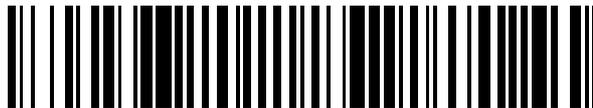


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 068**

21 Número de solicitud: 201330446

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**26.03.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**02.10.2014**

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE  
(50%)**

**Avda. de Córdoba, s/n - Hospital Universitario 12  
de Octubre, Centro de Actividades Ambulatorias,  
6ª planta Bloque D  
28041 Madrid ES y  
FUNDACIÓN CRIS DE INVESTIGACIÓN PARA  
VENCER EL CÁNCER (50%)**

72 Inventor/es:

**MARTÍNEZ LÓPEZ, Joaquín;  
GALLARDO DELGADO, Miguel y  
TOLDOS GONZÁLEZ, Óscar**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Método para el diagnóstico de Trombocitemia esencial y kit para realizarlo**

57 Resumen:

Método para el diagnóstico de Trombocitemia esencial y kit para realizarlo.

La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas y más concretamente de la Trombocitemia esencial JAK2WT, el cual comprende la cuantificación de SERPINB1 mediante inmunohistoquímica, preferiblemente en granulocitos de médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea. El método adicionalmente puede comprender la cuantificación de CD44. La presente invención también se refiere al uso de un kit para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas y más concretamente Trombocitemia Esencial JAK2WT.

ES 2 502 068 A1

**Método para el diagnóstico de Trombocitemia esencial y kit para realizarlo.**

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se refiere a un método para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas y más concretamente de la Trombocitemia esencial JAK2 *Wild Type*, el cual comprende la cuantificación de SERPINB1 de forma independiente o en combinación con CD44, preferiblemente en granulocitos de médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea. La presente invención también se refiere al uso de un kit  
10 para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas y más concretamente Trombocitemia esencial JAK2WT que permite realizar el método indicado. Por tanto la presente invención podría encuadrarse en el campo de la biotecnología y más concretamente en la biomedicina.

15 **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

Las neoplasias mieloproliferativas (NMPs) son trastornos hematológicos crónicos. Este término engloba un conjunto de trastornos los cuales presentan como característica común la hiperproducción de al menos una línea de células sanguíneas. De forma  
20 general estos trastornos cursan con hiperplasia eritroide y/o megacariocítica.

Dentro de estas enfermedades, se encuentra la Trombocitemia Esencial (TE), la cual se debe a una superproducción de células sanguíneas, especialmente de plaquetas en la médula ósea. Esta superproducción provoca la formación de trombos y bloqueos en  
25 los vasos sanguíneos, así como episodios hemorrágicos.

De forma general esta neoplasia mieloproliferativa, ha sido tradicionalmente diagnosticada por exclusión, cuando se manifiesta la ausencia de condiciones reactivas y desordenes clonales que se pueden presentar en la trombocitosis (Beer *et al.* 2011, *Blood*, 117:1472-1482). Aproximadamente el 50% de los casos de TE presentan una mutación en el gen *jak2* (Janus quinasa 2) que provoca la sustitución de una valina por una fenilalanina en la posición 617 de la proteína resultante (JAK2 V617F (Campbell *et al.* 2006, *N Engl. J Med*, 255:2452-2466; Levine *et al.* 2007, *Nat Rev Cancer*, 7:673-683). Por otro lado, las mutaciones MPL están presentes en el 4%

de los casos (Pikman *et al.* 2006, *PLoS Med*, 3:e270; Beer *et al.* 2008, *Blood*, 112: 141-149). Sin embargo en pacientes que no tienen esas mutaciones el diagnóstico de TE tiene que hacerse por exclusión de causas reactivas. La diferenciación de TE de Policitemia Vera (PV) y Mielofibrosis Primaria (MFP) es particularmente problemática.

5 Además cabe destacar que muchos pacientes con neoplasias mieloproliferativas, y más concretamente con TE, son asintomáticos, resulta necesaria la búsqueda de elementos que permitan un rápido y sencillo diagnóstico de la enfermedad para por ejemplo individuos de riesgo.

10 Por otro lado resulta de vital importancia tener un diagnóstico rápido y preciso para poder seleccionar el tratamiento adecuado, ya que este tratamiento depende de diversos criterios de riesgo los cuales a su vez vienen determinados en función del diagnóstico. La neoplasia mieloproliferativa TE JAK2V617F positiva de forma habitual es diagnosticada rápidamente. Sin embargo el diagnóstico de la neoplasia  
 15 mieloproliferativa Trombocitemia Esencial JAK2 wild type en pacientes conlleva un largo tiempo de espera ya que debido a la falta de criterios diagnósticos y elementos que permitan su diagnóstico rápido se requieren seguimientos de entre 3 y 6 meses para confirmar la existencia de hematopoyesis no reactiva. Este retraso provoca un incremento en el riesgo de sucesos hemorrágicos y trombóticos en pacientes de alto  
 20 riesgo (Giona *et al.* 2012, *Blood*, 119:2219-2227; Martínez-Aviles *et al.* 2012, *Ann Hematol*, 91(4):533-541; Ponce *et al.* 2012, *Leuk Res*, 36(1):93-97; Teofili *et al.* 2011, *Blood*, 117(9):2700-2707; Tefferi *et al.* 2010, *Leukemia*, 24:1302-1309).

A pesar de que se han encontrado algunos marcadores moleculares para la  
 25 Trombocitemia esencial JAK2V617F negativa (o trombocitemia esencial WT), como por ejemplo la mutación MPL, estas no son una herramienta diagnóstica útil ya que presenta una baja prevalencia (<5%). Por tanto sigue resultando necesario encontrar marcadores fiables que permitan el diagnóstico de estas enfermedades. Además el diagnóstico de la TE JAK2WT se basa en criterios de exclusión, no habiendo ningún  
 30 criterio positivo de la enfermedad. El diagnóstico se basa en la determinación de trombocitosis, y con una médula ósea compatible mediante un estudio anatómo-patológico excluir el resto de causas de causas de trombocitosis. Por estas razones es necesaria la implementación de nuevas pruebas diagnósticas.

El inhibidor B1 de la serín proteasa de la familia SERPINB humana, promueve la movilidad de las células cancerosas (Tseng *et al.* 2009, *Oral Oncol*, 45: 771-776) y es expresada por los granulocitos. SERPINB1 es más conocido como “*serpin peptidase inhibitor*”, y su función es la de protector ante las endopeptidasas y regulador de  
5 numerosas proteasas: “*Neutrophil proteases elastase*”, Cathepsina G, Proteinasa-3, Quimasa, Quimiotripsina, y Kallikreina-3. Este papel protector le implica en la supervivencia y maduración de los neutrófilos, tanto de sangre periférica como de médula ósea, y especialmente de las series inmaduras de la línea mieloide. También parece jugar un papel protector respecto a la migración y metástasis en algunos  
10 fenómenos neoplásicos, (Tseng *et al.* 2009, *Oral Oncol*, 45: 771-776) aunque otros autores han encontrado justo lo contrario, una sobre-expresión de esta proteína en cánceres con un alto grado de migración y metástasis (Miyata T *et al.* 2002, *J Clin Invest.* 109: 585–93).

15 CD44 es un receptor del ácido hialurónico expresado en la membrana de los granulocitos y participa en la interacción y migración celular. La proteína CD44 es el receptor del ácido hialurónico, y está íntimamente ligado a MMP14, compartiendo función en la remodelación de la matriz extracelular (Tseng *et al.* 2009, *Oral Oncol*, 45: 771-776). El receptor del ácido hialurónico es una proteína ubicua en la mayoría de las  
20 estirpes celulares. Tiene una estrecha relación con proteínas de citoesqueleto y proteínas relacionadas con la adhesión y la remodelación de la matriz celular como las metalo-proteasas.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

25

En la presente invención se describe un método sencillo y preciso de diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas, y más concretamente de Trombocitemia Esencial (TE) JAK2WT (*Wild Type*). Este método ofrece una alternativa para el proceso de diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas. Además el método presenta como  
30 ventaja que permite diagnosticar TE JAK2WT. El método de la presente invención requiere la cuantificación del nivel de expresión de la proteína SERPINB1 de forma independiente o en combinación con la proteína CD44, mediante inmunohistoquímica, y presenta altos niveles de sensibilidad y especificidad. El método permite que un paciente sea diagnosticado como paciente con neoplasia mieloproliferativa,

diferenciándolos así por ejemplo de pacientes con trombocitosis, enfermedad que presenta una sintomatología similar. Por tanto el método de la invención permite clasificar individuos de forma correcta dentro de una patología para poder administrar un tratamiento adecuado diferenciándolos de individuos con otras enfermedades de  
5 sintomatología similar.

Cabe destacar que el método de la invención se lleva a cabo fuera del cuerpo del sujeto en una muestra biológica aislada del mismo.

10 La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa caracterizado porque comprende la cuantificación del nivel de expresión de la proteína SERPINB1 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de un sujeto. La inclusión en el método de la cuantificación del nivel de expresión de la proteína CD44 mediante  
15 inmunohistoquímica permitiría diagnosticar neoplasias mieloproliferativas y más concretamente TE JAK2WT con mayor precisión que utilizando de forma independiente SERPINB1. Además el uso de inmunohistoquímica permite también una mayor precisión que otros métodos conocidos para la medición de los niveles de proteínas como por ejemplo *western-blot* o citoquímica.

20 Se entiende por inmunohistoquímica en la presente invención un procedimiento histopatológico que se basa en la utilización de un anticuerpo específico, el cual forma un complejo con el antígeno que reconoce el cual se aplica a una muestra de tejido o fluido biológico. Este anticuerpo específico puede encontrarse previamente marcado  
25 mediante un enlace químico con una enzima que puede transformar un sustrato en visible, sin afectar la capacidad del anticuerpo de unirse al antígeno, o bien ser reconocido por un segundo anticuerpo el cual es el que se encuentra marcado para hacer visibles los puntos donde el anticuerpo se une al antígeno y por tanto se encuentra este antígeno.

30 En la presente invención se muestran datos de asociación independiente y significativa de la sobreexpresión con respecto a un control de la proteína SERPINB1 con las neoplasias proliferativas y más concretamente con TE JAK2WT.

Así, la presente invención supone una alternativa al diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas y una solución a la necesidad de aportar un método de diagnóstico precoz de TE JAK2WT.

5 Por todo ello, un primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa caracterizado porque comprende la cuantificación del nivel de expresión de la proteína SERPINB1 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de un sujeto. En una  
10 realización preferida de este aspecto de la invención la neoplasia mieloproliferativa se selecciona de la lista que comprende: Policitemia Vera (PV), Mielofibrosis Primaria (MFP), TE JAK2WT o TE JAK2V617F. En una realización más preferida la neoplasia mieloproliferativa es TE JAK2WT. En otra realización preferida en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario utilizado para detectar SERPINB1 es un anticuerpo que reconoce la secuencia SEQ ID NO:3. En una realización más preferida  
15 en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario utilizado para detectar SERPINB1 es HPA018871 SERPINB1 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania).

Se entiende por SERPINB1 en la presente invención al inhibidor B1 de la serpin proteasa de la familia SERPINB humana. Este péptido también es conocido como  
20 "*serpin peptidase inhibitor*" y presenta como función actuar como protector ante las endopeptidasas participar como regulador de numerosas proteasas como por ejemplo "*Neutrophil proteases elastase*", Catepsina G, Proteinasa-3, Quimasa, Quimiotripsina, y Kallikreina-3. Este péptido SERPINB1 puede presentar por ejemplo, aunque sin limitarse una identidad de al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, más  
25 preferiblemente al menos un 95%, aun más preferiblemente la secuencia SEQ ID NO:1.

Se entiende por CD44 en la presente invención al receptor del ácido hialurónico expresado en la membrana de los granulocitos el cual participa en la interacción y  
30 migración celular de dichos granulocitos. Este péptido CD44 puede presentar por ejemplo, aunque sin limitarse una identidad de al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, aun más preferiblemente la secuencia SEQ ID NO:2.

Se entiende por “diagnóstico” en la presente invención, la determinación de la presencia o ausencia de una neoplasia mieloproliferativa en un sujeto, de forma preferible Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, TE JAK2WT o TE JAK2V617F, y de forma más preferible TE JAK2WT.

5

El término “muestra biológica” en la presente invención se refiere a cualquier muestra que permita medir los niveles de expresión de la proteína SERPINB1 o de SERPINB1 y CD44 mediante inmunohistoquímica del individuo del que se ha obtenido dicha muestra, e incluye, pero sin limitarnos, tejidos y/o fluidos biológicos de un individuo, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Existen muestras biológicas que no son útiles para tal fin como por ejemplo la sangre periférica. Estudios hechos en esta muestra, a pesar de que presentan granulocitos, demuestra que no es posible determinar adecuadamente las células y por ello la determinación mediante inmunohistoquímica de los niveles de expresión de la proteína SERPINB1 o de SERPINB1 y CD44. La muestra biológica de forma preferible podría ser, por ejemplo, pero sin limitarse, médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea. Dentro de estas muestras biológicas una de las que presenta mayor utilidad es la médula ósea ya que es de fácil obtención y presenta gran cantidad de granulocitos, el cual es el lugar de expresión de SERPINB1 y CD44, y por tanto donde es más sencilla la cuantificación de los marcadores de interés de la invención. Además la médula ósea es el tejido preferentemente afecto en estas enfermedades por lo que es de especial utilidad en la determinación de los niveles de expresión de la proteína SERPINB1 o de SERPINB1 y CD44. Por todo lo descrito, en una realización preferida de este primer aspecto de la invención, la muestra biológica aislada es médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea. En una realización más preferida la muestra biológica aislada es médula ósea.

Por otro lado la muestra biológica puede ser, por ejemplo, pero sin limitarse, fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina. Resulta de especial relevancia que la muestra se encuentra fijada y embebida en parafina ya que es el formato más adecuado para llevar a cabo la inmunohistoquímica. Por todo ello, en una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina. En una realización más preferida a muestra biológica es fijada y embebida en parafina.

Se entiende por "sujeto" en la presente invención aquel individuo susceptible de padecer neoplasias mieloproliferativas. El sujeto al que se refiere puede ser un humano, pero también un mamífero no humano, como por ejemplo, pero sin limitarse, roedores, rumiantes, felinos o cánidos. La presente invención presenta especial  
5 utilidad en el diagnóstico cuando el sujeto es un humano. Por ello, en otra realización preferida, el sujeto del cual procede la muestra biológica aislada es un mamífero. En una realización más preferida, el mamífero es un humano.

10 Se entiende por "neoplasia mieloproliferativa" en la presente invención una proliferación clonal de los progenitores de la médula ósea que produce un exceso de elementos maduros hematopoyéticos en la sangre periférica

Se entiende por "Policitemia Vera" en la presente invención una neoplasia  
15 mieloproliferativa en que hay principalmente un aumento de eritrocitos.

Se entiende por "Mielofibrosis Primaria" o "MFP" en la presente invención una neoplasia mieloproliferativa en que hay fundamentalmente una fibrosis de la médula ósea.  
20

Se entiende por "Trombocitemia Esencial JAK2WT", "TE JAK2V617F negativa", "TEWT" o "TE JAK2WT" en la presente invención una neoplasia mieloproliferativa en que hay un aumento principalmente de los megacariocitos y plaquetas en la que no existe la mutación JAK2V617F.  
25

Se entiende por "Trombocitemia Esencial JAK2V617F" o "Trombocitemia Esencial JAK2V617F positiva" en la presente invención una neoplasia mieloproliferativa en que hay un aumento principalmente de los megacariocitos y plaquetas en la que está presente la mutación JAK2V617F.  
30

Se entiende por "sensibilidad" de una prueba diagnóstica a la probabilidad de obtener un resultado positivo cuando el individuo padece la enfermedad. Mide su capacidad para detectar la característica estudiada cuando está presente.

Se entiende por "especificidad" de una prueba diagnóstica la probabilidad de obtener un resultado negativo cuando el individuo no tiene la enfermedad.

5 En la presente invención también se muestra que la inclusión de la cuantificación del nivel de expresión del marcador CD44 junto a la cuantificación de SERPINB1, presenta una mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas y más concretamente para TE JAK2WT que la cuantificación exclusivamente de SERPINB1. Por ello, una realización preferida del primer aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico  
10 de una neoplasia mieloproliferativa caracterizado porque comprende la cuantificación del nivel de expresión de la proteína SERPINB1 y de la proteína CD44 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de un sujeto.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para el diagnóstico de una  
15 neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente seleccionada de la lista que comprende Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, TE JAK2WT o TE JAK2V617F y más preferiblemente TE JAK2WT de un sujeto que comprende las siguientes etapas:

- 20 a. cuantificar el nivel de expresión de la proteína SERPINB1 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de un sujeto,
- b. comparar el valor obtenido en (a) con un valor estándar.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada es médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea. En una realización más  
25 preferida la muestra biológica aislada es médula ósea.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la muestra biológica aislada es fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina. En una realización más preferida a muestra biológica es fijada y embebida en parafina.  
30

En otra realización preferida en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario utilizado para detectar SERPINB1 es un anticuerpo que reconoce la secuencia SEQ ID NO:3. En una realización más preferida en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario

utilizado para detectar SERPINB1 es HPA018871 SERPINB1 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania).

5 La expresión “cuantificar el nivel de expresión” tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a la medida de la cantidad de proteína presente en una muestra biológica. La cuantificación se realiza mediante inmunohistoquímica y cuantificación de la cantidad e intensidad de la tinción en la muestra biológica teñida. La cuantificación se puede llevar a cabo tanto de forma manual mediante la visualización mediante patólogos expertos que puedan determinar la positividad de las células con respecto a  
10 la tinción utilizada. La cuantificación también se puede llevar a cabo mediante herramientas informáticas que permitan establecer un límite a partir del cual la tinción de un granulocito se considere positiva, o de forma totalmente automatizada mediante diversas herramientas informáticas que permiten determinar la intensidad de tinción de la muestra biológica.

15

Se entiende por “valor estándar” cualquier valor o rango de valores derivado de la cuantificación de las proteínas incluidas en el método de la invención en una muestra biológica control procedente de un individuo sano o en una mezcla de muestras biológicas derivadas de un grupo control. La presente invención presenta especial  
20 utilidad para poder diagnosticar pacientes con neoplasias mieloproliferativas de pacientes que presentan enfermedades con similar sintomatología como pueden ser las trombocitosis. Por ello, el término valor estándar en la presente invención también se refiere a cualquier valor o rango de valores derivado de la cuantificación de las proteínas incluidas en el método de la invención en una muestra biológica control  
25 procedente de un individuo o grupo de individuos que presentan una enfermedad con una sintomatología similar a las neoplasias mieloproliferativas y preferiblemente a TE JAK2WT pero que no presentan dichas enfermedades. De forma preferible la enfermedad con sintomatología similar a las neoplasias mieloproliferativas es trombocitosis.

30

En la presente descripción, se entiende por “grupo control”, un grupo de individuos sanos, preferiblemente de la misma o similar edad que el sujeto estudiado, del cual se han obtenido valores o rangos de valores de expresión en una colección de muestras biológicas procedentes de dichos individuos sanos, y que son representativos de la

población en la que se va a aplicar el método de la invención. La cuantificación del nivel de expresión de las proteínas se ha de realizar de la misma forma, y ser obtenida a partir del mismo tipo de muestra biológica aislada que la procedente del sujeto a estudiar en el paso (a) del método de la invención.

5

Se entiende por “sano”, “individuo sano” o “sujeto sano” en la presente invención aquel sujeto o individuo que no padece una neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente PV, MFP, TE JAK2WT o TE JAK2V617F, y más preferiblemente TE JAK2WT.

10 Se entiende por “población sana” en la presente invención, un conjunto de individuos o sujetos que no padece una neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente PV, MFP, TE JAK2WT o TE JAK2V617F, y más preferiblemente TE JAK2WT.

15 Se entiende por “individuos sanos representativos de la población en la que se va a aplicar el método de la invención” aquellos sujetos que no padecen neoplasias mieloproliferativas, en el momento de la extracción de la muestra biológica aislada a analizar y que como grupo tienen un patrón similar en cuanto a por ejemplo, aunque sin limitarnos, raza, edad o distribución por género, que la población de pacientes o sujetos a los que se va a aplicar el método de la invención.

20

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere pero no se limita, a la comparación del nivel de expresión de las proteínas incluidas en el método de la invención cuantificado en la muestra biológica del paso (a) con un valor estándar. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente  
25 invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el método de la invención además comprende:

30 c. asignar al sujeto del paso (a) al grupo de pacientes que padecen una neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente seleccionada de la lista que comprende Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, TE JAK2WT o TE JAK2V617F y más preferiblemente TE JAK2WT cuando el valor obtenido en el paso (a) es significativamente mayor que el valor estándar del paso (b).

Una cantidad significativamente mayor que un valor estándar en la presente invención puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, como por ejemplo, aunque sin limitarse, mediante análisis de Kruskal-Wallis.

Como se demuestra en los ejemplos, la determinación tanto de SERPINB1 como de CD44 de forma conjunta presenta una mayor especificidad para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas, y más concretamente de TE JAK2WT que SERPINB1 de forma individual. Por todo ello, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere a un método para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente seleccionada de la lista que comprende Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, TE JAK2WT o TE JAK2V617F y más preferiblemente TE JAK2WT, de un sujeto que comprende las siguientes etapas:

- a. cuantificar el nivel de expresión de la proteína SERPINB1 y CD44 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de un sujeto, preferiblemente médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea, y más preferiblemente médula ósea, y
- b. comparar los valores obtenidos en (a) con unos valores estándar.

En una realización más preferida, el método además comprende:

- c. asignar al sujeto del paso (a) al grupo de pacientes que padecen una neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente seleccionada de la lista que comprende Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, TE JAK2WT o TE JAK2V617F y más preferiblemente TE JAK2WT cuando los valores obtenidos en el paso (a) de SERPINB1 y CD44 son significativamente mayores que los valores estándar del paso (b).

La muestra biológica, preferiblemente médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea, y más preferiblemente médula ósea puede ser fresca, congelada, fijada o fijada y embebida en parafina, y preferiblemente fijada y embebida en parafina.

En otra realización más preferida en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario utilizado para detectar SERPINB1 es un anticuerpo que reconoce la secuencia SEQ ID NO:3. En una realización más preferida en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario utilizado para detectar SERPINB1 es HPA018871 SERPINB1 (Sigma Aldrich,  
5 Steinheim, Alemania).

Los métodos incluidos en la presente invención pueden incluir adicionalmente un paso en el cual si se determina que el paciente presenta una neoplasia mieloproliferativa, se determine el tratamiento para el paciente. En el caso de las neoplasias  
10 mieloproliferativas, este tratamiento puede ser por ejemplo, aunque sin limitarse, hidroxiurea en personas con riesgo trombótico o de sangrado y antiagregación.

El método de la invención puede ser realizado de forma manual mediante un técnico, o puede llevarse a cabo de forma totalmente automatizada. Esta forma automatizada se  
15 puede realizar mediante un equipo o dispositivo médico-sanitario electromecánico compuesto por tecnología mecánica, eléctrica, electromecánica, electrónica, hidráulica, óptica (escáner, laser), ondas, radiofrecuencia y cuyos elementos físicos son bombas, centrífugas, sensores, detectores, transductores y/o software de control y monitorización. El método también se puede realizar en un dispositivo medico sanitario  
20 desechable el cual es un equipo que puede ir unido y conectado o por separado al equipo electromecánico.

Cualquiera de los métodos descritos en la presente invención, pueden comprender, además de la determinación SERPINB1 o SERPINB1 y CD44, la determinación de  
25 otras variables clínicas de interés, como por ejemplo, aunque sin limitarse, edad, sexo, respuesta posterior, cifra de plaquetas y presencia de fenómenos trombóticos o de sangrado.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende anticuerpos  
30 específicos para SERPINB1 para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente seleccionada de la lista que comprende Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, Trombocitemia Esencial JAK2WT o Trombocitemia Esencial JAK2V617F y más preferiblemente Trombocitemia Esencial JAK2WT. Una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de un kit que comprende anticuerpos

específicos para SERPINB1 y CD44 para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa, preferiblemente seleccionada de la lista que comprende Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, Trombocitemia Esencial JAK2WT o Trombocitemia Esencial JAK2V617Fy más preferiblemente Trombocitemia Esencial JAK2WT. En otra  
5 realización preferida en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario utilizado para detectar SERPINB1 es un anticuerpo que reconoce la secuencia SEQ ID NO:3. En una realización más preferida en la inmunohistoquímica el anticuerpo primario utilizado para detectar SERPINB1 es HPA018871 SERPINB1 (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). En otra realización preferida el anticuerpo específico para CD44 es CD44  
10 humano pan-específico (R&D, Minneapolis, MN, USA).

Los kits utilizados para el diagnóstico pueden comprender todos aquellos reactivos necesarios para determinar la cantidad de la proteína SERPINB1 sola o SERPINB1 y CD44 mediante inmunohistoquímica como, por ejemplo, pero sin limitarse, anticuerpos  
15 específicos de la proteína SERPINB1, anticuerpos específicos de la proteína CD44, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, medios de fijación de muestras, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos  
20 los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus  
25 variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

30

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Fig. 1:** Representa los resultados de la tinción por inmunohistoquímica de granulocitos de medula ósea en pacientes control, y pacientes de Policitemia Vera (PV), TE

JAK2V617F, TE JAK2WT y PMF para (A) CD44 y (B) SERPINB1.

**Fig. 2:** Representa curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic* o Característica Operativa del Receptor) de los resultados de inmunohistoquímica de CD44 en  
5 pacientes de Trombocitemia Esencial JAK2WT frente a un grupo control (A) y de SERPINB1 en pacientes de neoplasias proliferativas frente a un grupo control (B).

## EJEMPLOS

10 A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la utilidad del método de la invención.

### Materiales y métodos:

- Pacientes:

15 Los pacientes diagnosticados con neoplasias mieloproliferativas y los controles sanos (medula ósea sana y no infiltrada, libre de patología reactiva y enfermedad neoplásica) se reclutaron para el estudio en Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España para la fase de *screening*, y del Hospital del Mar (Barcelona, España) y de Guadalajara (Guadalajara, España) para la fase de validación.

20

El diagnóstico de la neoplasia mieloproliferativa se estableció en función de los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2001/2008 o los criterios del grupo de estudio de Policitemia Vera. Los datos clínicos, incluidos los parámetros hematológicos, presencia de hipertrofia de bazo o hígado, incidentes hematológicos,  
25 características de la enfermedad y detalles del tratamiento fueron registrados. El *screening* mutacional para JAK2V617F se llevó a cabo mediante RT-PCR en el DNA de sangre periférica según el método descrito en Rapado *et al.* 2008, *Ann Hematol.*; 87:741-749.

30 - Inmunohistoquímica. (IHC)

La inmunohistoquímica de médula ósea se llevó a cabo en el Hospital 12 de Octubre. Las biopsias de médula ósea se fijaron en formalina y embebidas en parafina. La tinción inmunohistoquímica se llevó a cabo en secciones de tejido de 4 µm de grosor. La tinción de inmunohistoquímica se realiza en un aparato BON MAX (Leica) usando

5 sus propios tampones y anticuerpo secundario polímero marcado con peroxidasa y revelado con diaminobencidina. Para la tinción de las respectivas moléculas se usan los siguientes anticuerpos: anticuerpo CD44 humano pan-específico (R&D, Minneapolis, MN, USA), anticuerpo monoclonal de ratón IgG2A clon 2C5 (dilución 1/8000), (R&D, Minneapolis, MN, USA) y HPA018871 SERPINB1 (1/1200) (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania). Tras la incubación, la inmunodetección se llevó a cabo usando el método de visualización DAKO EnVision (Dako, Glostrup, Dinamarca), con diaminobenzidina como sustrato cromogénico. En las secciones se utilizó hematoxilina como colorante de contraste. La inmunotinción fue evaluada por dos patólogos diferentes, usando el porcentaje de granulocitos y la intensidad de tinción como criterios. Solo la tinción intensa citoplásmica fue considerada positiva. Una muestra fue considerada positiva para CD44 cuando un número superior al 3% de granulocitos fueron positivos a la tinción. Por otro lado una muestra fue positiva para SERPINB1 cuando un número superior al 88% de los granulocitos fueron positivos a la tinción.

15

- Análisis estadísticos.

Los datos de la inmunohistoquímicas fueron analizados utilizando el test de Mann-Whitney para valorar los porcentajes de positividad (la significación estadística se definió como  $P < 0,05$ ) y curvas ROC para establecer el valor de positivo o negativo de CD44 y SERPINB1 (*Receiver Operating Characteristic* o Característica Operativa del Receptor).

20

## Resultados

- Pacientes

25 El estudio incluyó 152 pacientes diagnosticados con neoplasias mieloproliferativas (66 TEJAK2WT, 20 TEJAK2V617F, 30PV, 19PMF y 17 TE sin clasificar) y 13 controles.

### Expresión diferencial de CD44 y SERPINB1

- Fase de *screening*

30 La fase de screening incluía datos de 12 pacientes de PV, 10 de TE JAK2V617F, 13 de TEJAK2WT, 11 de PMF y 11 individuos control. La expresión en granulocitos de medula ósea de CD44 fue similar para PV, TE JAK2V617F positiva, PMF y muestras control (mediana de granulocitos positivos para CD44: 3% [rango, 0,5–5%], 1% [rango, 2–95%], 2% [rango, 0–40%], 2% [rango, 0–70%], respectivamente). Sin embargo, TE

JAK2WT mostró una fuerte sobreexpresión de CD44 (mediana de granulocitos positivos para CD44: 80% [rango, 2–95%]), mostrando diferencias significativas con respecto a PV, JAK2V617F positiva TE, PMF y controles (P = 0,001) (Figura 1A).

5 La expresión de SERPINB1 en médula ósea fue significativamente mayor para muestras de PV, TE JAK2V617F, TE JAK2WT y PMF (mediana de granulocitos positivos: 95% [rango, 60–99%], 67% [rango, 5–99%], 98% [rango, 3–98%] y 98% [rango, 3–98%], respectivamente) en comparación con los controles (mediana de granulocitos positivos: 20% [rango, 2–99%]) (P = 0,03) (Figure 1B).

10

- Fase de validación

La fase de validación incluyó datos de 18 pacientes de PV, 10 de TE JAK2V617F, 17 de TE sin clasificar, 53 de TE JAK2WT, 8 de PMF y 2 sujetos control. Dado que con 2 controles no se podía llevar a cabo el análisis estadístico adecuado, se incluyeron en  
15 la fase de validación además los 11 controles utilizados en la fase de *screening*.

La expresión en granulocitos de medula ósea de CD44 fue similar para PV, TE JAK2V617F positiva, controles y muestras PMF (mediana de granulocitos positivos para CD44: 3,5% [rango, 0,5–80%], 5% [rango, 0,5–70%], 2% [rango, 0–40%], 2% [0-  
20 70%], respectivamente).

La expresión de CD44 fue significativamente mayor en muestras de TE JAK2WT (mediana de granulocitos positivos para CD44: 10% [rango, 0–95%]), con respecto a PV, TE JAK2V617F positiva y muestras control (P = 0,027) (Figura 2A).

25

De nuevo, el patrón de expresión de SERPINB1 en medula ósea fue significativamente mayor en muestras PV, TE JAK2V617F, TE JAK2WT y PMF (mediana de granulocitos positivos: 95% [rango, 1–99%], 80% [rango, 1–99%], 95% [rango, 1–95%] y 90% [rango, 3–98%], respectivamente) en comparación con los controles (mediana de  
30 granulocitos positivos: 20% [rango, 2–99%]) (P = 0,009) (Figura 2B). En general los resultados obtenidos en la fase de validación se correspondían con los obtenidos en la fase de *screening* a pesar de llevarse a cabo en diferentes grupos de pacientes.

Correlación entre las características clínicas y de laboratorio y los resultados inmunohistoquímicos:

La expresión de CD44 y SERPINB1 evaluada por inmunohistoquímica no se vio influenciada por variables clínicas y de laboratorio (edad, sexo, respuesta posterior, cifra de plaquetas y presencia de fenómenos trombóticos o de sangrado) analizadas en este estudio, indicando el potencial de ambas proteínas como buenas herramientas diagnósticas (Tablas 1-9).

10 Tabla 1: TE JAK2<sup>WT</sup> fase de *screening*

	SERPINB1 negativo	SERPINB1 positivo	Total
Controles	9	2	11
TE JAK2WT	6	7	13
Total	15	9	24

Sensibilidad: 54; Especificidad: 82; PPV: 78; NPV: 60.

Tabla 2: TE JAK2<sup>WT</sup> fase de *screening*

	CD44 negativo	CD44 positivo	Total
Controles	4	7	11
TE JAK2WT	2	11	13
Total	6	18	24

Sensibilidad: 84; Especificidad: 36; PPV: 61; NPV: 67.

15

Tabla 3: TE JAK2<sup>WT</sup> fase de *screening*

	SERPINB1 y CD44 negativo (Modelo -)	SERPINB1 y CD44 positivo (Modelo +)	Total
Controles	10	1	11
TE JAK2WT	7	6	13
Total	17	7	24

Sensibilidad: 46; Especificidad: 91; PPV: 86; NPV: 60.

Tabla 4: TE JAK2<sup>WT</sup> fase de validación

	SERPINB1 negativo	SERPINB1 positivo	Total
Controles	10	3	13
TE JAK2WT	9	44	53
Total	19	47	66

Sensibilidad: 83; Especificidad: 77; PPV: 94; NPV: 53.

Tabla 5: TE JAK2<sup>WT</sup> fase de validación

	CD44 negativo	CD44 positivo	Total
Controles	5	8	13
TE JAK2WT	14	39	53
Total	19	47	66

Sensibilidad: 74; Especificidad: 39; PPV: 83; NPV: 26.

5

Tabla 6: TE JAK2<sup>WT</sup> fase de validación

	SERPINB1 y CD44 negativo (Modelo -)	SERPINB1 y CD44 positivo (Modelo +)	Total
Controles	10	3	13
TE JAK2WT	9	44	53
Total	19	47	66

Sensibilidad: 64; Especificidad: 92; PPV: 97; NPV: 39.

Tabla 7: Todas las neoplasias mieloproliferativas (fase de *screening* y validación)

	SERPINB1 negativo	SERPINB1 positivo	Total
Controles	10	3	13
Neoplasias mieloproliferativas	48	91	139
Total	58	94	152

10 Sensibilidad: 66; Especificidad: 78; PPV: 97; NPV: 18.

Tabla 8: Todas las neoplasias mieloproliferativas

	CD44 negativo	CD44 positivo	Total
--	---------------	---------------	-------

Controles	5	8	13
Neoplasias mieloproliferativas	42	97	139
Total	47	105	152

Sensibilidad: 71; Especificidad: 38; PPV: 92; NPV: 11.

Tabla 9: Todas las neoplasias mieloproliferativas

	SERPINB1 y CD44 negativo (Modelo -)	SERPINB1 y CD44 positivo (Modelo +)	Total
Controles	12	1	13
Neoplasias mieloproliferativas	64	75	139
Total	76	76	152

Sensibilidad: 54; Especificidad: 92; PPV: 99; NPV: 16.

5

Estableciendo un modelo diagnóstico para TE JAK2WT basado en inmunohistoquímica de CD44 y SERPINB1.

Para desarrollar un modelo inmunohistoquímico para el diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas se llevaron a cabo dos análisis de curvas ROC, uno comparando los resultados para CD44 por inmunohistoquímica entre TE JAK2WT y los controles (Figura 2A, área bajo la curva 0,69), y uno que comparó los resultados para SERPINB1 por inmunohistoquímica entre neoplasias mieloproliferativas (PV, TE JAK2WT, TE JAK2V617F positiva y PMF) y controles (área bajo la curva 0,73; Figura 2B).

15

TE JAK2WT fue predicho por una expresión > 3% de CD44 y > 88% de SERPINB1. Estos puntos de corte fueron utilizados para desarrollar un modelo diagnóstico.

20

La especificidad, sensibilidad, y valores diagnósticos positivo y negativo para los modelos cuando se utilizaron para diagnosticar TE JAK2WT y neoplasias proliferativas se muestran en las tablas 1-9; en resumen, el modelo para diagnosticar TE JAK2WT tenía un 97% PPV (*positive predictive value* o valor diagnóstico de un resultado positivo) y un 39% NPV (*negative predictive value* o valor diagnóstico de un resultado

negativo), con un 64% de sensibilidad y un 92% de especificidad. Tanto en la fase de *screening* como de validación, la inmunohistoquímica de SERPINB1 tenía una alta especificidad y una buena sensibilidad, las cuales incrementaban si se combinaban con CD44. Los datos demuestran que SERPINB1 es un buen marcador diagnóstico  
5 para neoplasias mieloproliferativas y más concretamente para TE JAK2WT, y que la combinación de SERPINB1 y CD44 mejora la especificidad del uso de SERPINB1 de forma independiente y más concretamente para TE JAK2WT.

## REIVINDICACIONES

1. Un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa caracterizado porque comprende la cuantificación del nivel de expresión de la proteína SERPINB1 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea de un sujeto.  
5
2. Método según la reivindicación 1, en el que además se cuantifica el nivel de expresión de la proteína CD44 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea de un sujeto.  
10
3. Un método para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa de un sujeto que comprende las siguientes etapas:  
15
  - a. cuantificar el nivel de expresión de la proteína SERPINB1 mediante inmunohistoquímica en una muestra biológica aislada de médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea de un sujeto,
  - b. comparar el valor obtenido en (a) con un valor estándar.
- 20
4. Método según la reivindicación 3 que además comprende:
  - c. asignar al sujeto del paso (a) al grupo de pacientes que padecen una neoplasia mieloproliferativa cuando el valor obtenido en el paso (a) es significativamente mayor que el valor estándar del paso (b).
- 25
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4 que además comprende la cuantificación del nivel de expresión de CD44.
6. Método según la reivindicación 5 donde la asociación del sujeto al grupo de pacientes que padecen una neoplasia mieloproliferativa se produce cuando el valor obtenido de CD44 es significativamente mayor que el valor estándar.  
30
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 donde el valor estándar es el nivel de expresión de la proteína SERPINB1 y/o CD44 en una muestra biológica

aislada de un sujeto sano o una media de los niveles de expresión de la proteína SERPINB1 y/o CD44 en muestras biológicas aisladas de varios pacientes sanos.

- 5 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6 donde el valor estándar es el nivel de expresión de la proteína SERPINB1 y/o CD44 en una muestra biológica aislada de médula ósea, coágulo o aspirado de médula ósea de un sujeto que padece una trombocitosis.
- 10 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 donde la neoplasia mieloproliferativa se selecciona de la lista que comprende Policitemia Vera, Mielofibrosis Primaria, Trombocitemia Esencial JAK2WT o Trombocitemia Esencial JAK2V617F.
- 15 10. Método según la reivindicación 9 donde la neoplasia mieloproliferativa es Trombocitemia Esencial JAK2WT.
- 20 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 donde el anticuerpo primario para SERPINB1 es HPA018871 SERPINB1.
- 20 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 donde el sujeto es un humano.
- 25 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 donde la muestra biológica aislada es médula ósea.
14. Uso de un kit que comprende anticuerpos específicos para SERPINB1 para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa.
- 30 15. Uso de un kit según la reivindicación 14 que además comprende anticuerpos específicos para CD44 para el diagnóstico de una neoplasia mieloproliferativa.
16. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 ó 15 donde la neoplasia mieloproliferativa se selecciona de la lista que comprende Policitemia Vera,

Mielofibrosis Primaria, Trombocitemia Esencial JAK2WT o Trombocitemia Esencial JAK2V617F.

17. Uso según la reivindicación 16 donde la neoplasia mieloproliferativa es  
5 Trombocitemia Esencial JAK2WT.

18. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17 donde el anticuerpo primario para SERPINB1 es HPA018871 SERPINB1.

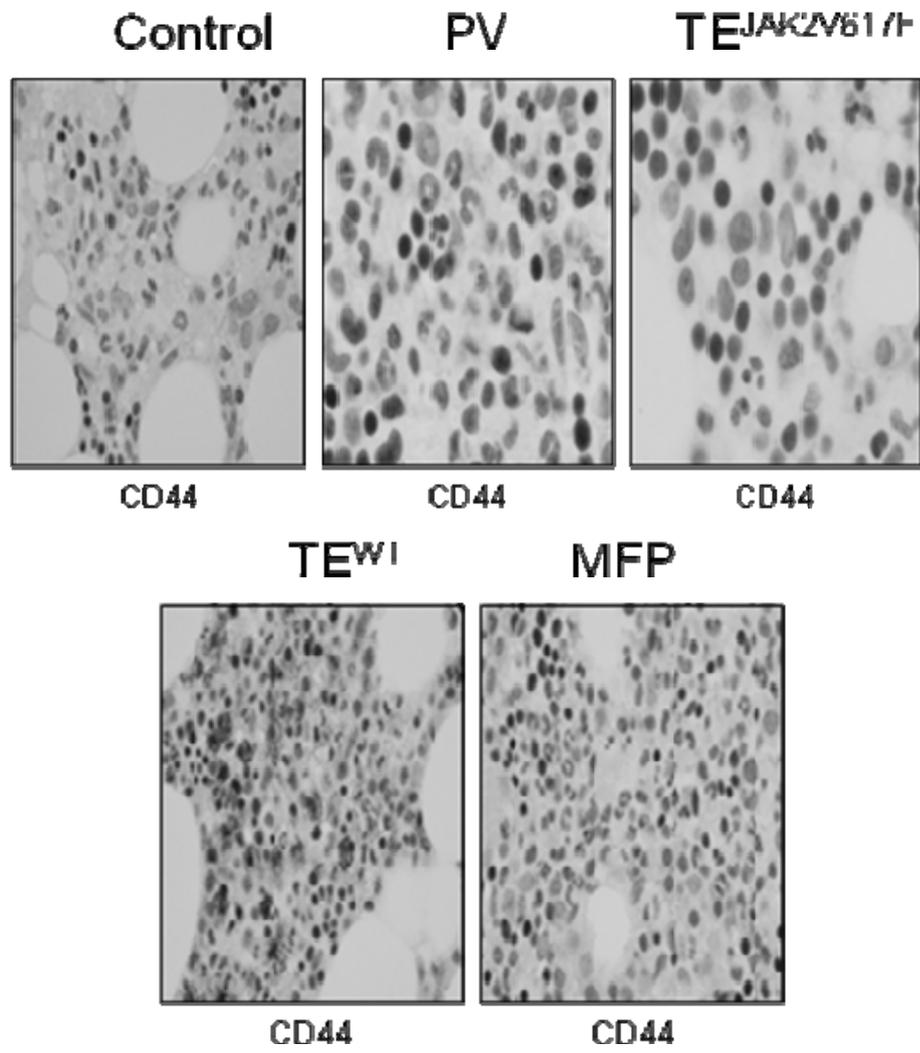
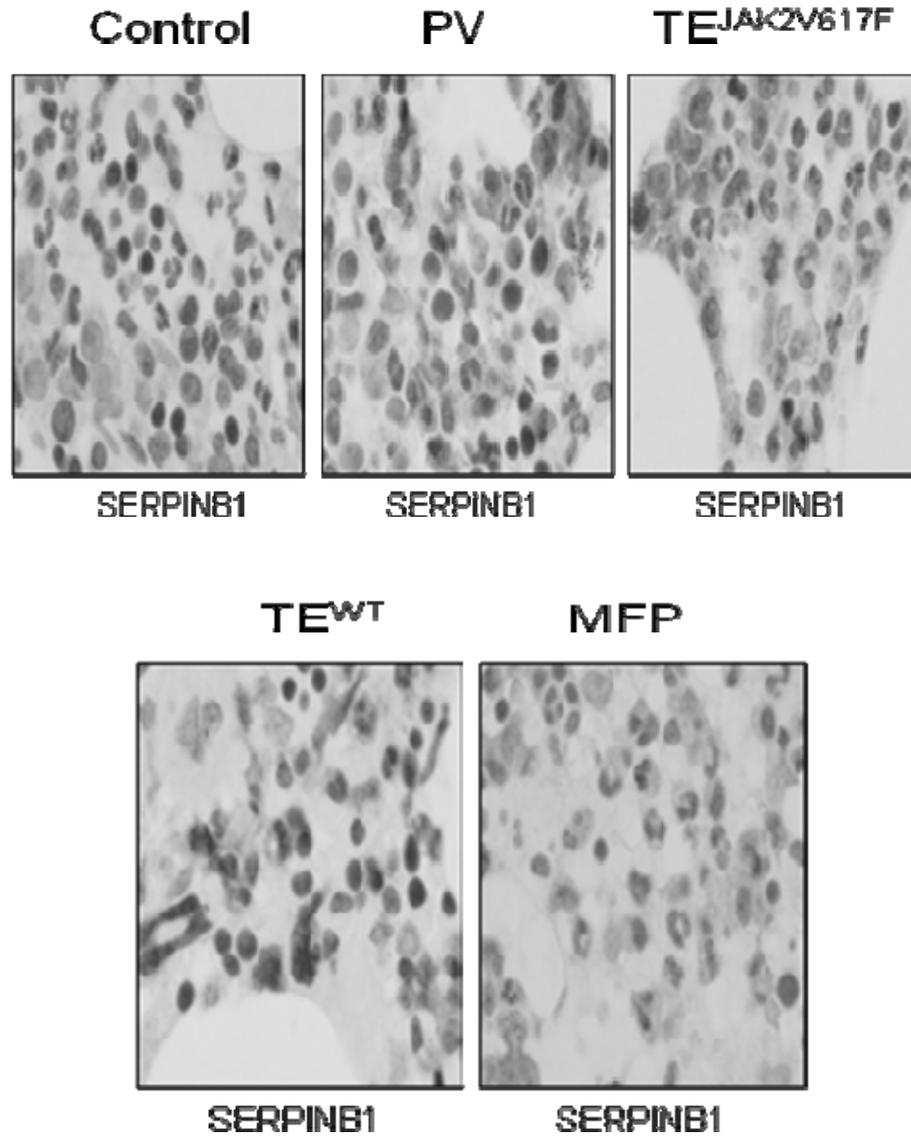


FIG. 1A



**FIG. 1B**

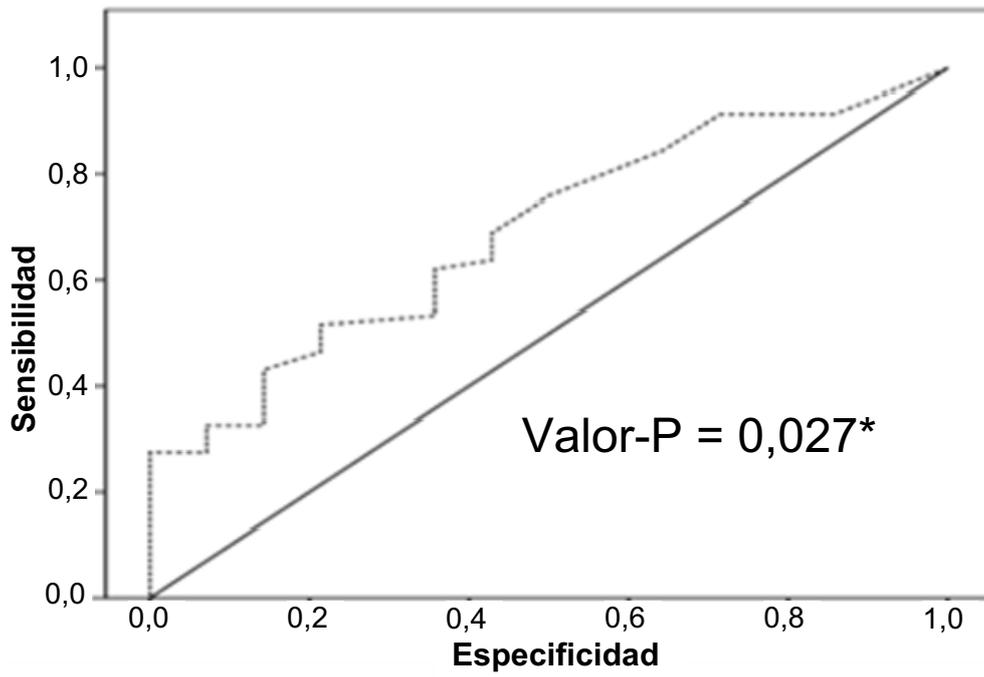


FIG. 2A

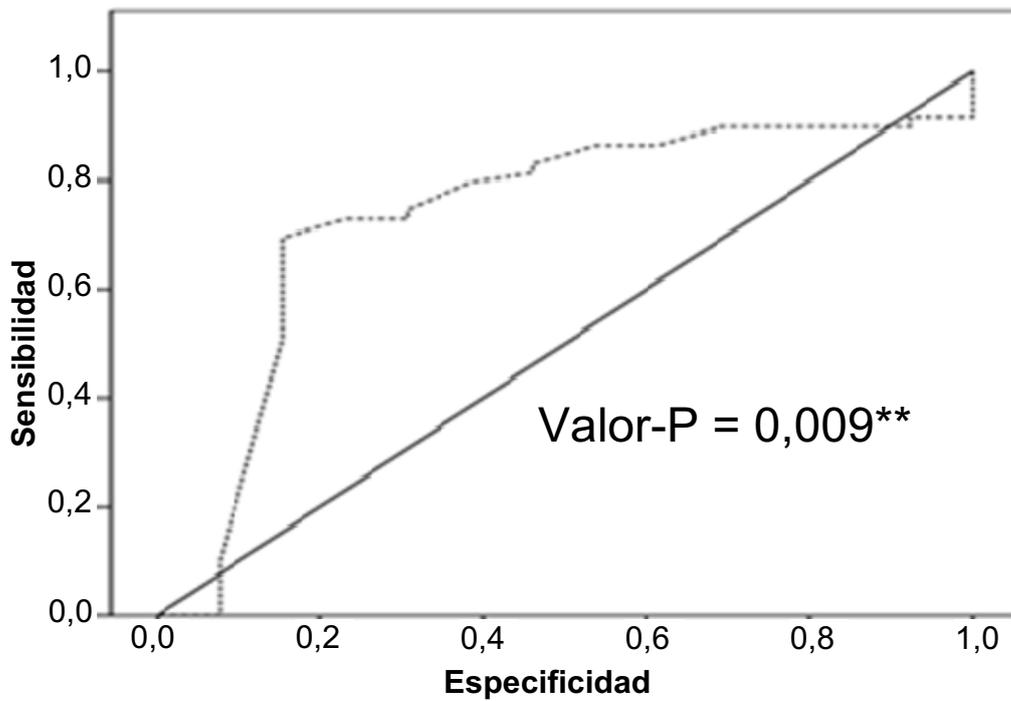


FIG. 2B

# ES 2 502 068 A1

## LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE  
FUNDACION CRIS DE INVESTIGACIÓN PARA VENCER EL CANCER
- <120> Método para el diagnóstico de Trombocitemia esencial y kit para realizarlo.
- <130> ES2535.3
- <160> 3
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 379
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Glu Gln Leu Ser Ser Ala Asn Thr Arg Phe Ala Leu Asp Leu Phe  
1 5 10 15

Leu Ala Leu Ser Glu Asn Asn Pro Ala Gly Asn Ile Phe Ile Ser Pro  
20 25 30

Phe Ser Ile Ser Ser Ala Met Ala Met Val Phe Leu Gly Thr Arg Gly  
35 40 45

Asn Thr Ala Ala Gln Leu Ser Lys Thr Phe His Phe Asn Thr Val Glu  
50 55 60

Glu Val His Ser Arg Phe Gln Ser Leu Asn Ala Asp Ile Asn Lys Arg  
65 70 75 80

Gly Ala Ser Tyr Ile Leu Lys Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Lys  
85 90 95

Thr Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Phe Leu Val Ser Thr Gln Lys Thr Tyr  
100 105 110

Gly Ala Asp Leu Ala Ser Val Asp Phe Gln His Ala Ser Glu Asp Ala  
115 120 125

Arg Lys Thr Ile Asn Gln Trp Val Lys Gly Gln Thr Glu Gly Lys Ile  
130 135 140

Pro Glu Leu Leu Ala Ser Gly Met Val Asp Asn Met Thr Lys Leu Val  
145 150 155 160

Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asn Trp Lys Asp Lys Phe Met  
165 170 175

Lys Glu Ala Thr Thr Asn Ala Pro Phe Arg Leu Asn Lys Lys Asp Arg  
180 185 190

ES 2 502 068 A1

Lys Thr Val<sub>195</sub> Lys Met Met Tyr Gln<sub>200</sub> Lys Lys Lys Phe Ala<sub>205</sub> Tyr Gly Tyr

Ile Glu<sub>210</sub> Asp Leu Lys Cys Arg<sub>215</sub> Val Leu Glu Leu Pro<sub>220</sub> Tyr Gln Gly Glu

Glu<sub>225</sub> Leu Ser Met Val Ile<sub>230</sub> Leu Leu Pro Asp Asp<sub>235</sub> Ile Glu Asp Glu Ser<sub>240</sub>

Thr Gly Leu Lys Lys<sub>245</sub> Ile Glu Glu Gln Leu<sub>250</sub> Thr Leu Glu Lys Leu<sub>255</sub> His

Glu Trp Thr Lys<sub>260</sub> Pro Glu Asn Leu Asp<sub>265</sub> Phe Ile Glu Val Asn<sub>270</sub> Val Ser

Leu Pro Arg<sub>275</sub> Phe Lys Leu Glu Glu<sub>280</sub> Ser Tyr Thr Leu Asn<sub>285</sub> Ser Asp Leu

Ala Arg<sub>290</sub> Leu Gly Val Gln Asp<sub>295</sub> Leu Phe Asn Ser Ser<sub>300</sub> Lys Ala Asp Leu

Ser Gly Met Ser Gly Ala<sub>310</sub> Arg Asp Ile Phe Ile<sub>315</sub> Ser Lys Ile Val His<sub>320</sub>

Lys Ser Phe Val Glu<sub>325</sub> Val Asn Glu Glu Gly<sub>330</sub> Thr Glu Ala Ala Ala<sub>335</sub> Ala

Thr Ala Gly Ile<sub>340</sub> Ala Thr Phe Cys Met<sub>345</sub> Leu Met Pro Glu Glu<sub>350</sub> Asn Phe

Thr Ala Asp<sub>355</sub> His Pro Phe Leu Phe<sub>360</sub> Phe Ile Arg His Asn<sub>365</sub> Ser Ser Gly

Ser Ile<sub>370</sub> Leu Phe Leu Gly Arg<sub>375</sub> Phe Ser Ser Pro

<210> 2  
 <211> 742  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Lys Phe Trp<sub>5</sub> Trp His Ala Ala Trp<sub>10</sub> Gly Leu Cys Leu Val<sub>15</sub> Pro

Leu Ser Leu Ala<sub>20</sub> Gln Ile Asp Leu Asn<sub>25</sub> Ile Thr Cys Arg Phe Ala Gly

Val Phe His<sub>35</sub> Val Glu Lys Asn Gly<sub>40</sub> Arg Tyr Ser Ile Ser Arg Thr Glu

ES 2 502 068 A1

Ala Ala Asp Leu Cys Lys Ala Phe Asn Ser Thr Leu Pro Thr Met Ala  
50 55 60

Gln Met Glu Lys Ala Leu Ser Ile Gly Phe Glu Thr Cys Arg Tyr Gly  
65 70 75 80

Phe Ile Glu Gly His Val Val Ile Pro Arg Ile His Pro Asn Ser Ile  
85 90 95

Cys Ala Ala Asn Asn Thr Gly Val Tyr Ile Leu Thr Ser Asn Thr Ser  
100 105 110

Gln Tyr Asp Thr Tyr Cys Phe Asn Ala Ser Ala Pro Pro Glu Glu Asp  
115 120 125

Cys Thr Ser Val Thr Asp Leu Pro Asn Ala Phe Asp Gly Pro Ile Thr  
130 135 140

Ile Thr Ile Val Asn Arg Asp Gly Thr Arg Tyr Val Gln Lys Gly Glu  
145 150 155 160

Tyr Arg Thr Asn Pro Glu Asp Ile Tyr Pro Ser Asn Pro Thr Asp Asp  
165 170 175

Asp Val Ser Ser Gly Ser Ser Ser Glu Arg Ser Ser Thr Ser Gly Gly  
180 185 190

Tyr Ile Phe Tyr Thr Phe Ser Thr Val His Pro Ile Pro Asp Glu Asp  
195 200 205

Ser Pro Trp Ile Thr Asp Ser Thr Asp Arg Ile Pro Ala Thr Thr Leu  
210 215 220

Met Ser Thr Ser Ala Thr Ala Thr Glu Thr Ala Thr Lys Arg Gln Glu  
225 230 235 240

Thr Trp Asp Trp Phe Ser Trp Leu Phe Leu Pro Ser Glu Ser Lys Asn  
245 250 255

His Leu His Thr Thr Thr Gln Met Ala Gly Thr Ser Ser Asn Thr Ile  
260 265 270

Ser Ala Gly Trp Glu Pro Asn Glu Glu Asn Glu Asp Glu Arg Asp Arg  
275 280 285

His Leu Ser Phe Ser Gly Ser Gly Ile Asp Asp Asp Glu Asp Phe Ile  
290 295 300

Ser Ser Thr Ile Ser Thr Thr Pro Arg Ala Phe Asp His Thr Lys Gln  
305 310 315 320

ES 2 502 068 A1

Asn Gln Asp Trp Thr Gln Trp Asn Pro Ser His Ser Asn Pro Glu Val  
 325 330 335  
 Leu Leu Gln Thr Thr Thr Arg Met Thr Asp Val Asp Arg Asn Gly Thr  
 340 345 350  
 Thr Ala Tyr Glu Gly Asn Trp Asn Pro Glu Ala His Pro Pro Leu Ile  
 355 360 365  
 His His Glu His His Glu Glu Glu Thr Pro His Ser Thr Ser Thr  
 370 375 380  
 Ile Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys  
 385 390 400  
 Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro  
 405 410 415  
 Lys Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala Ala Ala Ser Ala His  
 420 425 430  
 Thr Ser His Pro Met Gln Gly Arg Thr Thr Pro Ser Pro Glu Asp Ser  
 435 440 445  
 Ser Trp Thr Asp Phe Phe Asn Pro Ile Ser His Pro Met Gly Arg Gly  
 450 455 460  
 His Gln Ala Gly Arg Arg Met Asp Met Asp Ser Ser His Ser Ile Thr  
 465 470 475 480  
 Leu Gln Pro Thr Ala Asn Pro Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp  
 485 490 495  
 Arg Thr Gly Pro Leu Ser Met Thr Thr Gln Gln Ser Asn Ser Gln Ser  
 500 505 510  
 Phe Ser Thr Ser His Glu Gly Leu Glu Glu Asp Lys Asp His Pro Thr  
 515 520 525  
 Thr Ser Thr Leu Thr Ser Ser Asn Arg Asn Asp Val Thr Gly Gly Arg  
 530 535 540  
 Arg Asp Pro Asn His Ser Glu Gly Ser Thr Thr Leu Leu Glu Gly Tyr  
 545 550 555 560  
 Thr Ser His Tyr Pro His Thr Lys Glu Ser Arg Thr Phe Ile Pro Val  
 565 570 575  
 Thr Ser Ala Lys Thr Gly Ser Phe Gly Val Thr Ala Val Thr Val Gly  
 580 585 590

ES 2 502 068 A1

Asp Ser Asn Ser Asn Val Asn Arg Ser Leu Ser Gly Asp Gln Asp Thr  
595 600 605

Phe His Pro Ser Gly Gly Ser His Thr Thr His Gly Ser Glu Ser Asp  
610 615 620

Gly His Ser His Gly Ser Gln Glu Gly Gly Ala Asn Thr Thr Ser Gly  
625 630 635 640

Pro Ile Arg Thr Pro Gln Ile Pro Glu Trp Leu Ile Ile Leu Ala Ser  
645 650 655

Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile Leu Ala Val Cys Ile Ala Val Asn Ser  
660 665 670

Arg Arg Arg Cys Gly Gln Lys Lys Lys Leu Val Ile Asn Ser Gly Asn  
675 680 685

Gly Ala Val Glu Asp Arg Lys Pro Ser Gly Leu Asn Gly Glu Ala Ser  
690 695 700

Lys Ser Gln Glu Met Val His Leu Val Asn Lys Glu Ser Ser Glu Thr  
705 710 715 720

Pro Asp Gln Phe Met Thr Ala Asp Glu Thr Arg Asn Leu Gln Asn Val  
725 730 735

Asp Met Lys Ile Gly Val  
740

<210> 3  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly Asn Trp Lys Asp Lys Phe Met Lys Glu Ala Thr Thr Asn Ala Pro  
1 5 10 15

Phe Arg Leu Asn Lys Lys Asp Arg Lys Thr Val Lys Met Met Tyr Gln  
20 25 30

Lys Lys Lys Phe Ala Tyr Gly Tyr Ile Glu Asp Leu Lys Cys Arg Val  
35 40 45

Leu Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Glu Glu Leu Ser Met Val Ile Leu Leu  
50 55 60

Pro Asp Asp Ile Glu Asp Glu Ser Thr Gly Leu Lys Lys Ile Glu Glu  
65 70 75 80

ES 2 502 068 A1

Gln Leu Thr Leu Glu Lys Leu His Glu Trp Thr Lys Pro Glu Asn Leu  
85 90 95

Asp Phe Ile Glu Val Asn Val Ser Leu Pro Arg Phe Lys  
100 105



- ②① N.º solicitud: 201330446  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.03.2013  
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/574** (2006.01)  
**G01N33/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Gallardo M. "Divergencias genéticas y proteómicas en la fisiopatogenia de las neoplasias mieloproliferativas (NMP)". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Madrid 2012. [en línea], [recuperado el 25.07.2014]. Recuperado de Internet: <URL:http://eprints.ucm.es/15741/1/T33808.pdf>, todo el documento especialmente páginas 41, 61, 66-69, 81-82 y conclusiones.	1-18
X	Gallardo M. et al. "Proteomic Analysis Identifies HSP70 As a Novel Target Therapy to Polycythemia Vera". 53rd Annual Meeting and Exposition of the American-Society of Hematology (ASH); San Diego, CA, USA; December 10 -13, 2011. Blood. Vol. 118. Nº 21, página 1218, resumen 2827.	1-18
X	PUIGDECANET, E. et al. "gene expression profiling distinguishes JAK2V617F-negative from JAK2V617F-positive patients in essential thrombocythemia". LEUKEMIA. Julio 2008. Vol. 22, nº 7, páginas 1368-1376, resultados y discusión; Tabla 2, línea 4.	2-18
X	PELLAGATTI, A. et al. "Gene expression profiling in Polycythemia Vera using cDNA microarray technology". CANCER RESEARCH.15.07.2003. Vol. 63, nº 14, páginas 3940-3944; introducción.	2-18

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  
28.07.2014

Examinador  
M. Novoa Sanjurjo

Página  
1/4

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, BIOSIS, HCAPLUS, GOOGLE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.07.2014

#### Declaración

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-18	<b>NO</b>

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.

#### Consideraciones:

La invención es un método de diagnóstico de enfermedades mieloproliferativas entre las que se encuentra la trombocitemia esencial, que consiste en cuantificar los niveles, en una muestra aislada de médula ósea, de la proteína SerpinB1. Además de SerpinB1, pueden medirse los niveles de CD44.

**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	Gallardo M. "Divergencias genéticas y proteómicas en la fisiopatogenia de las neoplasias mieloproliferativas (NMP)". Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. Madrid 2012. [en línea], [recuperado el 25.07.2014]. Recuperado de Internet: <a href="http://eprints.ucm.es/15741/1/T33808.pdf">URL:http://eprints.ucm.es/15741/1/T33808.pdf</a> .	
D02	Gallardo M. et al. "Proteomic Analysis Identifies HSP70 As a Novel Target Therapy to Polycythemia Vera". 53rd Annual Meeting and Exposition of the American-Society of Hematology (ASH); San Diego, CA, USA; December 10 -13, 2011. Blood. Vol. 118. Nº 21, página 1218, resumen 2827.	
D03	PUIGDECANET, E. et al. "gene expression profiling distinguishes <i>JAK2V617F</i> -negative from <i>JAK2V617F</i> -positive patients in essential thrombocythemia". LEUKEMIA. Julio 2008. Vol. 22, nº 7, páginas 1368-1376.	
D04	PELLAGATTI, A. et al. "Gene expression profiling in Polycythemia Vera using cDNA microarray technology". CANCER RESEARCH.15.07.2003. Vol. 63, nº 14, páginas 3940-3944.	

El documento D01, describe la identificación de las proteínas SerpinB1 y CD44 sobreexpresadas, en células de enfermos de neoplasias mieloproliferativas.

El documento D02, describe la sobreexpresión de la proteína SerpinB1 en la policitemia vera.

El documento D03, describe la identificación de niveles superiores de CD44 en pacientes de trombocitemia esencial.

El documento D04, describe la identificación de niveles superiores de CD44 en pacientes de policitemia vera.

**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**

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

**Reivindicaciones 1-18**

La relación que existe entre la sobreexpresión de las proteínas SerpinB1 y CD44, y las neoplasias mieloproliferativas ha sido descrita previamente en el estado de la técnica. El documento D01 describe la identificación de ambas proteínas por métodos de inmunohistoquímica en los que los anticuerpos utilizados son los mismos anticuerpos comerciales utilizados en el procedimiento de la invención.

Los documentos D02-D04, describen también la relación de SerpinB1 y CD44 con la trombocitemia esencial y y la policitemia vera; por tanto, el método de la invención no es nuevo y no cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.