como aquellos con un valor de Hazard Ratio < 1 mientras que los genes de predicción de pronóstico desfavorable con un Hazard Ratio > 1 . En conjunto, seis de los genes estudiados mostraron una buena relación de forma independientemente con OS y EFS: *NME1*, *REER*, *PTPRF*, *GNB1*, *PAFAH1B1* y *CHD5* (Tablas 3 y 4).

ES 2 379 236 A1

TABLA 3

Análisis de supervivencia mediante regresión de Cox, usando como variable de valoración clínica la OS

OS			
	HR	IC 95%	valor p
NME1	2,091	1,254-3,486	0,005
FLOT2	0,773	0,376-1,588	0,483
POLR2A	0,539	0,199-1,462	0,225
RERE	0,520	0,273-0,989	0,046
RUTBC1	0,490	0,205-1,169	0,108
PTPRF	0,395	0,163-0,955	0,039
VAMP2	0,372	0,097-1,424	0,149
ARHGEF11	0,369	0,135-1,011	0,053
GNB1	0,324	0,118-0,891	0,029
PAFAH1B1	0,198	0,066-0,598	0,004
CHD5	0,164	0,032-0,850	0,031

TABLA 4

Análisis de supervivencia mediante regresión de Cox, usando como variable de valoración clínica la EFS

EFS			
	HR	IC 95%	valor p
NME1	1,590	1,058-2,415	0,026
FLOT2	1,043	0,621-1,753	0,873
RUTBC1	0,654	0,356-1,202	0,171
ARHGEF11	0,649	0,320-1,313	0,229
VAMP2	0,566	0,250-1,279	0,171
RERE	0,546	0,329-0,906	0,019
POLR2	0,531	0,228-1,236	0,142
GNB1	0,458	0,230-0,912	0,026
CHD5	0,384	0,152-0,971	0,043
PTPRF	0,340	0,159-0,728	0,006
PAFAH1B1	0,229	0,101-0,522	0,000

Análisis de componentes principales (PCA)

Una vez seleccionados los genes que podían representar un marcador de pronóstico en NB, se creó un modelo estadístico de predicción de pronóstico construido únicamente a partir de la combinación lineal de los niveles de expresión de los 6 genes seleccionados para obtener, idealmente, una única medición global del perfil de expresión de estos genes en cada tumor. Mediante la técnica multivariante no supervisada Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés Principal Components Analysis) se crearon nuevas variables sintéticas basadas en combinaciones lineales de las variables originales: niveles de expresión de los genes previa z-transformación.

El objetivo, estadísticamente hablando, era representar “n” pacientes descritos por “p” expresiones génicas combinadas, a partir de “r” genes, en una única variable nueva que mejor ejemplificaran la información contenida en los niveles de expresión de los “r” genes, de forma que “p” < “r”. El criterio seguido para ello fue la selección del menor conjunto de genes que mayor proporción de variabilidad explicara con una sola combinación lineal de los niveles de expresión, z-transformados, de los mismos. Como criterio secundario, esta combinación lineal (también denominado componente, o factor) debía de presentar un valor propio asociado superior a 1. Con esta combinación lineal se representó, además, la contribución relativa de cada uno de los genes a la explicación de la variabilidad. Se trató, por lo tanto, de construir un modelo estadístico (o fórmula pronóstica) basado en la contribución relativa de cada una de las expresiones génicas.

El proceso se dividió en los siguientes pasos:

- Estudiar la capacidad predictiva en el pronóstico clínico, definido como evento o muerte, de los genes de forma independiente;
- Mediante la realización de combinaciones lineales resultantes de análisis de PCA con todos los genes seleccionados, se estudió la interrelación de los niveles de expresión, así como el peso específico que cada gen aportaba;
- Reduciendo el número de genes implicados y sus posibles permutaciones en los análisis, se produjeron posibles fórmulas pronósticas multivariantes;
- Cada fórmula se probó en modelos discriminativos mediante técnicas basadas en modelos de Cox para evaluar su idoneidad en la predicción del pronóstico clínico;
- Se seleccionaron, finalmente, el conjunto más parsimonioso de genes con el criterio de que la adicción de otro gen más no representara ventaja alguna en la predicción del pronóstico.

En primer lugar, se realizó el PCA para los 6 genes preseleccionados, con los datos de expresión génica obtenidos por qRT-PCR. Se fueron creando componentes (funciones, combinaciones lineales) a partir de combinaciones de las variables (genes) z-transformadas. El análisis bruto genera tantas combinaciones lineales como variables originales había en el problema; en este caso seis (Tabla 5).

TABLA 5

Tabla que recoge los 6 componentes o funciones obtenidos por PCA

Componente	Valor propio	% de variabilidad
1	3,405	56,747
2	0,908	15,13
3	0,605	10,089
4	0,421	7,021
5	0,383	6,379
6	0,278	4,635

El criterio de selección de un componente se basa en su valor propio, en la capacidad que tiene la nueva variable de explicar la variabilidad de los genes. Se consideró que componentes con valor propio <1 no aportaban explicación suficiente de la variabilidad de los datos, solo explicaban variabilidad residual. En este análisis se obtuvo un componente con un valor propio >1 (valor propio = 3,405) que explicaba más del 56% de la variabilidad de los datos. En la representación de la contribución de cada gen al valor pronóstico se indica “la pendiente” de la combinación lineal asociada a cada gen en este componente (Figura 1, Tabla 6). Por tanto, sólo el primer componente presenta un valor propio >1 y explica el 56,747% de la variabilidad de los genes. El resto de componentes (2-6) solo explican variabilidad residual.

ES 2 379 236 A1

TABLA 6

Representación del componente número 1 con un valor propio > 1. Valor de la pendiente de cada uno de los genes que conforman el componente

Genes	Componente
NME1	-0.563
RERE	0.793
PTPRF	0.768
GNB1	0.836
PAFAH1B1	0.804
CHD5	0.724

Esto explicó la posibilidad de crear una nueva variable (Y) que constituye la combinación lineal del componente representado en la Figura 1, representada del siguiente modo:

$$(Y) = (-0.563 * NME1) + (0.793 * RERE) + (0.768 * PTPRF) + (0.836 * GNB1) + (0.804 * PAFAH1B1) + (0.724 * CHD5)$$

Se observó que el gen NME1 estaba representado por un valor negativo, indicando que la contribución de este gen a la predicción era inversamente proporcional, mientras que la del resto de los genes era directamente proporcional. Es decir, el nivel de expresión de NME1 es antagónico al resto de los genes estudiados. Efectivamente, a mayor expresión de NME1, mayor posibilidad de presentar evento, progresión de enfermedad y/o muerte, mientras que mayor expresión de los otros genes se asocian a tumores menos agresivos.

Después de observar que algunos genes tenían un mayor peso que otros en la creación de la nueva variable (Y), el estudio se centró en reducir el número de variables (genes) para la obtención del modelo estadístico con la máxima capacidad de predicción. Tras probar todas las combinaciones de genes posibles, finalmente se descartaron aquellos genes menos relevantes en el análisis por PCA y/o que no eran factores de predicción independientes de pronóstico. Se seleccionaron como participantes en el modelo de predicción definitivo los siguientes tres genes: NME1, CHD5 y PAFAH1B1.

La idoneidad de esta combinación de genes para la elaboración del modelo final de predicción de riesgo se sustentó también en el hecho de que, además de no empeorar el nivel de variabilidad explicada por el primer componente en el análisis de PCA, no se “perdió” interpretación ni descripción final de los datos, es decir, no disminuyó la capacidad de predicción de pronóstico por el hecho de haber reducido el número de genes, valorando esta capacidad discriminativa mediante modelos de regresión de Cox.

Se fueron creando componentes (funciones, combinaciones lineales, factores) a partir de combinaciones de los genes NME1, CHD5 y PAFAH1B1. El análisis bruto generó tantas combinaciones lineales como variables originales había en el problema. En este caso se obtuvieron 3 componentes (Tabla 7). Como ocurrió con el PCA de 6 genes, únicamente uno de los componentes mostró un valor propio > 1 que describía más del 60% de la variabilidad: el primer componente presentó un valor propio > 1 y explicó el 62,889% de la variabilidad de los genes. El resto de componentes (2-3) solo explicaban variabilidad residual.

TABLA 7

3 componentes o funciones obtenidos por PCA

Componente	Valor propio	% de variabilidad
1	1,887	62,889
2	0,603	20,113
3	0,51	16,998

En la representación gráfica de la contribución de cada gen al valor pronóstico, se indica la ponderación aplicada a cada nivel de expresión de cada gen en la combinación lineal asociada para este componente (Figura 2, Tabla 8).

ES 2 379 236 A1

TABLA 8

Representación del componente número 1 con un valor propio >1. Valor de la pendiente de cada uno de los genes que conforman el componente

5

Genes	Componente
NME1	- .374
PAFAH1B1	.430
CHD5	.418

10

15 Se construyó una fórmula basada en las contribuciones relativas de los niveles de expresión de los tres genes según la siguiente ecuación matemática:

$$Y = (\alpha_1 \text{NME1}) + (\alpha_2 \text{CHD5}) + (\alpha_3 \text{PAFAH1B1})$$

20

α_n = representa la contribución de cada gen a la explicación de la variable (Y);

donde $\alpha_1 = -0.374$; $\alpha_2 = 0.430$; $\alpha_3 = 0.418$ (Tabla 8).

25

NME1 tuvo un valor negativo que indicaba que niveles de expresión altos de este gen se relacionaban con menor supervivencia y un pronóstico desfavorable, esto es, la pertenencia del paciente al grupo de alto riesgo. Por el contrario, CHD5 y PAFAH1B1 dieron valores positivos que indicaban que niveles de expresión altos de estos genes estaban asociados a mayor supervivencia y a pronóstico favorable (grupo de bajo riesgo).

30

Conjuntamente los niveles de expresión de estos genes permitieron valorar a cada paciente en función de una única variable (Y). Al evaluar la relación de (Y) con OS y EFS se observó cómo pacientes con una puntuación (Y) baja ($Y < 0$), presentaban una mayor posibilidad de desarrollar un evento (recaída o muerte). En cambio, a medida que aumentaba la puntuación ($Y > 0$) mejoraba el pronóstico del paciente.

35

Ejemplo 3

Validación de modelo de predicción en una cohorte independiente de NB primarios

40

Con el primer grupo de muestras ($n=36$), se desarrolló una fórmula matemática basada en la expresión de 3 genes, representada de la siguiente manera:

$$Y = (-0.374 * \text{NME1}) + (0.430 * \text{PAFAH1B1}) + (0.418 * \text{CHD5})$$

45

Este modelo está asociado de manera estadísticamente significativa con las variables de valoración clínica OS y EFS. Con el objetivo de evaluar la capacidad de predicción de pronóstico del modelo, se procedió con una validación en un grupo independiente de 60 casos de NB primarios nuevos, que cumplieran con los requisitos de selección descritos, y que no se habían empleado en ningún momento en los procesos descritos. Se consideró, por tanto, que este punto representaba la validación externa e independiente de los resultados.

50

Tras realizar el análisis de expresión mediante qRT-PCR, se procedió con la tipificación (z-transformación) del resultado analítico, con los valores de los parámetros que se obtuvieron en el análisis de los 36 casos de entrenamiento, y la posterior aplicación de la fórmula matemática obtenida con el grupo inicial de 36 NB.

55

La tipificación de los datos a una distribución normal Z (Normal con media 0 y desviación estándar 1) de los niveles de expresión de los genes antes del proceso de PCA, implicó que el punto de corte para la fórmula de predicción resultante, necesario para la clasificación de los NB en tumores de pronóstico de alto o bajo riesgo, debía de ser, de forma unívoca, el cero. De esta forma, y basados en las observaciones previas (véase ejemplo 2, último párrafo), aquellos tumores con valores de la variable (Y) > 0 se clasificaron como NB de pronóstico favorable, mientras que los pacientes con valores (Y) < 0 fueron clasificados como NB de pronóstico desfavorable.

60

Con este punto de corte se realizó un análisis de supervivencia mediante el método Kaplan Meier tomando como variables dependientes la OS y la EFS, y las diferencias en la distribución de la supervivencia entre los dos grupos fueron analizadas por el log rank test. Para la variable OS la evolución clínica de los NB con valores de la variable (Y) > 0 se asoció de forma estadísticamente significativa a mayores tiempos de supervivencia y menor número de eventos (muerte) ($p=0,019$) en comparación con los NB clasificados con valores (Y) < 0 (Figura 3, Tabla 9).

65

ES 2 379 236 A1

TABLA 9

Validación del modelo de predicción de pronóstico frente a la variable clínica OS. A) Resumen muestras del análisis. B) Follow-up de los casos analizados, resumen tiempos de supervivencia estimados para los 60 NB en estudio. C) Test estadístico Log Rank (Mantel-Cox) que enfrenta los NB clasificados como "bajo riesgo", y sus tiempos de supervivencia, con los NB clasificados como "alto riesgo", y sus tiempos de supervivencia

A

Clasificación (Y)	Total N	Nº de eventos	Censurados	
(Y) "bajo riesgo"	38	1	37	97,40%
(Y) "alto riesgo"	22	5	17	77,30%
Total	60	6	54	90,00%

B

Clasificación (Y)	Error Media		
	Estimado	estandar	95% Intervalo de confianza
(Y) "bajo riesgo"	222,787	7,327	208,426 - 237,148
(Y) "alto riesgo"	176,384	26,726	124,001 - 228,766
Total	215,09	12,934	189,739 - 240,44

C

Test estadístico	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	5,492	1	0,019

En el grupo de (Y) "bajo riesgo", 37 de 38 pacientes siguieron vivos, con una media de seguimiento de 222,8 meses (IC95%208,426-237,148). Por otro lado, en el grupo de "alto riesgo" 5 de 22 pacientes murieron por enfermedad, siendo la estimación de la supervivencia de 176,4 meses (IC95% 124,001-228,766) (Tabla 10, Figura 3). Por tanto con un perfil (Y) "bajo riesgo" se observó menor cantidad de muerte por enfermedad en el tiempo.

Para la variable EFS la evolución clínica de los NB con valores $Y > 0$ se asociaba de forma estadísticamente significativa ($p=0,014$) a mayores tiempos de supervivencia sin presencia de evento y menor número de eventos, entendiéndose como evento recaída de la enfermedad, progresión de la enfermedad y/o la muerte por enfermedad, en comparación con los NB clasificados con valores $Y < 0$ (Figura 4, Tabla 10).

ES 2 379 236 A1

TABLA 10

Validación del modelo de predicción de pronóstico frente a la variable clínica EFS. A) Resumen muestras del análisis. B) Resumen de los tiempos de supervivencia libres de evento estimados para los 60 NB en estudio. C) Test estadístico Log Rank (Mantel-Cox) que enfrenta los NB clasificados como “bajo riesgo”, y sus tiempos de supervivencia libres de evento, con los NB clasificados como “alto riesgo”, y sus tiempos de supervivencia libres de evento

A

Clasificación (Y)	Total N	Nº de eventos	Censurados	
(Y) "bajo riesgo"	38	6	32	84,20%
(Y) "alto riesgo"	22	11	11	50,00%
Total	60	17	43	71,70%

B

Clasificación (Y)	Error Media		
	Estimado	estándar	95% Intervalo de confianza
(Y) "bajo riesgo"	140,807	10,999	119,25 - 162,365
(Y) "alto riesgo"	67,74	13,547	41,187 - 94,294
Total	117,464	10,635	96,62 - 138,307

C

Test estadístico	Chi-Square	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	6,077	1	0,014

En el grupo de “bajo riesgo”, 32 de 38 pacientes no presentaron evento, con una media de seguimiento de 140,8 meses (IC95% 119,25-162,365). Por otro lado, en el grupo de “alto riesgo” 11 de 22 pacientes presentaron evento, en una media de tiempo de seguimiento de 67,7 meses (IC95% 41,187-94,294) (Tabla 10, Figura 4). Por tanto, con un perfil (Y) “bajo riesgo” hay menor número de eventos en el tiempo.

Comparación del modelo de predicción de pronóstico con parámetros clínicos y biológicos de demostrado valor pronóstico en NB. Modelos de Cox de riesgo proporcional

Entre los marcadores clínico-biológicos asociados a pronóstico desfavorable en neuroblastoma se incluyeron la edad >12 meses, el estadio 4 metastático, la amplificación del oncogén *NMYC*, y la pérdida del cromosoma 1p. Con el objetivo de investigar si el modelo poseía capacidad de predicción de forma independiente de los parámetros establecidos en NB, se realizó inicialmente un análisis univariante de Cox, para OS y EFS con variables dicotomizadas.

En relación a la OS, todas las variables analizadas demostraron una elevada capacidad de predicción de pronóstico, de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$). El modelo estadístico (Y) basado únicamente en la expresión de 3 genes, presenta un Hazard Ratio = 26,1 (IC 95% 3,5-195,4; $p = 0,0015$), lo que implica que un valor negativo de la función (Y) aumenta en promedio 26 veces el riesgo de presentar muerte. La edad, presenta un Hazard Ratio = 12,7 (IC 95% 1,7-95,2; $p = 0,0134$); el estadio INSS presenta un HR=5,6 (IC 95% 2,0-15,7; $p = 0,0009$); el estado de amplificación del oncogén *NMYC* presenta un Hazard Ratio = 7,2 (IC 95% 2,9-18,0; $p < 0,0001$); y el estado alélico del cromosoma 1p presenta un Hazard Ratio = 7,2 (IC 95% 1,8-28,9; $p = 0,0054$) (Tabla 11A).

Para EFS, todas las variables analizadas excepto el estado alélico del cromosoma 1p también son un factor pronóstico, de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$). Pero una vez más el (Y) presentó un Hazard Ratio mayor que el de las demás variables, HR=5,1 (IC 95% 2,3-11,3; $p < 0,001$). La edad, presentó un HR=3,3 (IC 95% 1,4-8,0;

ES 2 379 236 A1

p=0,0078); el estadio INSS presentó un Hazard Ratio = 3,8 (IC 95% 1,9-7,7; p=0,0002); el estado de amplificación del oncogén *NMYC* presentó un Hazard Ratio = 3,3 (IC 95% 1,6-6,5; p=0,0009); y el estado alélico del cromosoma 1p presentó un Hazard Ratio = 1,8 (IC 95% 0,7-5,0; p=0,2299) (Tabla 11B).

TABLA 11

Análisis univariante de Cox del modelo de predicción de pronóstico, junto a distintas variables clínico-biológicas con demostrado poder de predicción, edad al diagnóstico, estadio INSS, amplificación de NMYC y el estado del cromosoma 1p, frente a la variable clínica OS (A) y EFS (B)

A

OS			
	HR	IC 95%	valor p
Variable (Y)	26,07	3,48 - 195,42	0,0015
edad	12,71	1,7 - 95,24	0,0134
estadio INSS	5,63	2,03 - 15,65	0,0009
<i>NMYC</i>	7,19	2,88 - 17,95	<0,0001
estado 1p	7,19	1,79 - 28,85	0,0054

B

EFS			
	HR	IC 95%	valor p
Variable (Y)	5,13	2,32 - 11,34	0,0001
edad	3,31	1,37 - 8,01	0,0078
estadio INSS	3,8	1,88 - 7,69	0,0002
<i>NMYC</i>	3,26	1,62 - 6,54	0,0009
estado 1p	1,84	0,68 - 5	0,2299

Una vez examinada la capacidad de determinación del riesgo de cada una de las variables de manera independiente, se procedió a analizar de manera bivariada el modelo de predicción con el resto de las variables, para determinar su capacidad de predecir riesgo de muerte o evento en presencia de otros factores pronósticos ya establecidos, como son la edad al diagnóstico, el estadio INSS, el estado de amplificación de *NMYC* y el estado del cromosoma 1p.

Al realizar el estudio para OS (Tabla 12), se observó que al estudiar el modelo (Y) junto con la edad al diagnóstico, (Y) presenta una Hazard Ratio = 18,2 (IC95% 2,4-137,7; p=0,005) y la edad una Hazard Ratio = 6,6 (0,9-49,8; p=0,0685). Por lo tanto el perfil continuaba siendo un factor pronóstico de manera estadísticamente significativo mientras que la edad perdió capacidad de predicción. Además, el valor p del factor de interacción era de 0,9372, por lo que el modelo predijo pronóstico independientemente del otro factor de riesgo. Al estudiar el modelo (Y) junto con el estadio, (Y) presentó una Hazard Ratio = 19,1 (IC95% 2,3-158,1; p=0,0063) y el estadio una Hazard Ratio = 1,7 (IC95% 0,6-5,0; p=0,3265). En este caso también el perfil siguió siendo un factor pronóstico de manera estadísticamente significativa mientras que el estadio perdió capacidad de predicción. Además, el valor p del factor de interacción es de 0,9182, por lo que el modelo predijo pronóstico independientemente del otro factor de riesgo. Al estudiar el (Y) junto con el estado de amplificación del oncogén *NMYC*, (Y) presentó una HR=16,56 (IC95% 2,1-133,0; p=0,0082)

ES 2 379 236 A1

y la amplificación de *NMYC* una Hazard Ratio = 2,7 (IC95% 1,1-7,0; p=0,0384). En este caso tanto el perfil como la amplificación de *NMYC* continuaron siendo un factor pronóstico de manera estadísticamente significativa. El valor p del factor de interacción es de 0,9488, por lo que el (Y) predice pronóstico independientemente del otro factor de riesgo. Al estudiar el (Y) junto con el estado del cromosoma 1p se obtuvo un resultado no estimable (NE), probablemente debido a la asociación que existe entre las dos variables, ya que el perfil biológico (Y) incluye un gen localizado en el cromosoma 1p, *CHD5* (1p36.31). La pérdida del brazo corto del cromosoma 1 representa una de las alteraciones genómicas más frecuentes en NB de alto riesgo y se asocia con bajos niveles de expresión de *CHD5*. En definitiva, los resultados mostraron la capacidad de predicción de pronóstico del modelo, de forma independiente respecto a otros marcadores clínico-biológicos de demostrado valor pronóstico en NB. Además de la independencia del (Y) respecto al resto de factores de riesgo, su magnitud de la capacidad pronóstica (estimada como Hazard Ratio) sigue siendo muy alta, tanto en el modelo crudo, como en los ajustados (Tabla 12).

TABLA 12

Análisis bivariante de Cox del modelo de predicción de pronóstico, junto a distintas variables clínico-biológicas con demostrado poder de predicción, edad al diagnóstico, estadio INSS, amplificación de NMYC y el estado del cromosoma 1p, frente a la variable clínica OS

OS				
	HR	IC 95%	valor p	Interacción, valor p
Variable (Y)	18,17	2,4 - 137,68	0,005	
edad	6,57	0,87 - 49,81	0,0685	0,9372
Variable (Y)	19,07	2,3 - 158,11	0,0063	
estadio INSS	1,71	0,59 - 5,01	0,3265	0,9182
Variable (Y)	16,59	16,59 2,07 - 132,95	0,0082	
<i>NMYC</i>	2,72	1,05 - 7,02	0,0384	0,9488
Variable (Y)	194593,89	NE - NE	0,9131	
estado 1p	3,55	0,87 - 14,5	0,077	0,9909

Al realizar el estudio para EFS (Tabla 30), se observó que al estudiar el modelo (Y) junto con la edad al diagnóstico, (Y) presentó una Hazard Ratio = 4,2 (IC95% 1,9-9,6; p=0,0005) y la edad una Hazard Ratio = 2,2 (0,9-5,5; p=0,0846). Por lo tanto el modelo siguió siendo un factor pronóstico de manera estadísticamente significativa mientras que la edad perdió capacidad de predicción. Además, el valor p del factor de interacción fue de 0,2087, por lo que el (Y) predijo pronóstico independientemente del otro factor de riesgo. Al estudiar el (Y) junto con el estadio, (Y) presentó una Hazard Ratio = 3,5 (IC95% 1,4-9,0; p=0,0076) y el estadio una Hazard Ratio = 1,9 (IC95% 0,8-4,4; p=0,1244). En este caso también el modelo siguió siendo un factor pronóstico de manera estadísticamente significativa mientras que el estadio perdió capacidad de predicción. Además, el valor p del factor de interacción fue de 0,1653, por lo que el (Y) predijo pronóstico independientemente del otro factor de riesgo. Al estudiar el Y junto con el estado de amplificación del oncogén *NMYC*, (Y) presentó una Hazard Ratio = 4,3 (IC95% 1,8-10,1; p=0,001) y la amplificación de *NMYC* una Hazard Ratio = 1,6 (IC95% 0,8-3,4; p=0,2222). En este caso también el (Y) siguió siendo un factor pronóstico de manera estadísticamente significativa mientras que la amplificación de *NMYC* perdió capacidad de predicción. El valor p del factor de interacción fue de 0,9334, por lo que el (Y) predijo pronóstico independientemente del otro factor de riesgo. Al estudiar el (Y) junto con el estado del cromosoma 1p, (Y) presentó una Hazard Ratio = 5,77 (IC95% 1,97-16,9; p=0,0014) y el estado del cromosoma 1p una Hazard Ratio = 1,2 (IC95% 0,4-3,3; p=0,7786). Una vez más el perfil siguió siendo un factor pronóstico de manera estadísticamente significativa mientras que el estado del cromosoma 1p perdió capacidad de predicción. El valor p del factor de interacción fue de 0,9431, por lo que el (Y) predijo pronóstico independientemente del otro factor de riesgo. En definitiva, el modelo (Y) presenta estabilidad en la predicción del pronóstico (evento) de forma independiente respecto a otros marcadores clínico-biológicos de demostrado valor pronóstico en NB (Tabla 13).

TABLA 13

Análisis bivariante de Cox del modelo de predicción de pronóstico, junto a distintas variables clínico-biológicas con demostrado poder de predicción, edad al diagnóstico, estadio INSS, amplificación de NMYC y el estado del cromosoma 1p, frente a la variable clínica EFS

5

EFS				
	HR	IC 95%	valor p	Interacción, valor p
Variable (Y)	4,24	1,88 - 9,58	0,0005	
edad	2,22	0,9 - 5,5	0,0846	0,2087
Variable (Y)	3,54	1,4 - 8,98	0,0076	
estadio INSS	1,91	0,84 - 4,35	0,1244	0,1653
Variable (Y)	4,26	1,8 - 10,09	0,001	
NMYC	1,6	0,75 - 3,42	0,2222	0,9334
Variable (Y)	5,77	1,97 - 16,93	0,0014	
estado 1p	1,16	0,41 - 3,26	0,7786	0,9431

25

Validación del modelo de predicción de pronóstico en una cohorte independiente de datos generados por análisis de microarray

30

Dado el relativo bajo número de casos incluidos en el estudio se procedió con una segunda validación del modelo de predicción utilizando una cohorte independiente de datos generados por análisis de *microarray* de 101 NB primarios al diagnóstico, en algún caso no se disponía de valoración clínica al seguimiento, por lo que se emplearon 98 casos para el análisis de la OS y 95 casos para el análisis de EFS. Estos datos habían sido descritos en publicaciones recientes (Wang Q, Diskin S, Rappaport F, et al. *Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. Cancer Research 2006, 66(12): 6050-6062*) y estaban disponibles en la base de datos pública *Gene Expression Omnibus* (GEO), NCBI, con el número de identificación GSE3960.

35

Se procedió con una tipificación de los datos de expresión correspondientes a los tres genes de interés mediante una z-transformación y se generó una nueva variable sintética ($Y\mu$) aplicable a los datos obtenidos mediante *microarrays*. Se utilizó la misma metodología estadística que para los datos obtenidos a partir de muestras analizadas mediante qRT-PCR. Se pretendió con esto valorar si esta metodología estadística, para la selección de los genes y su posterior análisis en relación a la respuesta clínica, era aplicable a datos obtenidos por análisis de *microarray*, concluyendo que la idoneidad del método estadístico no dependía del método de análisis de las muestras.

45

Se estimó la asociación de esta fórmula con el pronóstico de los NB, tomando como variables dependientes la OS y la EFS, y el punto de corte en cero. Para OS se obtuvo una HR de 9,7 (IC95% 1,3-75,2; $p < 0,01$), lo que significa que un valor negativo de la ($Y\mu$) aumenta en casi 10 veces la probabilidad de muerte por progresión de la enfermedad. Así, para la estimación de OS, la fórmula matemática ($Y\mu$) es un factor pronóstico de forma estadísticamente significativa. Para EFS se obtuvo un Hazard Ratio de 12,4 (IC95% 1,6-94,7; $p < 0,01$), lo que significa que un valor negativo de la ($Y\mu$) aumenta en 12 veces la probabilidad de presentar evento. También en este caso, para la estimación de EFS, ($Y\mu$) es un factor pronóstico de forma estadísticamente significativa.

50

También se realizó un análisis de supervivencia mediante el método Kaplan Meier, tomando como variables dependientes la OS y la EFS, y las diferencias en la distribución de la supervivencia entre los dos grupos fueron analizadas por el log rank test.

55

Para la variable OS, la evolución clínica de los NB con valores $Y > 0$ se asoció de forma estadísticamente significativa ($p = 0,008$) a mayores tiempos de supervivencia y menor número de eventos (muerte por enfermedad). Efectivamente, de los pacientes con valores Y correspondientes a NB de bajo riesgo (> 0), sólo 1/50 (2%) falleció en comparación con los NB clasificados con valores $Y < 0$ donde 11/48 (23%) pacientes fallecieron por progresión de la enfermedad (Figura 5; Tabla 14). Por tanto, con un perfil Y "bajo riesgo" se observó menor cantidad de muerte por enfermedad en el tiempo.

60

65

TABLA 14

Validación de (Y) para la variable clínica OS en una cohorte independiente de datos generados por análisis de microarray; resumen de los casos analizados

5

10

15

Evaluación microarray	Total N	Nº de eventos	Censurados	
(Y) bajo riesgo	50	1	49	98,00%
(Y) alto riesgo	48	11	37	77,10%
Total	98	12	86	87,80%

20

25

Para la variable EFS la evolución clínica de los NB con valores $Y > 0$ se asociaba de forma estadísticamente significativa ($p=0,002$) a mayores tiempos de supervivencia sin presencia de evento o menor número de eventos (entendiéndose como evento recaída de la enfermedad, progresión de la enfermedad y/o la muerte por enfermedad) en comparación con los NB clasificados con valores $Y < 0$. De hecho, de los pacientes con valores de Y correspondientes a NB de bajo riesgo (>0), únicamente 1/49 (2%) presentaron evento en comparación con los NB clasificados con valores $Y < 0$ donde 13/46 (28%) pacientes presentaron evento (Figura 6; Tabla 15). Por tanto, con un perfil modelo de pronóstico “bajo riesgo” se observó menor cantidad de eventos en el tiempo.

TABLA 15

30

Validación del modelo de pronóstico para la variable clínica EFS en una cohorte independiente de datos generados por análisis de microarray; resumen de los casos analizados

35

40

45

Evaluación microarray	Total N	Nº de eventos	Censurados	
(Y) bajo riesgo	49	1	48	98,00%
(Y) alto riesgo	46	13	33	71,70%
Total	95	14	81	85,30%

Ejemplo 4

50

Estudio del modelo de respuesta farmacológica en muestras de tejido tumoral pre y post-tratamiento de inducción

55

El tratamiento con quimioterapia puede inducir variaciones en los niveles de expresión génica de los tumores debidos a cambios importantes en los procesos celulares como son, entre otros, la inducción de diferenciación celular, reparación del DNA, apoptosis y necrosis tisular. Estos cambios están asociados a la respuesta del tumor al tratamiento. Todo ello motivó estudiar si el (Y) podría pronosticar de forma prematura la futura respuesta del paciente al tratamiento.

60

Para la evaluación de la respuesta farmacológica se llevó a cabo un análisis de los patrones de expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* en muestras aisladas de tejido tumoral pre-tratamiento y post-tratamiento de inducción (quimioterapia de inducción) de 7 casos de NB metastáticos (NB clínicamente agresivos). Posteriormente se procedió con la z-transformación de los datos y aplicación de la fórmula (Y).

65

El modelo estadístico (Y) empleado en para la determinación de la respuesta farmacológica fue desarrollado utilizando la totalidad de los 96 casos (muestra de entrenamiento + muestra de validación) siguiendo el procedimiento descrito en los ejemplos anteriores. De esta forma se obtuvo la siguiente fórmula:

$$Y = (-0.347 * NME1) + (0.462 * PAFAH1B1) + (0.480 * CHD5)$$

ES 2 379 236 A1

Inicialmente se procedió con la cuantificación de los niveles de expresión de la combinación de estos tres genes mediante qRT-PCR (aplicando los protocolos descritos en los ejemplos anteriores) en una muestra de tejido tumoral previo al tratamiento (al diagnóstico), z-transformación de los datos y la aplicación de la fórmula (Y).

5 Posteriormente, tras la administración del tratamiento, se realizó el mismo el proceso de cuantificación de la expresión anteriormente descrito, utilizando en este caso una muestra de tejido tumoral post-tratamiento (biopsia de control, *second-look*), z-transformación de los niveles de expresión y cálculo del valor (Y).

10 Los tumores analizados presentaron al diagnóstico (pre-tratamiento) niveles de expresión muy bajos de *CHD5* y *PAFAH1B1* y altos de *NME1*, un perfil de pronóstico desfavorable según los 3 marcadores descritos en la invención. Este perfil de expresión era de esperar al tratarse de NB clínicamente agresivos. De hecho, estos pacientes mostraron valores de (Y) de modelo de predicción descrito en la invención, correspondientes a NB de alto riesgo según el estudio de los tres genes (valor negativo $Y < 0$, esto es un Y clasificada como de alto riesgo) (Tabla 17).

15 Los resultados obtenidos mostraron en 3 de los 7 casos un cambio hacia valores positivos del patrón de expresión conjunto en las muestras post-tratamiento (valor de Y), determinado por un aumento de los niveles de expresión de *CHD5* y *PAFAH1B1* y una disminución de *NME1*, y por consiguiente, un incremento del valor de la variable (Y) a un valor >0 , correspondiente a NB de bajo riesgo. Estos 3 casos mostraron una respuesta buena al tratamiento (determinada mediante técnicas de imagen, niveles de catecolamina y metabolitos, e histología del tumor); estos
20 pacientes continúan vivos tras un seguimiento de 30, 65 y 27 meses respectivamente desde el diagnóstico (Tabla 17). En contraste, en los 4 casos restantes, los perfiles de expresión de los 3 genes no mostraron cambios evidentes, permaneciendo el valor de la variable (Y) en valores negativos ($Y < 0$), similares al diagnóstico. Estos tumores no mostraron una respuesta objetiva al tratamiento, los pacientes fallecieron por progresión de enfermedad a los 5, 9, 8 y
25 22 meses respectivamente desde el diagnóstico (Tabla 17).

TABLA 17

Resumen de los datos del estudio de la asociación del modelo con la respuesta farmacológica en muestras de tejido tumoral pre- y post-tratamiento en pacientes con neuroblastoma

Paciente	Valor (Y)		Seguimiento (meses)	Estado paciente
	Pre-tratamiento	Post-tratamiento		
1	-0,720	0,446	30	Vivo
2	-0,257	0,739	65	Vivo
3	-0,572	0,761	27	Vivo
4	-1,369	-2,080	5	Fallecido
5	-1,020	-0,790	22	Fallecido
6	-0,553	-1,461	9	Fallecido
7	-0,978	-0,098	8	Fallecido

REIVINDICACIONES

1. Método de predicción de pronóstico de un paciente con neuroblastoma (NB) que comprende:

- a) cuantificar la expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* en una muestra biológica aislada del paciente,
- b) introducir los datos de expresión obtenidos en la siguiente fórmula matemática:

$$Y = (\alpha_1 NME1) + (\alpha_2 CHD5) + (\alpha_3 PAFAH1B1)$$

siendo α_n un coeficiente que representa la contribución de cada gen a la definición de la variable Y,

donde aquellos pacientes con valores de la variable (Y) >0 se clasifican como NB de pronóstico favorable, y aquellos pacientes con valores (Y) <0 se clasifican como NB de pronóstico desfavorable.

2. Método, según la reivindicación 1, donde la muestra biológica empleada es tejido tumoral.

3. Método, según la reivindicación 2, donde el contenido de célula tumoral viable en la muestra de tejido tumoral es al menos del 60%.

4. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la cuantificación de los niveles de expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* se lleva a cabo mediante la técnica qRT-PCR.

5. Método para evaluar la respuesta a un tratamiento farmacológico de un paciente con NB que comprende cuantificar la expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* en una muestra biológica aislada del paciente antes y después del tratamiento, donde el aumento en los niveles de expresión de *CHD5* y *PAFAH1B1* y la disminución de los niveles de expresión de *NME1*, valorados mediante la fórmula descrita en la reivindicación 1, en la muestra obtenida después del tratamiento es indicativo de buena respuesta al tratamiento.

6. Método, según la reivindicación 5, donde la muestra biológica empleada es tejido tumoral.

7. Método, según la reivindicación 6, donde el contenido de célula tumoral viable en la muestra de tejido tumoral es al menos del 60%.

8. Método, según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde la cuantificación de los niveles de expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* se lleva a cabo mediante la técnica qRT-PCR.

9. Empleo de los niveles de expresión de los genes *CHD5*, *PAFAH1B1* y *NME1* como marcador de pronóstico y/o respuesta farmacológica en pacientes con neuroblastoma.

Gráfico de sedimentación

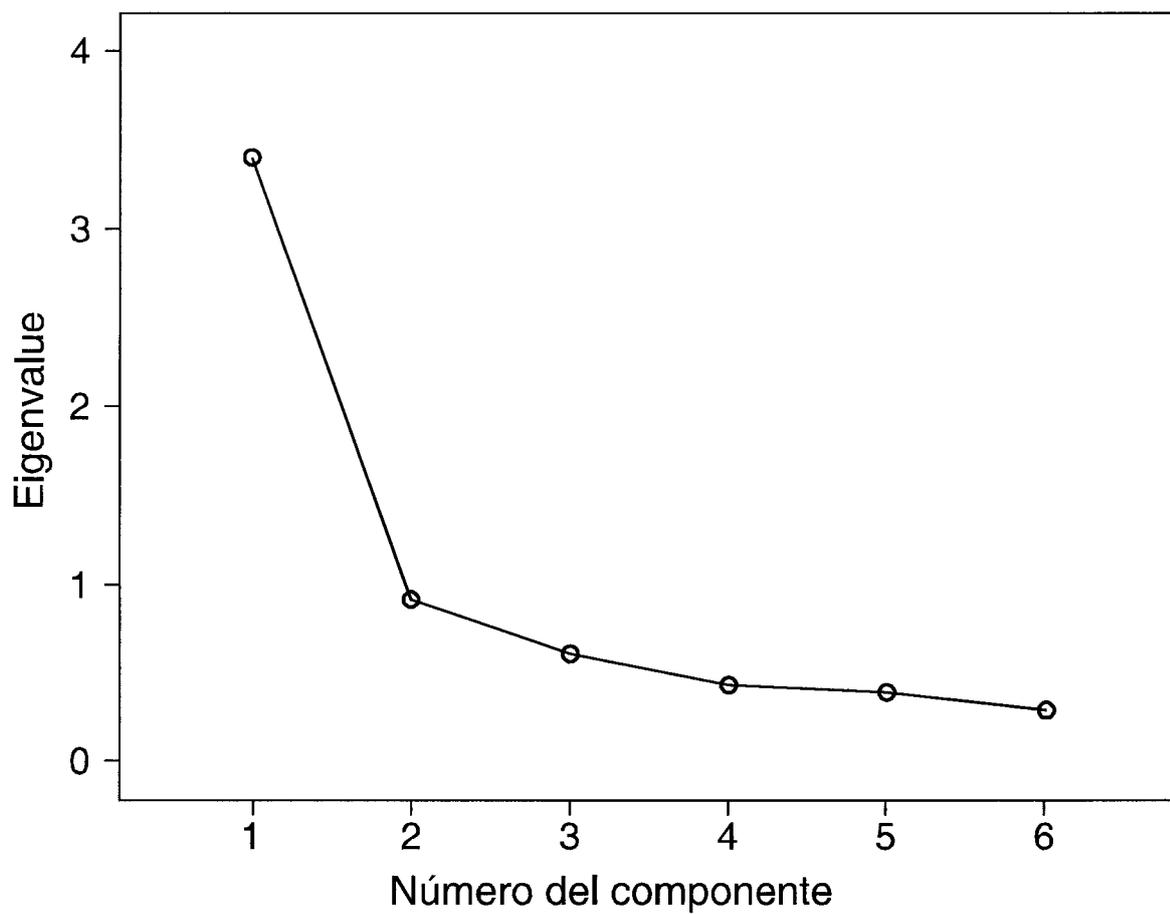


FIG. 1

Gráfico de sedimentación

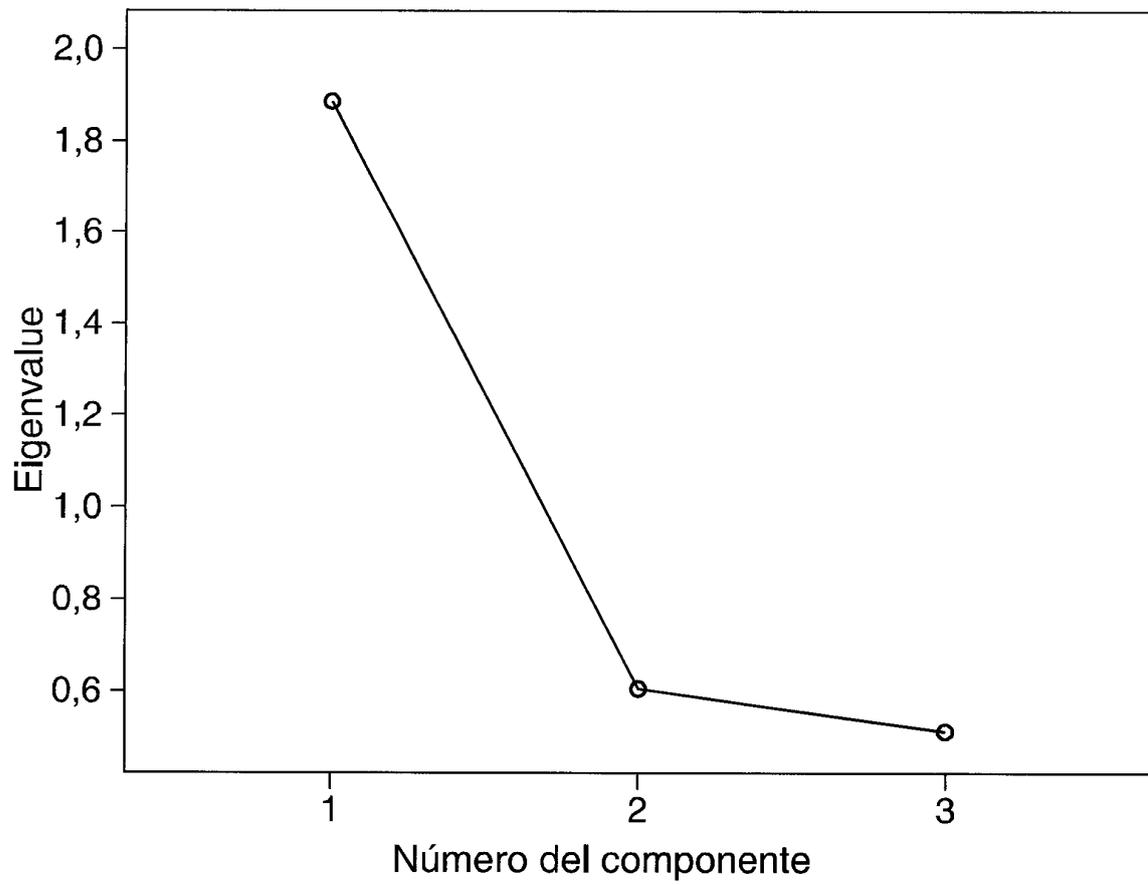


FIG. 2

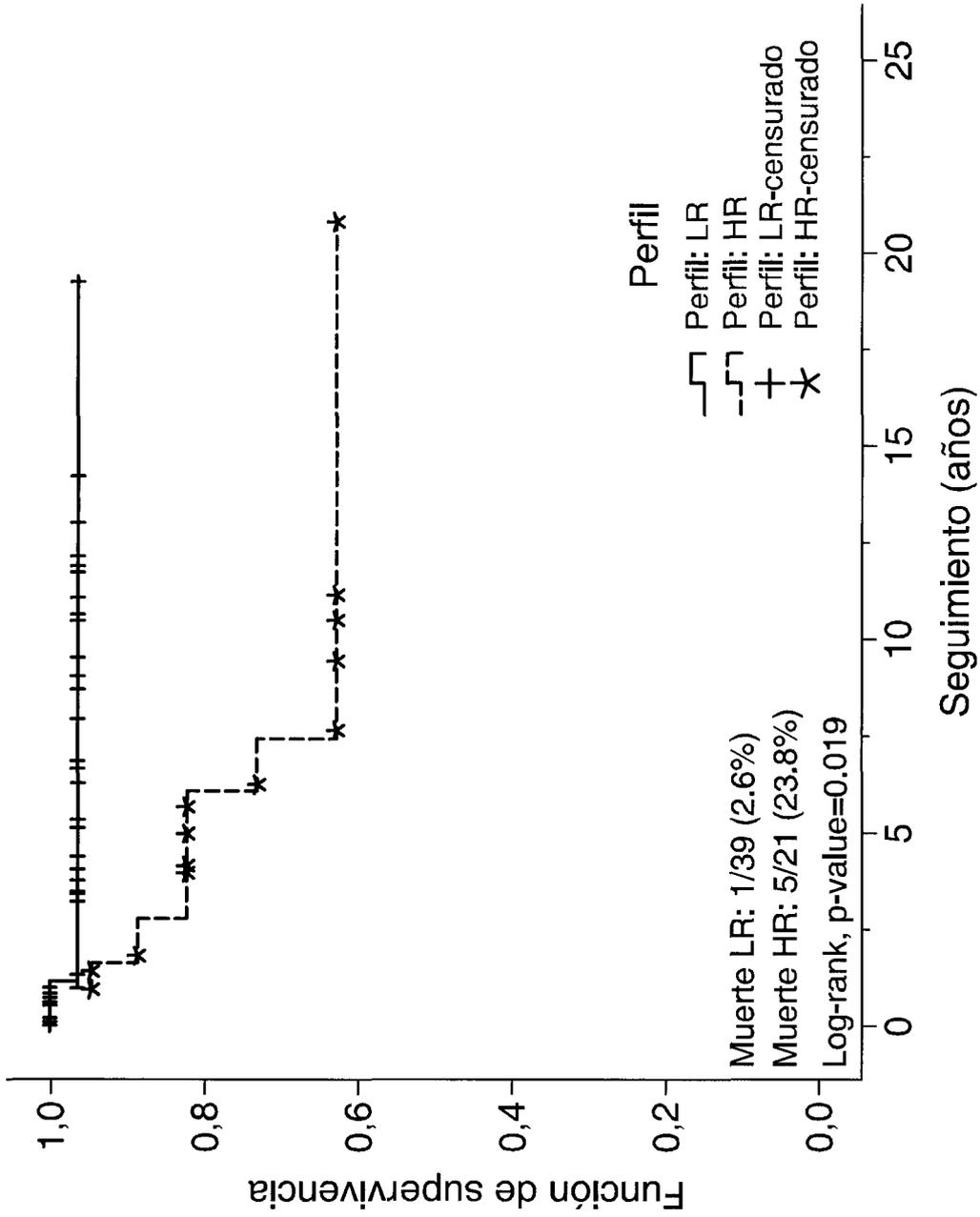


FIG. 3

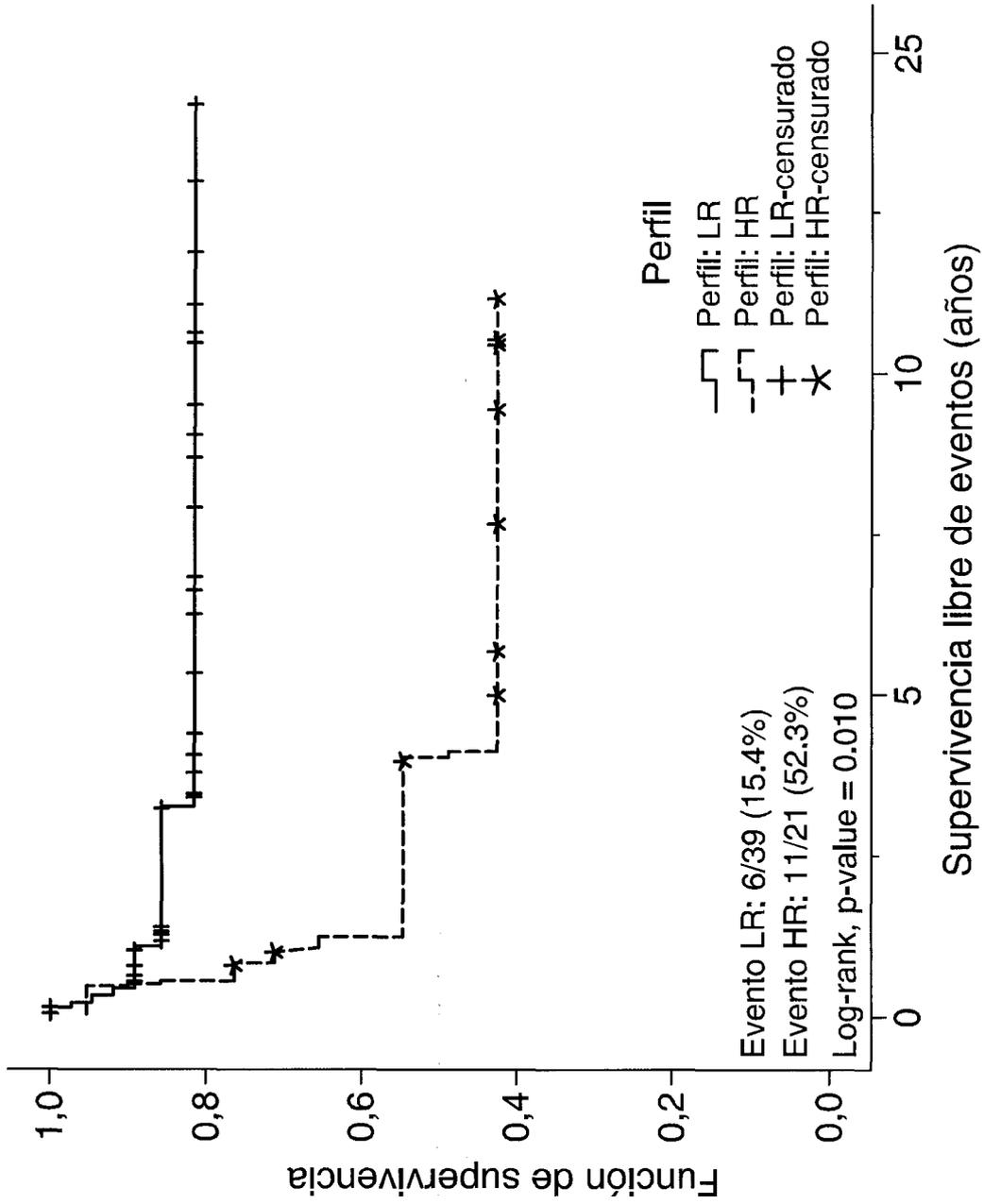


FIG. 4

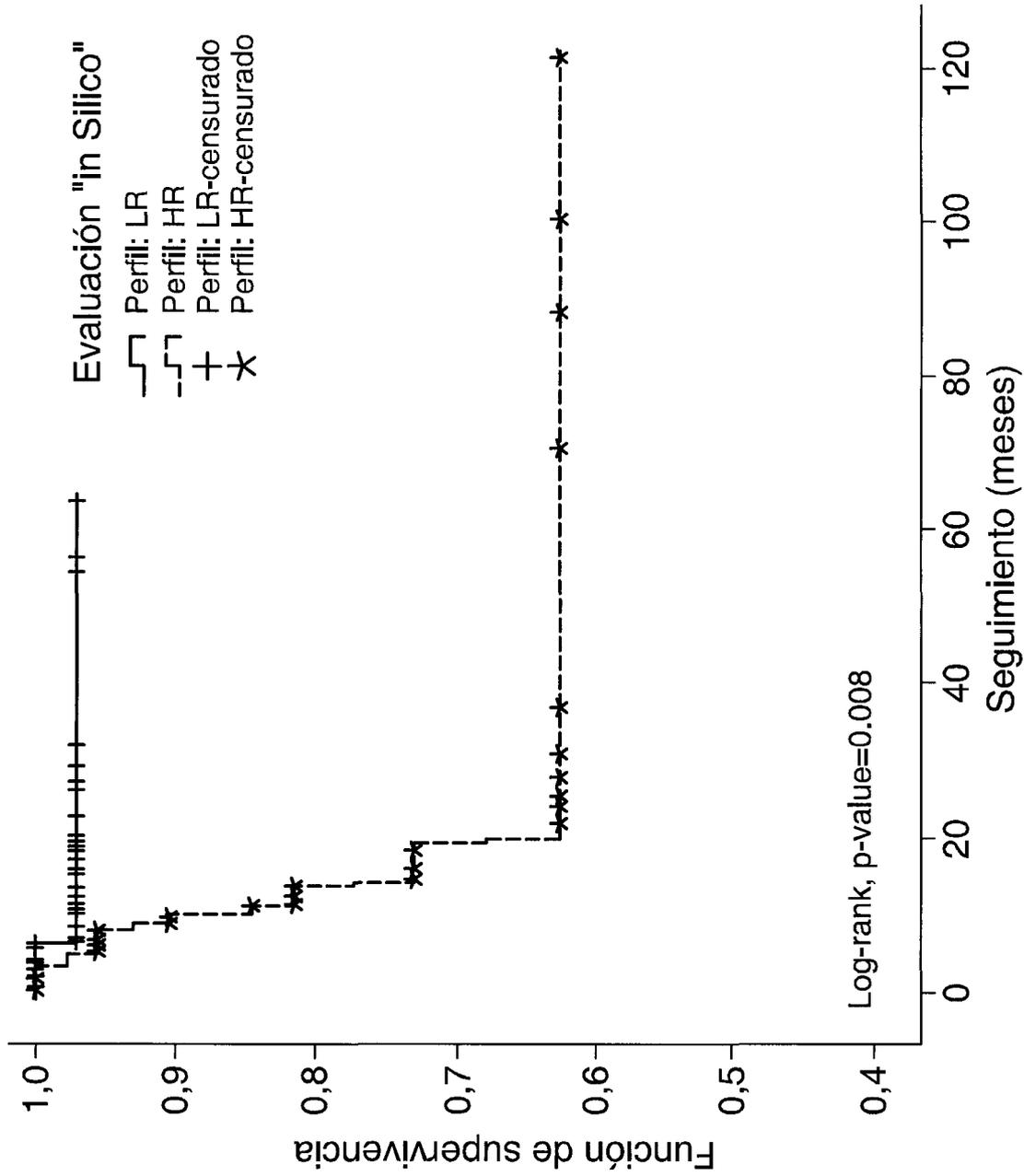


FIG. 5

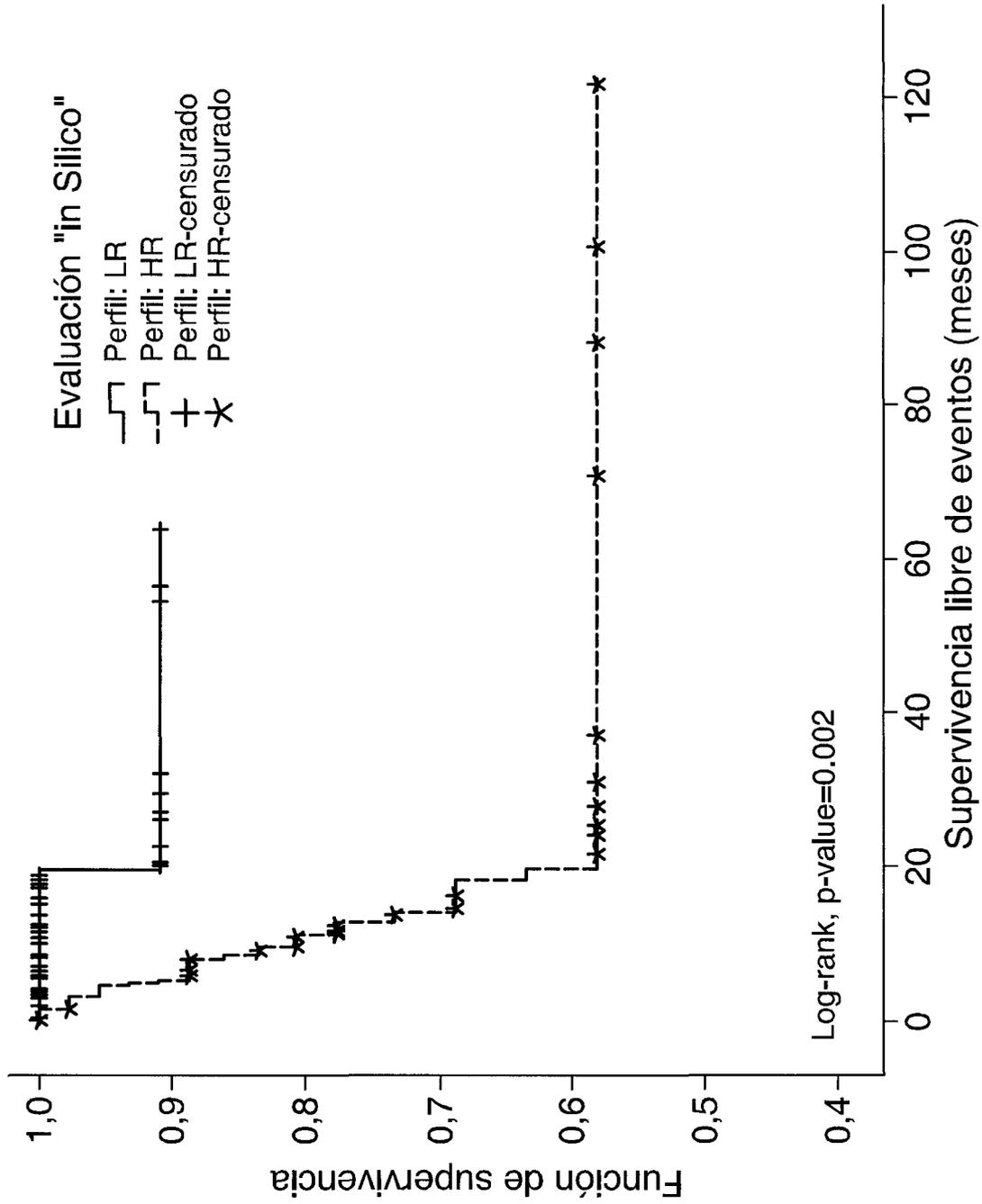


FIG. 6

Número identificación microarray Affymetrix	Gen	Símbolo gen	Localización cromosoma
41243_at	solute carrier family 35, member E2	SLC35E2	1p36.33
33341_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	GNB1	1p36.33
39261_at	GLI-Kruppel family member HKR3	HKR3	1p36.3
32093_at	chromodomain helicase DNA binding protein 5	CHD5	1p36.31
41498_at	calysyntenin 1	CLSTN1	1p36.22
32743_at	vacuolar protein sorting 13D (yeast)	VPS13D	1p36.22-p36.21
34369_at	mitofusin 2	MFN2	1p36.22
41189_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25	TNFRSF25	1p36.2
38072_at	chromosome 1 open reading frame 63	C1orf63	1p36.13-p35.1
33860_at	retinoblastoma-associated factor 600	RBAF600	1p36.13
32253_at	arginine-glutamic acid dipeptide (RE) repeats	RERE	1p36.1-p36.2
33301_g_at	cell division cycle 2-like 1 (PITSLRE proteins)	CDC2L1	1p36
	cell division cycle 2-like 2 (PITSLRE proteins)	CDC2L2	1p36.3
41737_at	serine/arginine repetitive matrix 1	SRRM1	1p36.11
33300_at	cell division cycle 2-like 1 (PITSLRE proteins)	CDC2L1	1p36
34200_at	chloride channel 6	CLCN6	1p36
38415_at	protein tyrosine phosphatase type IVA, member 2	PTP4A2	1p35
38685_at	syntaxin 12	STX12	1p35-p34.1
36204_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	PTPRF	1p34
36960_at	polyhomeotic-like 2 (Drosophila)	PHC2	1p34.3
34365_at	peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)	PPIE	1p32
34877_at	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	JAK1	1p32.3-p31.3
38704_at	microtubule-actin crosslinking factor 1	MACF1	1p32-p31
33219_at	ubiquitin specific protease 33	USP33	1p31.1
41551_at	RER1 retention in endoplasmic reticulum 1 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	RER1	1pter-q24
39150_at	ring finger protein 11	RNF11	1pter-p22.1
39281_at	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11	ARGGEF11	1q21
33111_at	CD160 antigen	CD160	1q21.1

FIG. 7A

34264_at	RUN and SH3 domain containing 1	RUSC1	1q21-q22
36805_s_at	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1	NTRK1	1q21-q22
32206_at	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)	CDC42BPA	1q42.11
1846_at	lectin, galactoside-binding, soluble, 8 (galectin 8)	LGALS8	1q42-q43
39603_at	disrupted in schizoprenia 1	DISC1	1q42.1
36118_at	nuclear receptor coactivator 1	NCOA1	2p23
33456_r_at	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	CALM2	2p21
911_s_at	calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	CALM2	2p21
36377_at	interleukin 18 receptor 1	IL18R1	2q12
35778_at	kinesin family member 5C	KIF5C	2q23.1
656_at	inositol polyphosphate-1-phosphatase	INPP1	2q32
34719_at	glutaminase	GLS	2q32-q34
34218_at	aortic preferentially expressed gene 1	APEG1	2q35
32123_at	collagen, type VII, alpha 1 (epidermolysis bullosa, dystrophic, dominant and recessive)	COL7A1	3p21.1
33916_at	nischarin	NISCH	3p21.1
31802_at	KIAA0226	KIAA0226	3q29
39597_at	actin binding LIM protein family, member 3	ABLIM3	5q32
36142_at	ataxin 1	ATXN1	6p23
37671_at	laminin, alpha 4	LAMA4	6q21
32780_at	dystonin	DST	6p12-p11
40864_at	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	RAC1	7p22
2050_s_at	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)	RAC1	7p22
32728_at	amphiphysin (Stiff-Man syndrome with breast cancer 128kDa autoantigen)	AMPH	7p14-p13
33353_at	adenylate cyclase 1 (brain)	ADCY1	7p13-p12
37615_at	growth factor receptor-bound protein 10	GRB10	7p12-p11.2
37351_at	uridine phosphorylase 1	UPP1	7p12.3
38761_s_at	FK506 binding protein 9, 63 kDa	FKBP9	7p11.1
40201_at	dopa decarboxylase (aromatic L-amino acid decarboxylase)	DDC	7p11
41258_at	Williams Beuren syndrome chromosome region 20C	WBSCR20C	7q11.23
35933_f_at	postmeiotic segregation increased 2-like 3	PMS2L3	7q11.23
39865_at	Potassium channel tetramerisation domain containing 7	KCTD7	7q11.21
37679_at	interferon-related developmental regulator 1	IFRD1	7q22-q31

FIG. 7B

38694_at	KIAA0738 gene product	KIAA0738	7q34-q35
37363_at	metastasis suppressor 1	MTSS1	8p22
40468_at	formin binding protein 1	FNBP1	9q34
41494_at	zyg-11 homolog B (<i>C. elegans</i>)-like	ZYG11BL	9q34.11
39388_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma	CAMK2G	10q22
31904_at	phosphodiesterase 2A, cGMP-stimulated	PDE2A	11q13.4
32502_at	glycerophosphodiester phosphodiesterase domain containing 5	GDPD5	11q13.4-q13.5
36770_at	signal transducer and activator of transcription 2, 113kDa	STAT2	12q13.3
32193_at	plexin C1	PLXNC1	12q23.3
33798_at	chromosome 17 open reading frame 31	C17orf31	17p13.3
34413_at	nudE nuclear distribution gene E homolog like 1 (<i>A. nidulans</i>)	NDEL1	17p13.1
32569_at	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform lb, alpha subunit 45kDa	PAFAH1B1	17p13.3
36129_at	RUN and TBC1 domain containing 1	RUTBC1	17p13.3
37517_at	GTPase activating Rap/RanGAP domain-like 4	GARNL4	17p13.3
38219_at	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	CRK	17p13.3
41151_at	skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase	SKIP	17p13.3
38626_at	zinc finger, ZZ-type with EF-hand domain 1	ZZEF1	17p13.2
40791_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa	POLR2A	17p13.1
32254_at	vesicle-associated membrane protein 2 (synaptobrevin 2)	VAMP2	17p13.1
35653_at	G protein pathway suppressor 2	GPS2	17p13
	DNA segment on chromosome 4 (unique) 234 expressed sequence	D4S234E	4p16.3
38653_at	peripheral myelin protein 22	PMP22	17p12-p11.2
1845_at	mitogen-activated protein kinase kinase 4	MAP2K4	17p11.2
33133_at	flightless I homolog (<i>Drosophila</i>)	FLII	17p11.2
34533_at	target of myb1-like 2 (chicken)	TOM1L2	17p11.2
35617_at	mitogen-activated protein kinase 7	MAPK7	17p11.2
36121_at	epsin 2	EPN2	17p11.2
35428_g_at	leucine rich repeat containing 48	LRRC48	17p11.2
40409_at	aldehyde dehydrogenase 3 family, member A2	ALDH3A2	17p11.2
39866_at	ubiquitin specific protease 22	USP22	17p11.2
32181_at	flotillin 2	FLOT2	17q11-q12
616_s_at	thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog, avian)	THRA	17q11.2

FIG. 7C

39783_at	KIAA0100 gene product	KIAA0100	17q11.2
34799_at	intraflagellar transport protein IFT20	IFT20	17q11.2
35846_at	thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-erb-a) oncogene homolog, avian)	THRA	17q11.2
37509_at	cytokine receptor-like factor 3	CRLF3	17q11.2
32259_at	enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)	EZH1	17q21.1-q21.3
36988_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1 (endothelial)	TNFAIP1	17q22-q23
35112_at	regulator of G-protein signalling 9	RGS9	17q23-q24
38666_at	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1(cytohesin 1)	PSCD1	17q25
36519_at	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	ERCC1	19q13.2-q13.3
34847_s_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) beta	CAMK2B	22q12 7p14.3-p14.1
40033_at	mitogen-activated protein kinase 11	MAPK11	22q13.33
1892_s_at			
37060_at	Clone 23695 mRNA sequence		
32554_s_at	transducin (beta)-like 1X-linked	TBL1X	Xp22.3
38435_at	peroxiredoxin 4	PRDX4	Xp22.11
38518_at	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)	SCML2	Xp22
34077_at	chemokine (C-X-C motif) receptor 3	CXCR3	Xq13
35976_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	CITED1	Xq13.1
38527_at	non-POU domain containing, octamer-binding	NONO	Xq13.1
41152_f_at	ribosomal protein L36a	RPL36A	Xq22.1
36491_at	thymosin-like 8	TMSL8	Xq21.33-q22.3
37740_r_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	SLC25A5	Xq24-q26
1201_at	RAB33A, member RAS oncogene family	RAB33A	Xq25
39731_at	RNA binding motif protein, X-linked	RBMX	Xq26.3
37995_s_at	fragile X mental retardation 1	FMR1	Xq27.3
39967_at	leucine zipper, down-regulated in cancer 1	LDOC1	Xq27
171_at	von Hippel-Lindau binding protein 1	VBP1	Xq28
34829_at	dyskeratosis congenita 1, dyskerin	DKC1	Xq28

FIG. 7D

38635_at	signal sequence receptor, delta (translocon-associated protein delta)	SSR4	Xq28
38372_at	chromosome X open reading frame 40 hypothetical LOC541578 protein	CXorf40 LOC541578	Xq28
38373_g_at	chromosome X open reading frame 40 hypothetical LOC541578 protein	CXorf40 LOC541578	Xq28
41403_at	enolase 1, (alpha)	ENO1	1p36.3-p36.2
40774_at	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	SNRPF	12q23.1
33734_at	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	CCT3	1q23
33734_at	chromosome 1 open reading frame 107	C1orf107	1q32.2
35158_at	v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	MYCN	2p24.1
32194_at	CCAAT/enhancer binding protein zeta	CEBPZ	2p22.2
40074_at	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase	MTHFD2	2p13.1
36882_at	homeo box D9	HOXD9	2q31.1
38811_at	5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	ATIC	2q35
38789_at	transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	TKT	3p14.3
33677_at	ribosomal protein L24	RPL24	3q12
37726_at	mitochondrial ribosomal protein L3	MRPL3	3q21-q23
36457_at	guanine monophosphate synthetase	GMPS	3q24
39056_at	phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	PAICS	4pter-q21
33299_at	G protein-coupled receptor 125	GPR125	4p15.31
38751_i_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit e	ATP5l	4p16.3
31631_f_at	pituitary tumor-transforming 2	PTTG2	4p12
39746_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B, 140kDa	POLR2B	4q12
1836_at	cyclin I	CCNI	4q21.1
37619_at	methionyl aminopeptidase 1	METAP1	4q23
1721_g_at	MAD2 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)	MAD2L1	4q27
39883_at	dimethyladenosine transferase	HSA9761	5q11-q14
34736_at	cyclin B1	CCNB1	5q12
40464_g_at	transportin 1	TNPO1	5q13.2
41010_at	homer homolog 1 (Drosophila)	HOMER1	5q14.2

FIG. 7E

1275_at	protein geranylgeranyltransferase type I, beta subunit	PGGT1B	5q22.3
1009_at	histidine triad nucleotide binding protein 1	HINT1	5q31.2
36779_at	fatty acid binding protein 6, ileal (gastrotrypin)	FABP6	5q33.3-q34
38542_at	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	NPM1	5q35
41322_s_at	nucleolar protein family A, member 2 (HACA small nucleolar RNPs)	NOLA2	5q35.3
38094_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	HNRPA1	5q35.3
37471_at	ribonuclease P 40kDa subunit	RPP40	6p25.1
41632_at	E2F transcription factor 3	E2F3	6p22
31749_f_at	histone 1, H2ak	HIST1H2AK	6p22-p21.3
39704_s_at	high mobility group AT-hook 1	HMG1	6p21
40122_at	synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein	SYNCRIP	6q14-q15
31474_r_at	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	TNKS	8p23.1
38341_at	stauferin, RNA binding protein, homolog 2 (Drosophila)	STAU2	8q13-q21.1
41188_at	lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	LAPTM4B	8q22.1
38681_at	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 6 48kDa	EIF3S6	8q22-q23
40827_at	isoleucine-tRNA synthetase	IARS	9q21
33833_at	spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	SPTAN1	9q33-q34
40115_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	ATP5C1	10p15.1
777_at	GDP dissociation inhibitor 2	GDI2	10p15
35307_at	GDP dissociation inhibitor 2	GDI2	10p15
35413_s_at	zinc finger protein 22 (KOX 15)	ZNF22	10q11
37697_s_at	voltage-dependent anion channel 2	VDAC2	10q22
31821_at	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator-related 1	PPRC1	10q24.32
40756_at	nucleophosmin/nucleoplasmin, 3	NPM3	10q24.31
35255_at	Importin 7	IPO7	11p15.4
39700_at	Rho GTPase activating protein 1	ARHGAP1	11p12-q12
35814_at	dendritic cell protein	hfl-B5	11p13
39373_at	fatty acid desaturase 1	FADS1	11q12.2-q13.1
36586_at	aryl hydrocarbon receptor interacting protein	AIP	11q13.3
40744_at	RAD52 homolog (S. cerevisiae)	RAD52	12p13-p12.2
40211_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRPA1	12q13.1
571_at	nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	12q21.2

FIG. 7F

40634_at	nucleosome assembly protein 1-like 1	NAP1L1	12q21.2
37675_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 3	SLC25A3	12q23
37686_s_at	uracil-DNA glycosylase	UNG	12q23-q24.1
38708_at	RAN, member RAS oncogene family	RAN	12q24.3
41033_at	zinc finger protein 84 (HFP2)	ZNF84	12q24.33
37137_at	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	GZMB	14q11.2
2025_s_at	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1	APEX1	14q11.2-q12
37971_at	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1A	BAZ1A	14q12-q13
36060_at	signal recognition particle 54kDa	SRP54	14q13.2
41574_at	pinin, desmosome associated protein	PNN	14q21.1
36435_at	protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform	PPM1A	14q23.1
673_at	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase	MTHFD1	14q24
35284_f_at	chromosome 14 open reading frame 114	C14orf114	14q24.1
35432_at	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 6 homolog (yeast)	MED6	14q24.2
39079_at	enhancer of rudimentary homolog (Drosophila)	ERH	14q24.17q34
39980_at	vaccinia related kinase 1	VRK1	14q32
38967_at	chromosome 14 open reading frame 2	C14orf2	14q32.33
31817_at	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 3	GABRB3	15q11.2-q12
869_at	general transcription factor IIA, 2, 12kDa	GTF2A2	15q22.2
39089_at	non-metastatic cells 4, protein expressed in	NME4	16p13.3
41637_at	dexamethasone-induced transcript	DEXI	16p13.13
1468_at	TNF receptor-associated protein 1	TRAP1	16p13.3
37609_at	nucleotide binding protein 1 (MinD homolog, E. coli)	NUBP1	16p13.13
39418_at	ribosomal L1 domain containing 1	RSL1D1	16p13.13
35297_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1, 8kDa	NDUFAB1	16p12.1
40271_at	nucleoporin 93kDa	NUP93	16q13
39027_at	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1	COX4I1	16q22-qter
37357_at	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	GCSH	16q23.2
31864_at	M-phase phosphoprotein 6	MPHOSPH6	16q23.3
34336_at	lysyl-tRNA synthetase	KARS	16q23-q24
32791_at	hypothetical protein MAC30	MAC30	17q11.2

FIG. 7G

1521_at	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	NME1	17q21.3
39073_at	non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	NME1	17q21.3
37899_at	thymidylate synthetase	TYMS	18p11.32
37432_g_at	protein inhibitor of activated STAT, 2	PIAS2	18q21.1
41778_at	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	SLC1A5	19q13.3
32589_at	chromatin assembly factor 1, subunit A (p150)	CHAF1A	19p13.3
32874_at	transcription factor 3 (E2A immunoglobulin enhancer binding factors E12/E47)	TCF3	19p13.3
36846_s_at	LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	LSM7	19p13.3
36847_r_at	LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	LSM7	19p13.3
1751_g_at	phenylalanine-tRNA synthetase-like, alpha subunit	FARSLA	19p13.2
34291_at	phenylalanine-tRNA synthetase-like, alpha subunit	FARSLA	19p13.2
35588_at	zinc finger protein HIT-40	HIT-40	19p13.2
39729_at	peroxiredoxin 2	PRDX2	19p13.2
40182_s_at	coactivator-associated arginine methyltransferase 1	CARM1	19p13.2
39798_at	ribosomal protein S28	RPS28	19p13.2
35141_at	ribonuclease H2, large subunit	RNASEH2A	19p13.13
149_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 39	DDX39	19p13.12
34401_at	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	UQCRRFS1	19q12-q13.1
36587_at	eukaryotic translation elongation factor 2	EEF2	19pter-q12
34828_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide I, 14.5kDa	POLR2I	19q12
32843_s_at	fibrillarin	FBL	19q13.1
34348_at	serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	SPINT2	19q13.1
39088_at	seven transmembrane domain protein	NIFIE14	19q13.1
39173_at	fibrillarin	FBL	19q13.1
38061_at	ribosomal protein S16	RPS16	19q13.1
32208_at	KIAA0355	KIAA0355	19q13.11
1902_at	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (includes overlapping antisense sequence)	ERCC1	19q13.2-q13.3
33425_at	tripartite motif-containing 28	TRIM28	19q13.4
40619_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	UBE2S	19q13.43
893_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2S	UBE2S	19q13.43
38456_s_at	small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	SNRPB	20p13

FIG. 7H

39677_at	DNA replication complex GINS protein PSF1	PSF1	20p11.21
40821_at	S-adenosylhomocysteine hydrolase	AHCY	20cen-q13.1
34852_g_at	serine/threonine kinase 6	STK6	20q13.2-q13.3
41003_at	prefoldin 4	PFDN4	20q13.2
31863_at	KIAA0179	KIAA0179	21q22.3
36088_at	Down syndrome critical region gene 2	DSCR2	21q22.3
38474_at	cystathionine-beta-synthase	CBS	21q22.3
41869_at	pescadillo homolog 1, containing BRCT domain (zebrafish)	PES1	22q12.1
32671_at			
1178_at			
33475_at			
37520_at	zinc finger protein 330	ZNF330	
723_s_at			
952_at			
958_s_at			

FIG. 71



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201031438

②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.09.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LAVARINO, C., GARCIA, I., MACKINTOSH, C. et al. Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. BMC medical genomics. 13 de Agosto de 2008. Vol 1. Páginas 1-15. ISSN 1755-8794. En especial páginas 1-11 y archivos adicionales 1 y 2.	1-8
A	WO 2010066851 A1 (VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., METSTDAGH, P., SPELEMAN, F. y VERMEULEN, J.) 17.06.2010, ejemplo 2, Tabla 8; reivindicaciones.	1-9
A	FUJITA, T., IGARASHI, J., OKAWA, E. et al. CHD5, a Tumor Suppressor Gene Deleted From 1p36.31 in Neuroblastomas. Journal of the National Cancer Institute. 2 de Julio 2008. Vol 100, Nº 3. Páginas 940-949. ISSN 1460-2105.	1-9
A	ALMGREN, M., HENRIKSSON, C., FUJIMOTO, J. et al. Nucleoside Diphosphate kinase A/nm23-H1 Promotes Metastasis of NB69-Derived Human Neuroblastoma. Molecular Cancer Research. Julio de 2004. Vol 2, Nº 7. Páginas 387-394. ISSN 1541-7786.	1-9
A	OHIRA, M. MOROHASHI, A. INUZUKA, H. et al. Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets. Oncogene. 21 de agosto de 2003. Vol 22, Nº 35. Páginas 5525-5536. ISSN 0950-9232. En especial, páginas 5526-5527 y tabla 4.	1-9

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
07.06.2011

Examinador
A. Barrios de la Fuente

Página
1/5

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

C12Q

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, TXTF, MEDLINE, NPL, XPESP, EMBASE, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 07.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 9	SI
	Reivindicaciones 1-8	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	LAVARINO, C., GARCIA, I., MACKINTOSH, C. et al. Differential expression of genes mapping to recurrently abnormal chromosomal regions characterize neuroblastic tumours with distinct ploidy status. BMC medical genomics. 13 de Agosto de 2008. Vol 1. Páginas 1-15. ISSN 1755-8794.	13.08.2008
D02	WO 2010066851 A1 (VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., METSTDAGH, P., SPELEMAN, F. y VERMEULEN, J.) 17.06.2010	17.06.2010
D03	FUJITA, T., IGARASHI, J., OKAWA, E. et al. CHD5, a Tumor Suppressor Gene Deleted From 1p36.31 in Neuroblastomas. Journal of the National Cancer Institute. 2 de Julio 2008. Vol 100, Nº 3. Páginas 940-949. ISSN 1460-2105.	02.07.2008
D04	ALMGREN, M., HENRIKSSON, C., FUJIMOTO, J. et al. Nucleoside Diphosphate kinase A/nm23-H1 Promotes Metastasis of NB69-Derived Human Neuroblastoma. Molecular Cancer Research. Julio de 2004. Vol 2, Nº 7. Páginas 387-394. ISSN 1541-7786.	07.2004
D05	OHIRA, M. MOROHASHI, A. INUZUKA, H. et al. Expression profiling and characterization of 4200 genes cloned from primary neuroblastomas: identification of 305 genes differentially expressed between favorable and unfavorable subsets. Oncogene. 21 de agosto de 2003. Vol 22, Nº 35. Páginas 5525-5536. ISSN 0950-9232.	21.08.2003

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 predicción de pronóstico en un paciente con Neuroblastoma (NB) que comprende la cuantificación de la expresión de los genes CHD5, PAFAH1B1 y NME1 en una muestra biológica aislada del paciente (Reivindicación 1).

Es objeto también de la presente solicitud un método de respuesta a tratamiento farmacológico que consiste en la cuantificación de la expresión de los genes CHD5, PAFAH1B1 y NME1 en una muestra biológica aislada del paciente antes y después del tratamiento, donde el aumento de los niveles de expresión de CHD5 y PAFAH1B1 y la disminución de los niveles de expresión de NME1 en la muestra obtenida después del tratamiento, es indicativo de buena respuesta al tratamiento. (Reivindicación 5).

La muestra biológica empleada en el método objeto de las reivindicaciones 1 y 5 es tejido tumoral (Reivindicación 2 y 6) con un contenido de célula tumoral viable de al menos un 60% (Reivindicaciones 3 y 7). La cuantificación de los niveles de expresión de CHD5, PAFAH1B1 y NME1 se lleva a cabo por qRT-PCR (Reivindicaciones 4 y 8)

Es igualmente objeto de la solicitud el empleo de los niveles de expresión de los genes CHD5, PAFAH1B1 y NME1 como marcador pronóstico y/o respuesta farmacológica en pacientes con neuroblastoma. (Reivindicación 9)

El documento D01 divulga un estudio en el que se analizan los perfiles de expresión diferencial entre neuroblastomas con diferente nivel de ploidía.

El Documento D02 divulga un método de predicción de pronóstico en neuroblastoma. Este método comprende la cuantificación de los niveles de expresión de los genes CHD5 y NME1, entre otros. La expresión elevada de CHD5 se asocia a neuroblastomas de bajo riesgo mientras que la expresión elevada de NME1 se asocia a Neuroblastomas de alto riesgo. La cuantificación de los niveles de expresión se lleva a cabo mediante qRT-PCR. (Ejemplo 2, Tabla 8 y reivindicaciones).

El documento D03 tiene por objeto un estudio sobre el gen CHD5 en Neuroblastoma. Se concluye que el gen CHD5 actuaría como un gen supresor de tumores, cuya expresión elevada se asocia con un pronóstico favorable.

El documento D04 divulga un estudio sobre la proteína NDPK-A codificada por el gen NME1. Este estudio concluye que la sobreexpresión de NME1 promueve la metástasis en neuroblastoma, y por tanto se asocia a un pronóstico desfavorable.

El documento D05 divulga un estudio sobre la expresión génica diferencial entre 2 grupos; neuroblastomas con características favorables (estadios 1-2) y con características desfavorables (estadios 3-4). Tras el análisis, se encuentran 305 genes diferencialmente expresados entre estos dos grupos, de los cuales 278 presentan una expresión aumentada en el grupo de neuroblastomas con características favorables. Entre estos genes, se encuentra el gen PAFAH1B1.

1.-NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/86)

1.1 Reivindicaciones 1-9:

El objeto de las reivindicaciones 1-9 es nuevo, en el sentido del artículo 6.1 de la Ley de Patentes 11/86.

2.-ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/86)

2.1 Reivindicaciones 1-8:

D01 se considera el documento del estado de la técnica más próximo al objeto de la presente solicitud. En D01 se analiza si existe un perfil de expresión génica diferencial entre 2 grupos de neuroblastomas; neuroblastomas con contenido cuasi-triploide de ADN y cuasi diploide/tetraploide.

El análisis de expresión diferencial comprende la cuantificación de la expresión de los genes CHD5, PAFAH1B1 y NME1. Del estudio se desprende que existe un amplio grupo de genes diferencialmente expresados entre los dos grupos de neuroblastomas, entre los que se encuentran los 3 genes anteriormente mencionados, hallándose la expresión de CHD5 y PAFAH1B1 aumentada en el grupo de neuroblastomas con contenido cuasi-triploides y la del gen NME1 en el grupo de neuroblastomas con contenido cuasi diploide/tetraploide. La expresión de estos genes se cuantifica en primer lugar mediante un microarray de DNA y posteriormente mediante una qRT-PCR. Las muestras de tejido tumoral de pacientes analizadas presentan un contenido de célula tumoral viable mayor del 70%.

Puesto que es conocida en el estado de la técnica la asociación entre el contenido génico cuasi-triploide y el pronóstico favorable (ver D01, pág 2 y 9) , y el contenido génico cuasi diploide/tetraploide con el pronóstico desfavorable (ver D01, Página 2), resultaría evidente para un experto en la materia, el desarrollo de métodos de predicción de pronóstico en pacientes con neuroblastoma que comprendiese la cuantificación de la expresión de genes que se expresan diferencialmente entre ambos grupos, tales como CHD5, PAFAH1B1 y NME1. Por lo tanto, a la luz de las enseñanzas técnicas de D01, el método de predicción de pronóstico objeto de las reivindicaciones 1-4 se considera que no implicaría actividad inventiva para un experto en la materia según el artículo 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.

De la misma forma, el método de evaluación de respuesta a un tratamiento farmacológico, objeto de las reivindicaciones 5-8, que comprende la cuantificación de la expresión de los genes CHD5, PAFAH1B1 y NME1 después de recibir tratamiento farmacológico, se considera que no implica actividad inventiva para un experto en la materia según el artículo 8.1 de la Ley de Patentes 11/86.

2.1 Reivindicación 9:

Por el contrario y en relación con la reivindicación 9, el empleo de los niveles de expresión de los genes CHD5, PAFAH1B1 Y NME1 como marcador pronóstico y/o respuesta farmacológica en pacientes con neuroblastoma, no resultaría obvio para un experto en la materia, ya que no hay información en los documentos citados que puedan dirigir al experto en la materia a seleccionar únicamente estos 3 genes como marcador pronóstico, de entre todos los genes que se encuentran diferencialmente expresados en D01. Por lo tanto, se considera que el objeto de las reivindicación 9, implicaría actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 de la ley de patentes 11/86.